



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



IISPV ^R
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

**EFFECTOS DEL AYUNO INTERMITENTE Y LA RESTRICCIÓN
CALÓRICA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN
RATONES OBESOS**

Alberto Flores Pastor

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico: María del Mar Rodríguez Peña

En cooperación con: Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili

Supervisor/es: Victòria Ceperuelo Mallafré, Joan Badia Cabré y Sonia Fernández Veledo

Junio 2023

Yo, Alberto Flores Pastor, con DNI 41622402S, soy conocedor de la guía de prevención del plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, de Febrero de 2023

A handwritten signature in black ink that reads "Alberto". The signature is stylized with a large, looped initial 'A' and a horizontal line underlining the name.

Alberto Flores Pastor

Acerca de este proyecto

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha realizado a partir de las Prácticas Externas realizadas en el Grupo de Investigación en Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (DIAMET) del Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona, España, bajo la tutela de la Dra. Victòria Ceperuelo Mallafré, la Dra. María del Mar Rodríguez Peña, la Dra. Sonia Fernández Velado y Joan Badia Cabré **los resultados aquí presentados son confidenciales.**

Para más información, contactar con las autoras a través de: m.marrodpe@gmail.com, vceperuelo@gmail.com, sonia.fernandez@urv.cat o joan.badia@iispv.cat

ÍNDICE

1 Datos del centro.....	5
2 Resumen y palabras claves.....	6
3 Introducción.....	7
3.1 Obesidad.....	7
3.2 Restricción calórica y ayuno intermitente como estrategias terapéuticas en la obesidad.....	9
3.3 Microbiota intestinal.....	11
3.3.1 Microbiota intestinal y obesidad.....	13
3.3.2 Microbiota intestinal e intervenciones dietéticas.....	14
4 Hipótesis y objetivos.....	16
5 Metodología.....	18
5.1 Fase experimental <i>in vivo</i>	18
5.2 Análisis del microbioma fecal.....	19
5.3 ANCOMBC y transformación centered log ratio.....	20
5.4 Diversidad alfa y beta.....	23
6 Resultados.....	24
6.1 Análisis de los efectos de las diferentes dietas sobre el peso y el perfil metabólico.....	24
6.2 Análisis de los efectos de las diferentes dietas sobre la diversidad y composición de la microbiota intestinal.....	26
6.3 Cambios relativos en composición microbiana	29
7 Discusión.....	35
8 Conclusión.....	40
9 Bibliografía.....	41
10 Autoevaluación.....	47

1 Datos del centro

El Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) es una entidad sin ánimo de lucro que acoge a investigadores que realizan investigación sanitaria y biomédica en la Provincia de Tarragona. El organismo cuenta con sede en la ciudad de Tarragona y en la ciudad de Reus.

El IISPV se creó en el año 2005 en el marco de un acuerdo científico entre el Instituto Catalán de la Salud, el Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona, el Hospital de Tortosa Virgen de la Cinta, el Hospital Universitario San Juan de Reus, el Hospital Psiquiátrico de la Universidad Instituto Pere Mata de Reus y la Universidad Rovira i Virgili.

El centro lleva años liderando en la investigación en biomedicina y salud contando con más de 400 investigadores y más de 100 proyectos en activo. La oportunidad brindada de poder trabajar junto a ellos me ha permitido reforzar y ampliar mis conocimientos en el campo biotecnológico.

Teléfono: +34-977-75-93-94

Ubicación en Tarragona: Calle Dr. Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona

2 Resumen y palabras claves

En este estudio, se investigó la influencia de diferentes intervenciones dietéticas en la composición de la microbiota intestinal en ratones obesos. Un grupo de ratones obesos fueron alimentados con dieta hipercalórica y otro grupo fueron sometidos a restricción calórica (con alimento balanceado comercial). Para cada grupo se evaluaron diferentes tipos de ayuno intermitente. Estas intervenciones se siguieron durante 4 semanas.

Para evaluar las diferencias en la microbiota intestinal, se utilizaron varias técnicas de análisis. Se calculó el índice de Shannon como una medida de diversidad microbiana. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCoA, en inglés “principal coordinate análisis”) para identificar patrones en la estructura de la microbiota. Por último, se generó un heatmap de log fold change para visualizar las diferencias en la abundancia de los taxones entre los diferentes grupos dietéticos.

Para identificar los taxones que mostraban diferencias significativas entre los grupos dietéticos, se empleó el método ANCOM-BC (en inglés “ANCOM with Bayesian Corrections”). Este enfoque estadístico permitió analizar la abundancia relativa de los taxones y determinar aquellos que presentaban cambios significativos en su abundancia entre los diferentes grupos de intervención dietética. Estas herramientas nos permitieron investigar y comparar los perfiles de la microbiota intestinal en respuesta a las distintas intervenciones dietéticas.

Palabras clave: Obesidad, restricción calórica, ayuno intermitente, dieta hipercalórica, microbiota intestinal, índice de Shannon, ANCOM-BC, PCoA.

3 Introducción

3.1 Obesidad

La obesidad es una condición médica compleja y multifactorial que se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa corporal. Esta condición es considerada un importante problema de salud pública en todo el mundo, debido a su alta prevalencia y a las consecuencias negativas que tiene en la salud de las personas que la padecen.

La obesidad puede ser causada por una variedad de factores, que incluyen factores genéticos, ambientales, psicológicos y socioeconómicos. Entre los factores genéticos, se han identificado varios genes asociados con la obesidad, que afectan la forma en que el cuerpo procesa y almacena los alimentos. Además, la obesidad también puede ser causada por factores ambientales, como la dieta y el estilo de vida sedentario, así como por factores psicológicos, como el estrés y la depresión (Lin & Li, 2021).

El índice de masa corporal (BMI, en inglés “body mass index”) es una medida ampliamente utilizada para evaluar si una persona tiene un peso saludable en relación con su estatura. Aunque es útil para evaluar el riesgo de enfermedades relacionadas con la obesidad, presenta limitaciones al no considerar la composición corporal y la distribución de la grasa corporal. A pesar de estas limitaciones, el BMI sigue siendo una herramienta importante en la evaluación del riesgo de enfermedades relacionadas con la obesidad (Clin et al., 2018).

	BMI (kg/m ²)	Obesity Class	Disease Risk* (Relative to Normal Weight and Waist Circumference)	
			Men ≤40 inches (≤ 102 cm) Women ≤ 35 inches (≤ 88 cm)	> 40 in (> 102 cm) > 35 in (> 88 cm)
Underweight	< 18.5		-	-
Normal	18.5– 24.9		-	-
Overweight	25.0– 29.9		Increased	High
Obesity	30.0– 34.9	I	High	Very High
	35.0– 39.9	II	Very High	Very High

Extreme Obesity	≥ 40	III	Extremely High	Extremely High
-----------------	------	-----	----------------	----------------

Tabla 1: Clasificación del sobrepeso y la obesidad por BMI, perímetro de cintura y riesgo de enfermedad asociado. Extraído de: (Purnell, 2018)

La Tabla 1 presenta una clasificación del sobrepeso y la obesidad basada en el BMI, así como los rangos de perímetro de cintura que indican el riesgo de enfermedad asociado. Esta tabla ofrece información detallada sobre los diferentes niveles de BMI y perímetro de cintura que se asocian con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares, como la diabetes tipo 2 (T2D, en inglés “type 2 diabetes”), la hipertensión arterial y la enfermedad coronaria (Purnell, 2018).

La comprensión detallada de las causas fisiopatológicas que subyacen al desarrollo de las comorbilidades asociadas a la obesidad, como la resistencia a la insulina, la inflamación sistémica y el estrés oxidativo, entre otras, es esencial para el desarrollo de enfoques terapéuticos novedosos y más efectivos. En este sentido, la identificación de las vías de señalización molecular y celular involucradas en la patogénesis de la obesidad y sus comorbilidades puede proporcionar nuevas dianas terapéuticas para el diseño de tratamientos personalizados y más precisos (Fernández, 2021).

Aunque los hábitos de vida saludables, como una dieta adecuada y un aumento de la actividad física, son la primera línea de tratamiento en pacientes con obesidad, la pérdida de peso sigue siendo fundamental para el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades. Además, estas medidas también ayudan a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas. En caso de que la introducción de hábitos saludables no sea suficiente, también existen fármacos para el tratamiento de la obesidad que pueden ser utilizados de forma complementaria. Sin embargo, es importante destacar que estos medicamentos sólo están indicados en pacientes con un BMI superior a 30 kg/m² o superior a 27 kg/m² en presencia de comorbilidades asociadas a la obesidad (Lavie et al., 2018).

Para casos más graves de obesidad, como la obesidad mórbida, se puede considerar la cirugía bariátrica como una opción terapéutica. Este procedimiento

quirúrgico puede lograr una pérdida de peso significativa y sostenida, lo que se traduce en mejoras importantes en la salud metabólica y cardiovascular de los pacientes. Sin embargo, la cirugía bariátrica es un procedimiento invasivo que conlleva riesgos y complicaciones, y debe ser cuidadosamente evaluada y discutida con el paciente antes de ser considerada como una opción terapéutica viable (Bray et al., 2018).

Actualmente, se están investigando diversas opciones para el tratamiento de la obesidad y las enfermedades metabólicas. Dos de estas opciones son la restricción calórica (CR, en inglés “caloric restriction”) y el ayuno intermitente (IF, en inglés “intermittent fasting”). Estas estrategias están ganando cada vez más atención debido a su capacidad para reducir el peso corporal y mejorar la salud metabólica.

3.2 Restricción calórica y ayuno intermitente como estrategias terapéuticas en la obesidad

La CR es una estrategia en la que se reduce la cantidad de calorías que se consume diariamente, sin cambiar la frecuencia o el momento de las comidas. Esta técnica se logra mediante la administración de una dieta baja en calorías y equilibrada en nutrientes balanceada con el gasto energético diario. La CR se ha considerado un buen enfoque para tratar la obesidad humana y las complicaciones relacionadas, incluyendo la T2D. Sin embargo, la adherencia a esta dieta a largo plazo puede ser difícil, lo que limita su eficacia.

Por otro lado, evidencias emergentes muestran que las dietas que incorporan el IF también tienen efectos beneficiosos, incluso cuando no hay ni reducción en la ingesta de energía ni una pérdida de peso (Oliveira et al., 2022). El IF consiste en alternar períodos de ayuno y alimentación.

Varios estudios han demostrado que tanto la CR como el IF pueden mejorar la sensibilidad a la insulina (factor clave en el desarrollo de la T2D y otros trastornos metabólicos relacionados con la obesidad) y reducir el riesgo de enfermedades metabólicas (Gabel et al., 2019). Además de mejorar la sensibilidad a la insulina,

tanto la CR como el IF han sido asociados con una reducción en la inflamación crónica y en promover la autofagia (Bagherniya et al., 2018; Margină et al., 2020).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios en animales se han centrado en los efectos beneficiosos de la IF como estrategia de prevención, sin embargo, su eficacia como tratamiento una vez establecida la obesidad es incierta (Gotthardt et al., 2016; Henderson et al., 2021). Los regímenes de IF más comunes usados en modelos de ratones obesos son IF 1:1 o ayuno en días alternos, que comprende 1 día de alimentación y 1 día de ayuno, e IF2:1, que comprende 2 días de alimentación y 1 día de ayuno (K. H. Kim et al., 2017). No obstante, no existe un consenso sobre los efectos y mecanismos beneficiosos de estos. En particular, los resultados son contradictorios en cuanto a la ingesta energética y la regulación del peso corporal (Deng et al., 2020; Gotthardt et al., 2016; Henderson et al., 2021; Y. H. Kim et al., 2019; G. Li et al., 2017). Aunque en la mayoría de los estudios se ha demostrado que el IF protege contra el aumento de peso (Deng et al., 2020; Gotthardt et al., 2016; Henderson et al., 2021; Joslin et al., 2017; G. Li et al., 2017), su efecto sobre la pérdida de peso aún no está bien definido.

En general, la mayoría de los estudios en animales han demostrado mejoras metabólicas gracias al IF, incluso en presencia de una dieta alta en grasas (HFD, en inglés "high fat diet"). Sin embargo, todavía no se comprende bien cómo el IF mejora la homeostasis de la glucosa en la obesidad. Se han propuesto diversos factores subyacentes a los beneficios de este tipo de intervención dietética, como la inflamación, la termogénesis y la regulación de la microbiota intestinal (K. H. Kim et al., 2017; G. Li et al., 2017). Aunque estos hallazgos son prometedores, su interpretación es cuestionable debido a la incertidumbre sobre si los efectos beneficiosos del IF se deben principalmente a la reducción de la ingesta de alimentos o al propio IF (Boutant et al., 2016; Wan et al., 2003). Si se atribuyen al propio IF, aún no se sabe si los efectos son comparables a los de la CR. Por lo tanto, son necesarios más estudios preclínicos para aclarar los beneficios del IF y conocer los mecanismos subyacentes.

Dado que la interacción entre la ingesta de alimentos, el tipo de dieta y el tipo de ayuno pueden jugar un papel importante en la salud metabólica, es fundamental

considerar estos factores de manera integral en futuros estudios. En este sentido, existe solo un estudio preclínico que ha evaluado los efectos de la IF (1:1) en combinación con una HFD o con una dieta baja en grasas (LFD, en inglés “low fat diet”) en ratones obesos (Gotthardt et al., 2016). Además, no se han realizado estudios que comparen los efectos de diferentes regímenes de IF y diferentes dietas.

Por lo tanto, para esclarecer la interacción entre diferentes protocolos de IF y dietas, y para identificar la intervención más adecuada en ratones obesos, se llevará a cabo un estudio en el que se examinarán los efectos de diferentes regímenes de IF en combinación con diferentes dietas.

3.3 Microbiota intestinal

La microbiota es el conjunto de microorganismos que se hospedan en el cuerpo humano. Esta se encuentra poblando la piel y numerosas cavidades con mucosa como la nasal, la pulmonar o la oral, entre otras. No obstante, donde se encuentra la mayor abundancia de microorganismos es en el intestino, concretamente en el ciego del intestino grueso. A esta población se le conoce como microbiota intestinal. Esta es heterogénea y se compone por un grupo de especies no constante. Contiene alrededor de 10^{11} - 10^{12} células microbianas y habitan principalmente bacterias, aunque también se observan virus, hongos y otros microorganismos. De hecho, se cree que los microorganismos de la microbiota intestinal pueden llegar a sumar entre 1 y 2 kg. También se ha demostrado que hay 150 veces más genes en el genoma de la microbiota intestinal que en el genoma humano (Senchukova, 2023).

Cada vez hay más evidencias que respaldan el papel crucial que desempeña la microbiota intestinal en la salud humana, dado que contribuye a funciones fisiológicas clave como el metabolismo energético, la señalización metabólica y la regulación de la integridad de la barrera intestinal (Marlatt & Ravussin, 2017). Además, se ha observado que la microbiota intestinal y el huésped han desarrollado una relación mutualista a lo largo del tiempo, donde el huésped brinda un ambiente nutricionalmente estable para la supervivencia de los

microbios, y a su vez, la microbiota intestinal cumple una serie de funciones esenciales para el huésped (Anwar et al., 2021).

De hecho, se ha demostrado que las funciones pleiotrópicas de la microbiota intestinal van más allá de la digestión de macronutrientes dietéticos complejos y proporcionan nutrientes y vitaminas esenciales para contribuir a la defensa contra los patógenos, incluida la formación y el mantenimiento del sistema inmunológico. Además de estas funciones de "limpieza", la microbiota intestinal actúa como un órgano endocrino, convirtiendo las señales nutricionales en señales similares a las hormonas que ingresan a la circulación y viajan a sitios distales con un impacto directo en la fisiología del huésped (Cornejo-Pareja et al., 2018). Por esto, mantener una microbiota intestinal saludable es fundamental para el mantenimiento de un adecuado estado nutricional y fisiológico del huésped, y también para la prevención de diversas enfermedades. La disbiosis, una alteración en la composición de la microbiota intestinal, puede desencadenar una serie de efectos adversos en la fisiología del huésped y aumentar su susceptibilidad a diversas enfermedades crónicas y afecciones (Patterson et al., 2016). Entre ellas, se incluyen los trastornos metabólicos como la obesidad, la T2D, las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, en inglés "non-alcoholic fatty liver disease"), las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con un estado inflamatorio crónico.

Una medida comúnmente utilizada para evaluar la diversidad de la microbiota es el índice de diversidad de Shannon, que tiene en cuenta tanto la riqueza de especies (número de especies diferentes presentes) como la equitatividad (distribución relativa de cada especie). Este índice se calcula a partir de la abundancia de cada taxón identificado en la muestra y su frecuencia relativa. Una mayor diversidad de especies en la microbiota se asocia a un mejor estado de salud (Roswell et al., 2021).

Además de la diversidad alfa (dentro de la muestra), medida por el índice de Shannon, también se pueden analizar la diversidad beta (entre muestras). La diversidad beta se refiere a las diferencias en la composición de la microbiota entre individuos o grupos de individuos. Esta diversidad se puede evaluar mediante técnicas de análisis multivariante (Wagner et al., 2018).

La diversidad alfa (medida por índice de Shannon) y la diversidad beta son medidas importantes para evaluar la salud de la microbiota intestinal y su relación con la obesidad y otras enfermedades metabólicas. Se ha observado que las personas con obesidad tienen una menor diversidad taxonómica en su microbiota intestinal, es decir, una menor diversidad de Shannon en comparación con individuos con un BMI normal (Gao et al., 2018).

3.3.1 Microbiota intestinal y obesidad

A medida que se ha profundizado en el conocimiento de la microbiota intestinal, se ha demostrado que está estrechamente relacionada con el desarrollo de la obesidad y de enfermedades metabólicas como la T2D. Se ha observado que la composición de la microbiota intestinal difiere entre individuos con obesidad y aquellos con un peso normal.

Asimismo, se cree que la disbiosis intestinal, es decir, el desequilibrio en la composición de la microbiota, puede tener un papel importante en la obesidad. Los estudios han demostrado que la microbiota intestinal de las personas obesas es menos diversa y tiene una menor cantidad de bacterias beneficiosas, como las del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Además, se ha demostrado que un desequilibrio entre los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* se asocia a la obesidad. No obstante, cabe decir que no todas las especies de estos filos son perjudiciales (Cao et al., 2019). También, se encontró una disminución significativa en la abundancia de bacterias de la especie *Bifidobacterium adolescentis* en ratones obesos alimentados con HFD en comparación con ratones alimentados con una dieta normal (B. Wang et al., 2021).

Estudios en animales de laboratorio han demostrado que los cambios en la composición de la microbiota pueden influir en el aumento de peso corporal y en la resistencia a la insulina, un factor de riesgo para la T2D (Diamant et al., 2011).

Se ha demostrado que el trasplante de microbiota intestinal de ratones delgados en ratones obesos puede reducir el peso corporal y mejorar la sensibilidad a la insulina y viceversa. Además, la modificación de la microbiota intestinal mediante

el uso de probióticos, prebióticos y antibióticos ha demostrado ser una estrategia prometedora para prevenir o tratar la obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas (Cornejo-Pareja et al., 2018).

Se ha investigado cómo la microbiota intestinal afecta al metabolismo de los lípidos y los carbohidratos. Se ha demostrado que las bacterias del intestino son capaces de producir ácidos grasos de cadena corta que tienen efectos beneficiosos en el metabolismo lipídico, así como en la regulación del apetito y la sensación de saciedad. También se ha demostrado que la microbiota intestinal influye en la producción de hormonas que regulan el apetito y la saciedad, como la grelina y la leptina (Queipo-Ortuño et al., 2013).

Sin embargo, aún hay mucho que se desconoce sobre la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad. Se necesitan más estudios para comprender los mecanismos subyacentes y cómo se pueden utilizar estrategias de modificación de la microbiota intestinal para prevenir o tratar la obesidad y las enfermedades metabólicas.

3.3.2 Microbiota intestinal e intervenciones dietéticas

La microbiota intestinal podría desempeñar un papel clave en los efectos beneficiosos tanto de la CR como del IF. Estas prácticas dietéticas han sido objeto de investigaciones recientes debido a su impacto en el metabolismo y la prevención de enfermedades. Comprender la interacción entre la microbiota intestinal y estos enfoques dietéticos podría revelar los mecanismos subyacentes a estos efectos positivos.

En cuanto a la CR, se ha demostrado que induce cambios en la composición y función de la microbiota intestinal, lo que se ha relacionado con efectos beneficiosos para la salud. En varios estudios se usaron modelos de ratones obesos para investigar el efecto de la CR sobre la microbiota intestinal. Los resultados mostraron que la CR inducía cambios en la composición de la microbiota intestinal, incluyendo una reducción en la abundancia de bacterias proinflamatorias y un aumento en la abundancia de bacterias productoras de

ácidos grasos de cadena corta, como el butirato y el propionato. Entre ellas destacan las especies *Clostridium ramosum*, *Hungatella hathewayi*, *Akkermansia muciniphila* y *Alistipes obesi*. Además, se observó una disminución en la abundancia de bacterias de la familia *Lachnospiraceae* y un aumento en la abundancia de bacterias de la familia *Bacteroidaceae*. Estos cambios se asociaron con una mayor sensibilidad a la insulina y una mejor regulación del metabolismo de la glucosa en los ratones (Sbierski-Kind et al., 2022; Tanca et al., 2018; Xu et al., 2020).

Respecto al IF, se ha demostrado que este induce cambios similares a la CR en la composición y función de la microbiota intestinal, lo que también se ha relacionado con efectos beneficiosos para la salud. Estos cambios están estrechamente relacionados con la reducción de la resistencia a la insulina y la mejora del control glucémico, la disminución de la inflamación y la oxidación, y la activación de vías de reparación celular y de autofagia, entre otros (Song & Kim, 2023). Un estudio publicado en 2020 encontró que las diferentes duraciones del ayuno tenían impactos variables en la microbiota intestinal. Por ejemplo, con un ayuno de 16 horas se observaba un aumento de los niveles de *Akkermansia* y una disminución de los niveles de *Alistipes*. Estos cambios se asociaron con una reducción en la inflamación y una mejora en la permeabilidad intestinal en los ratones. El artículo destaca el potencial del IF para dar forma a la microbiota intestinal y que el impacto puede depender en función de los protocolos de ayuno empleados (Li et al., 2020).

Estos estudios sugieren que tanto la CR como el IF pueden modificar la composición y función de la microbiota intestinal de ratones obesos, lo que se asocia con efectos beneficiosos para la salud, como una mejora en la regulación del metabolismo de la glucosa y una reducción en la inflamación.

4 Hipótesis y objetivos

Considerando que:

- En humanos, la CR se considera una buena estrategia para tratar la obesidad, pero su mantenimiento a largo plazo resulta difícil.
- Las dietas basadas en el IF parecen tener efectos beneficiosos similares a la CR en humanos, y presentan una mejor adherencia. No obstante, se requieren estudios preclínicos para comprender los mecanismos y los efectos en profundidad.
- En la mayoría de los estudios en ratones, se han observado mejoras metabólicas con el IF, incluso en presencia de una dieta hipercalórica. Sin embargo, la interpretación de estos hallazgos es cuestionable, ya que no está claro si los beneficios del IF se deben principalmente a la reducción de la ingesta de alimentos o si son atribuibles específicamente al IF. Además, se ha estudiado principalmente como una estrategia de prevención y no como un tratamiento una vez que la obesidad ya está establecida.
- Se ha observado que tanto la CR como los regímenes de IF en la obesidad están asociados en parte con cambios en la microbiota intestinal.
- La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la salud del huésped, ejerciendo diversos efectos protectores, estructurales, inmunitarios y metabólicos en el intestino y los tejidos periféricos.

Nuestra hipótesis es que en ratones obesos, el tipo de dieta y el régimen de IF utilizado pueden tener efectos diferentes, tanto a nivel metabólico como en la microbiota intestinal. Por lo tanto, nuestro objetivo general es estudiar los efectos de diferentes intervenciones dietéticas, basadas en la CR continua y en diferentes regímenes de IF, sobre la microbiota intestinal en ratones obesos.

Además, durante este proyecto se plantean las siguientes tareas específicas:

- Evaluar la diversidad de la microbiota intestinal en ratones obesos mediante la aplicación de diferentes protocolos dietéticos, que incluyen la

HFD, CR y diferentes regímenes de IF, utilizando el índice de Shannon como medida de diversidad.

- Realizar un PCoA para identificar patrones en la estructura de la microbiota intestinal de los ratones obesos sometidos a los diferentes protocolos dietéticos. Este análisis permitirá visualizar las similitudes y diferencias en la composición de la microbiota entre los grupos de ratones.
- Realizar un análisis de las diferencias en la abundancia de los taxones utilizando el método fold change ANCOM. Este análisis estadístico permitirá identificar los taxones microbianos que presenten diferencias significativas en su abundancia entre los diferentes protocolos dietéticos.

5 Metodología

5.1 Fase experimental *in vivo*

La fase experimental *in vivo* y la extracción de muestras fue realizada por el grupo DIAMET como parte de un proyecto de investigación en curso dirigido por la Dra. Victòria Ceperuelo Mallafré y se aportaron datos sobre la evolución del peso corporal y el perfil metabólico para desarrollar el presente trabajo de fin de grado proyecto.

En esta fase experimental, se usaron ratones macho C57BL/6J como modelo de estudio. Los ratones se alimentaron con una dieta hipercalórica (Rodent Diet With 60 kcal% Fat D12492, Fisher Scientific, New Hampton, EE. UU.) durante 8 semanas para inducir el fenotipo obeso. Luego, una parte continuó con la misma dieta y otra cambió a una dieta de CR que consiste en una dieta normal con un 30% de reducción de (3,1% contenido de grasa; dietas SAFE, A04; restricción energética del 30%, SAFE, Augy, Francia). Posteriormente, se dividieron en 6 intervenciones en función del protocolo que siguieron: intervención 1, intervención 2, intervención 3, intervención 4, intervención 5 e intervención 6. Los ratones recibieron estas dietas durante 4 semanas y, por lo tanto, la duración total de la fase *in vivo* fue de 12 semanas.

Para evaluar la efectividad de las diferentes dietas y regímenes de ayuno en el metabolismo de los animales, se realizaron diversas pruebas al finalizar las 4 semanas de intervención dietética, para analizar el perfil metabólico de los mismos. Para ello, se midieron los niveles basales de glucosa e insulina en sangre, se evaluó la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina y se midieron los niveles de triglicéridos (TG, en inglés "triglycerides") y colesterol total en sangre.

Para evaluar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, se realizaron inyecciones intraperitoneales de glucosa y de insulina en los ratones ayunados durante 16 horas y 3 horas respectivamente.

Se recolectaron muestras de sangre de la cola de los animales en diferentes tiempos y se midieron los niveles de glucosa en sangre utilizando un glucómetro portátil (lector de glucosa Accu-Chek; Roche).

Los niveles basales de insulina en sangre se midieron utilizando un kit comercial ultrasensible a la insulina de ratón (BioVendor) y los de glucosa utilizando un glucómetro portátil (lector de glucosa Accu-Chek; Roche). Los niveles de TG y colesterol total en sangre se midieron enzimáticamente utilizando kits comerciales adaptados a un autoanalizador COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza).

5.2 Análisis del microbioma fecal

Durante el análisis de muestras fecales de ratones, se obtuvieron amplicones del gen 16S rRNA siguiendo estrictamente el protocolo de preparación de bibliotecas de secuenciación del gen 16S rRNA de Illumina Inc. (San Diego, CA; Cod. 15044223 Rev. A). Específicamente, se amplificaron las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA utilizando secuencias de cebadores específicas con adaptadores Illumina ligados en los extremos. En este sentido, los cebadores utilizados para la amplificación de longitud completa de estas regiones del gen se designan como 16S rRNA V3-V4 Forward (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACGGGNGGC WGC AG) y 16S rRNA V3-V4 Reverse (GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GAC TACHVGGG TAT CT AATCC), respectivamente, y utilizando la nomenclatura de nucleótidos estándar de la IUPAC.

El ADN genómico microbiano (5 ng/ μ L en Tris 10 mM, pH 8,5) se utilizó como material de partida para el protocolo de amplificación de ARNr 16S. Una vez finalizada la amplificación, se procedió a la multiplexación de los productos de PCR con el Nextera XT Index Kit de Illumina. Luego, se corrieron los productos de PCR en un chip Bioanalyzer DNA 1000 para verificar el tamaño, esperando encontrar un pico sobre los 550 pares de bases en el electroferograma de Bioanalyzer. Finalmente, las bibliotecas resultantes se secuenciaron utilizando el kit de reactivos MiSeq v3 (MS-102-3001) en un secuenciador MiSeq, siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina). El análisis de la composición microbiana fue hecho siguiendo protocolos descritos anteriormente (Cardona et al., 2012; Santiago et al., 2014).

La identificación taxonómica de los amplicones secuenciados fue realizada bioinformáticamente según métodos previamente descritos en publicaciones del grupo (Huber-Ruano et al., 2022) por una plataforma especializada (FISABIO). Este trabajo se centra en el análisis bioinformático posterior a la identificación taxonómica.

5.3 ANCOMBC y transformación centered log ratio

Para el análisis diferencial de la abundancia relativa de la microbiota intestinal se optó por usar la librería ANCOMBC (Analysis of Composition of Microbiomes with Bias Correction) del programario R. Esta es una herramienta de análisis de datos de microbiota que se utiliza para identificar las diferencias significativas entre las composiciones de microbiotas de dos o más grupos. ANCOMBC se basa en la técnica de transformación centered log ratio (clr) para tener en cuenta la composicionalidad inherente de los datos de microbiota, como en la corrección del sesgo muestral, el que ocurre debido a diferencias en el muestreo de las muestras o del tamaño muestral (Cappellato et al., 2022).

La transformación clr se basa en la teoría de la composición, que establece que los datos de microbiota son inherentemente composicionales, lo que significa que la abundancia relativa de cada especie está estrechamente relacionada con la abundancia relativa de las otras especies en la muestra.

El resultado es una matriz de datos transformados que representa la diferencia logarítmica entre la abundancia absoluta de cada especie y la media geométrica de todas las especies en la muestra (Quinn et al., 2019).

Esta transformación tiene varias ventajas. En primer lugar, elimina la dependencia entre las diferentes especies en una muestra, lo que permite el uso de técnicas estadísticas con asunciones de independencia. Además, esta transformación se puede aplicar solo a los valores de abundancia absoluta que son superiores a cero, reduciendo el impacto de estos ceros y facilitando el análisis de datos con alta dispersión. En tercer lugar, la transformación clr produce una medida de similitud entre las diferentes especies que tiene en cuenta las proporciones relativas entre ellas, lo que es importante en el análisis de datos de composición.

La técnica clr se utiliza comúnmente en el análisis de datos de microbiota, ya que los datos de microbiota son inherentemente composicionales y pueden ser difíciles de analizar con técnicas estadísticas clásicas debido a la alta dispersión y al número elevado de ceros.

El método ANCOMBC introduce también un método de corrección del sesgo muestral mediante una regresión lineal en la cual se añade un coeficiente de compensación, calculado a partir de los datos observados. Esta compensación del ANCOMBC para el sesgo muestral se refiere por sus autores como “bias correction”.

También proporciona una métrica de distancia para evaluar la similitud entre las composiciones de microbiota de los diferentes grupos. La métrica de distancia que ANCOMBC utiliza es la distancia de Aitchison, una medida de la diferencia relativa entre las composiciones de microbiota de dos grupos (Gloor et al., 2017).

ANCOMBC es una herramienta de análisis de datos de microbiota ampliamente utilizada y validada en la literatura científica. Ha demostrado ser una herramienta poderosa para identificar las diferencias significativas entre las composiciones de microbiota de dos o más grupos, mientras se tiene en cuenta la estructura de composición de los datos y se corrige el sesgo técnico.

En nuestro caso y para este trabajo, obtuvimos los datos de abundancia absoluta con los taxones ya identificados y con sus relaciones filogenéticas, por parte del Instituto de Investigación Sanitaria Pere i Virgili (IISPV). Esos datos estaban en el formato phyloseq, una estructura de datos que se utiliza mucho en el análisis de datos de microbioma. Este formato permite además almacenar y manipular datos de diversidad microbiana, lo que incluye información de las abundancias relativas de distintos taxones en muestras biológicas, información de los metadatos de las muestras y la información taxonómica de cada secuencia obtenida. Este formato se puede almacenar y leer como un objeto de R.

Según las hipótesis del trabajo y la línea de investigación del laboratorio, se quería investigar las diferencias entre ciertos grupos de muestras separadas

según la dieta y el protocolo. Específicamente, eran de especial interés tres tipos de comparaciones, que describimos a continuación.

Resumiendo, para cada una de esas comparaciones se filtró apropiadamente el objeto "phyloseq" de R, excluyendo los grupos que no son comparados y formando las seis intervenciones: intervención 1, intervención 2, intervención 3, intervención 4, intervención 5 e intervención 6.

Cabe decir que estos grupos también se formaron para el análisis de diversidad alfa y para la realización del PCoA Bray-Curtis. En cambio, para realizar el heatmap se decidió fusionar las intervenciones 2 y 3 y las intervenciones 5 y 6 y realizar las siguientes comparaciones (comparación 1, comparación 2 y comparación 3).

La función `ancombc()` se utiliza para realizar el análisis de composición microbiota. Los parámetros que se han modificado incluyen "data", que es el objeto `phyloseq` que contiene la información sobre la composición de la a analizar. "Tax_level", sirve para especificar el nivel taxonómico en el que se desea realizar el análisis. En nuestro caso realizaremos el estudio a nivel de familia, género y especie.

La variable "formula" se utiliza para especificar la fórmula de modelo a utilizar para realizar el análisis de composición multivariante. Especifica la relación entre la variable de respuesta y las variables explicativas. En esta variable incluiremos la variable que separa en función de las dietas o la que separa en función del protocolo. Cabe decir que en todos los análisis se ha añadido de covariable el peso. Al incluir el peso como covariable en la fórmula, se puede controlar su efecto y mejorar la precisión de los análisis.

También se incluyó la variable "group". Esta es un factor categórico que se utiliza para agrupar los datos antes de realizar el análisis ANCOMBC. En nuestro caso se agrupará en función al parámetro establecido en la variable formula.

Otra variable por destacar a pesar de no ser modificada es el parámetro "prevalence". Este es un valor que indica la prevalencia mínima que una característica debe tener para ser considerada en el análisis. El valor por defecto

de este parámetro es 0.2, lo que significa que una característica debe estar presente en al menos el 20% de las muestras para ser incluida en el análisis. También se encuentra la variable “alpha”, la cual indica el nivel de significancia deseado para la prueba. Por defecto, el valor es 0.05.

5.4 Diversidad alfa y beta

Previamente al cálculo de la diversidad alfa, se agregaron los valores de abundancia absoluta de los taxones a nivel de especie mediante la función “`agglomerateByRank`” de la librería `mia` de R. La diversidad alfa de Shannon fue calculada entonces con la función `diversity()` de la librería `vegan` de R, especificando “shannon” en el argumento “index” de esta función.

Previamente, al cálculo de la diversidad beta, también se agregaron los valores de abundancia absoluta de los taxones a nivel de familia, género y especie mediante la función “`agglomerateByRank`”. La diversidad beta fue calculada entonces con la función “`vegdist`” de la librería “`vegan`” de R, especificando “bray” (de Bray-Curtis) en el argumento “method” de esta función. Se aplicó después un “weighted classical multidimensional scaling” (Principal Coordination Analysis o PCoA) sobre los resultados previos de disimilaridad mediante la función “`wcmdscale`” de la librería “`vegan`” de R con la opción “`eigen=TRUE`”. Por último, se graficaron los resultados de ordinación incluyendo elipses calculadas mediante la función “`ordiellipse`” de la misma librería.

6 Resultados

El código creado con la ayuda del bioinformático Joan Badia Cabré para la realización de las diferentes representaciones es confidencial.

6.1 Análisis de los efectos de las diferentes dietas sobre el peso y el perfil metabólico

Durante las cuatro semanas de intervención dietética, se llevó a cabo un seguimiento exhaustivo del peso corporal de los ratones. La evolución del peso corporal se puede observar en la Figura 1. Se observó un aumento en el peso de los ratones en la intervención 1 a lo largo de las semanas, mientras que las intervenciones 2 y 3 lograron mantener prácticamente su peso inicial a lo largo del período de estudio. En contraste, las intervenciones 4, 5 y 6 experimentaron una disminución significativa en su peso.

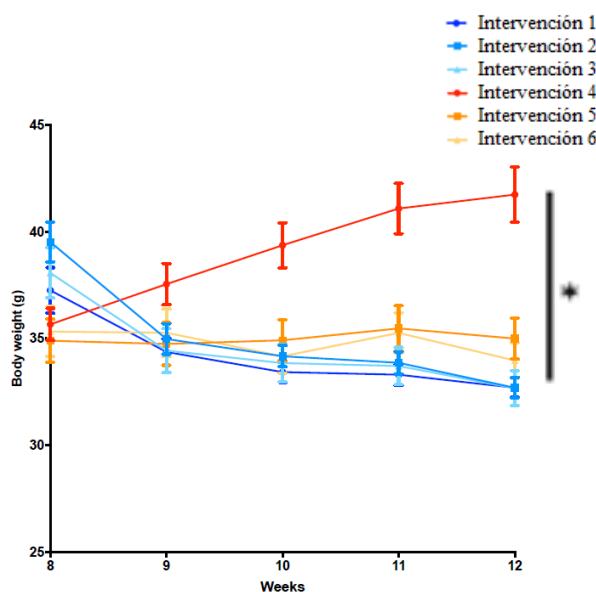


Figura 1: Comparación entre el peso corporal en gramos antes (en la semana 8) y después (en la semana 12) de la intervención dietética. Todos los valores expresados como media \pm S.E.M. (n=12); *p<0,05; (analizado por ANOVA de dos vías). Proporcionado por: grupo DIAMET

Los resultados del test de tolerancia a la glucosa (GTT, en inglés “glucose tolerance test”) y del test de tolerancia a la insulina (ITT, en inglés “insulin tolerance test”) se puede observar en la Figura 2. Estos resultados revelaron que los ratones que siguieron intervención 2 y 3 mostraron una mejora en su

tolerancia a la glucosa en comparación con la intervención 1. Sin embargo, esta mejora no fue tan marcada como la observada en las intervenciones 4, 5 y 6, donde se observó un mayor aumento en la tolerancia a la glucosa en las intervenciones 5 y 6 en comparación con la 4. En cuanto a la sensibilidad a la insulina, se observó una mejora similar en todas las intervenciones dietéticas en comparación con la intervención 1, y no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes dietas y regímenes.

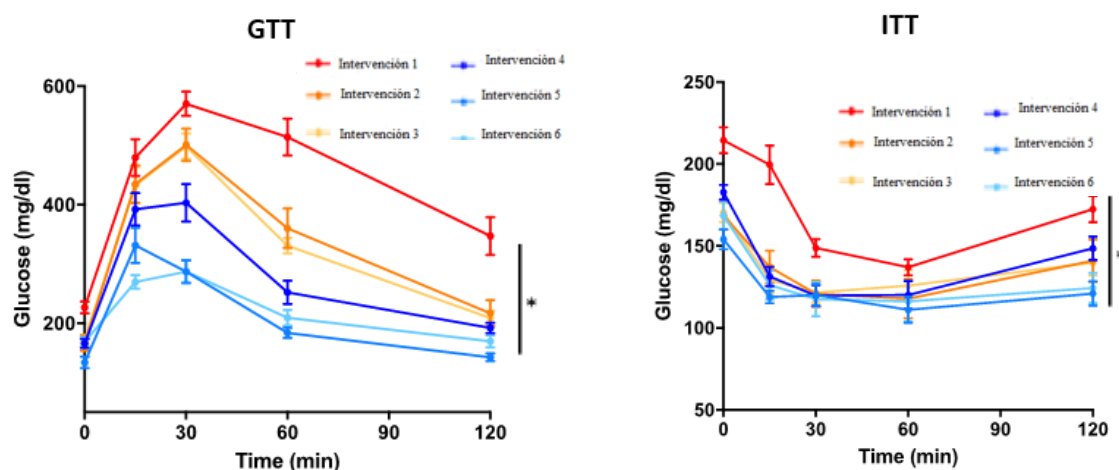


Figura 2: Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) y prueba de tolerancia a la insulina (ITT) a las 12 semanas. Todos los valores expresados como media \pm S.E.M. (n=12); *p<0,05; (analizado por ANOVA de dos vías). Proporcionado por: grupo DIAMET

Los niveles basales de glucosa, insulina, TG y colesterol se pueden observar en la Figura 3. Se observa una reducción en los niveles de glucosa basal e insulina en todos los grupos sometidos a intervenciones dietéticas en comparación con la intervención 1. Esto era de esperar, dado que los ratones obesos de la intervención 1 presentaban un peso corporal más elevado. Como dato interesante, todas las dietas implementadas mostraron una disminución similar en los niveles de glucosa e insulina, sin que se observaran diferencias significativas entre ellas. En cuanto al perfil lipídico, los niveles de TG solo estaban disminuidos significativamente en las intervenciones 2 y 4. En cambio, los niveles de colesterol total estaban disminuidos en todas las dietas, sobre todo en las intervenciones 4, 5 y 6.

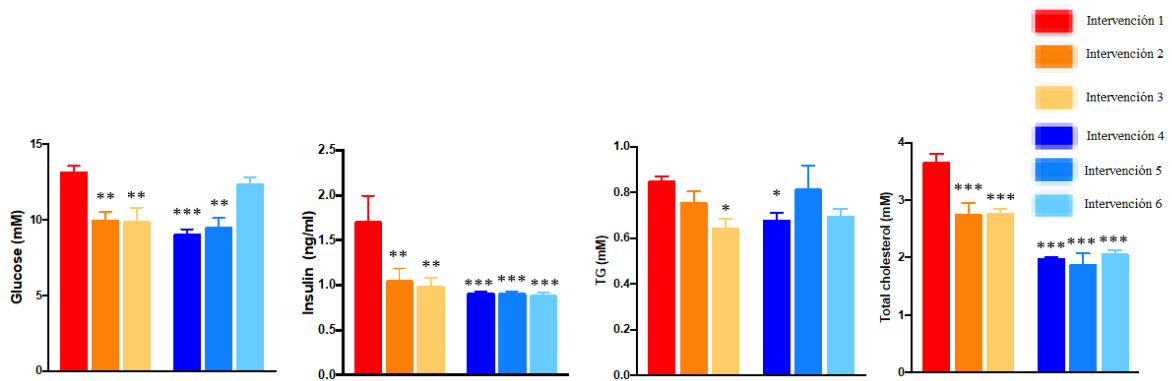


Figura 3: Niveles plasmáticos de glucosa, insulina, TG y colesterol; Todos los valores expresados como media \pm S.E.M. (n=12); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (analizado mediante ANOVA ordinario de una vía). Proporcionado por: grupo DIAMET

Como conclusión se puede apreciar que en las intervenciones 4, 5 y 6 se obtuvo una pérdida de peso y una mejora de la homeostasis de la glucosa y del perfil lipídico. Por otro lado, las intervenciones 2 y 3 ofrecieron un efecto protector sobre el aumento de peso y también obtuvieron beneficios similares a los comentados anteriormente.

6.2 Análisis de los efectos de las diferentes dietas sobre la diversidad y composición de la microbiota intestinal

El índice de Shannon es una medida ampliamente utilizada para estimar la diversidad y equidad de especies en una comunidad. Cuanto mayor es el valor de Shannon, mayor es la diversidad alfa, lo que implica una mayor variedad de especies y una distribución más equitativa de sus abundancias.

En la figura 4 se observa que la intervención 1 presenta una tendencia hacia una mayor variabilidad en la diversidad alfa de la microbiota intestinal en comparación con los otros protocolos evaluados. Además, al comparar las intervenciones 2 y 3 con la 1 y las intervenciones 5 y 6 con la 4, no se encontraron diferencias significativas, como tampoco al comparar la intervención 1 con la 4. Eso significa que no hay cambios estadísticos significativos en la diversidad alfa de la microbiota intestinal debido a las intervenciones analizadas.

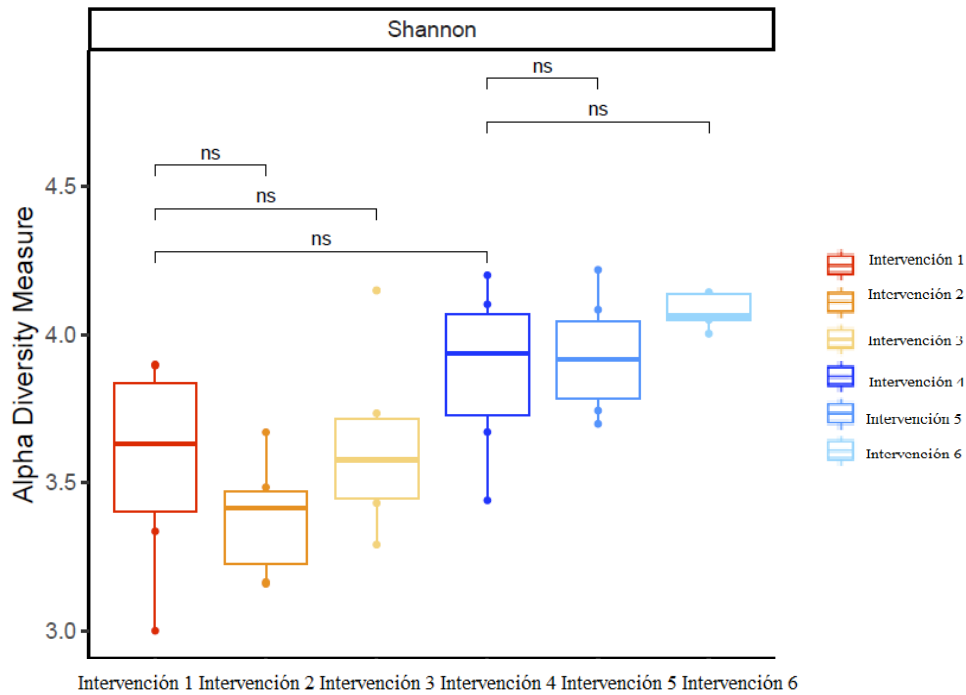


Figura 4: Diversidad alfa de la microbiota intestinal en los diferentes protocolos estudiados; $p < 0.05$. Realizado con la ayuda de Joan Badia Cabré

También se llevó a cabo un análisis PCoA con Bray-Curtis. En el análisis PCoA con Bray-Curtis, se utilizó una métrica de disimilaridad llamada índice de Bray-Curtis para evaluar la composición de la microbiota intestinal entre diferentes ecosistemas o grupos. Como explicación simplificada, la métrica de Bray-Curtis entre dos muestras compara tanto las especies compartidas como las especies exclusivas, con el valor máximo de 1 representando que no hay ninguna especie compartida y con el valor mínimo de 0 representando que todas las especies están compartidas.

En este análisis PCoA, se observaron diferencias significativas a nivel general en los tres niveles taxonómicos analizados con una prueba de Adonis, lo que indica una disimilitud en la composición microbiana entre los grupos según los diferentes protocolos. Debido a una falta de consenso sobre métodos estadísticos post-hoc para comparar a pares los grupos cuando hay dos variables de respuesta o dimensiones, se ha optado por no presentar los resultados post-hoc, pero el laboratorio está trabajando en ello.

Se observa como en las intervenciones 5 y 6 se producen mayores cambios en la composición microbiana. Estos grupos se separan más del resto en el análisis a nivel de familia (Figura 5a).

A nivel de género (Figura 5b), se aprecian diferencias más marcadas entre las intervenciones 1,2 y 3 y las intervenciones 4, 5 y 6. Las intervenciones 5 y 6 siguen mostrando una mayor separación entre los grupos.

En el análisis a nivel de especie (Figura 5c), se observa una tendencia similar a la gráfica de género. En él se distinguen diferencias entre marcadas entre las intervenciones 1,2 y 3 y las intervenciones 4, 5 y 6. Las intervenciones 1, 2 y 3 muestran una mayor proximidad entre sí, lo que indica una mayor similitud en la composición de especies de la microbiota intestinal en comparación con los demás grupos. Por otro lado, los grupos 4 y 6 también presentan cierta proximidad entre ellos, pero se separan del conjunto anterior. Además, el grupo 5 se encuentra separado de todos los demás grupos, lo que indica una composición de especies única y diferente.

En resumen, se encontraron diferencias significativas en las tres categorías taxonómicas analizadas, indicando una separación de los grupos según las diferentes dietas. Las intervenciones 5 y 6 parecen tener un mayor impacto en la microbiota, mostrando una mayor separación en comparación con el resto. A nivel de género y especie, se observan patrones similares, donde las diferencias entre las dietas son más pronunciadas.

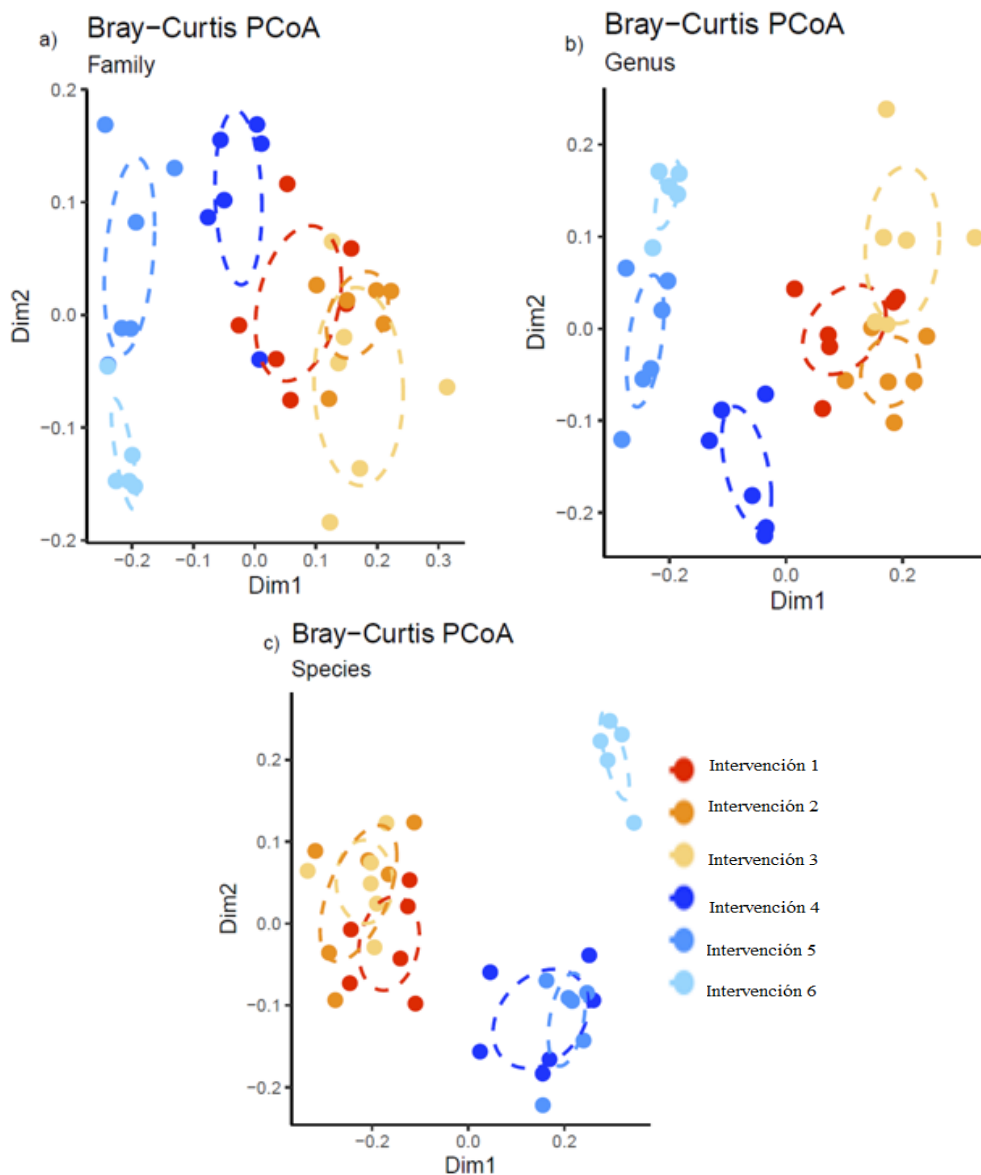


Figura 5: Gráfico PCoA de la diversidad de la microbiota intestinal en diferentes protocolos de estudio utilizando la distancia de Bray-Curtis para **a)** nivel de familia, **b)** nivel de género y **c)** nivel de especie. Realizado con la ayuda de Joan Badia Cabré

6.3 Cambios relativos en composición microbiana

En el presente estudio se realizó un análisis diferencial de la abundancia relativa microbiana mediante ANCOMB-BC. Este método proporciona tanto el p-valor como la magnitud del cambio entre dos comparaciones de abundancia relativa en escala logarítmica (LFC), los cuales hemos representado mediante un mapa de calor. En el mapa de calor sólo representamos los taxones a nivel de género que han salido diferencialmente abundantes (p -valor < 0.05) en cualquier

comparación, además de la familia a la que pertenecen (Figura 6). El objetivo principal de este análisis fue investigar las diferencias en la composición relativa de la microbiota entre las dietas, así como evaluar el efecto del IF en ambas dietas. Se ha escogido representar todas las comparaciones juntas para contextualizar los resultados y ver si algunos taxones están cambiados en más de alguna comparación mediante la comparación 1, comparación 2 y comparación 3.

El cálculo del LFC se realiza comparando las abundancias relativas de cada género entre las condiciones de interés como se puede observar en la fórmula 1. Donde X representa la abundancia relativa de un género en una condición específica (por ejemplo, intervención 4) e Y representa la abundancia relativa del mismo género en otra condición (por ejemplo, intervención 1). El resultado del cálculo del LFC es una medida de la proporción del cambio relativo en la abundancia entre las condiciones comparadas.

$$LFC = \log_2\left(\frac{X}{Y}\right)$$

Fórmula 1: Cálculo log fold change

Un LFC positivo indica que la abundancia de un género es mayor en la condición 4 en comparación con la condición 1. Por otro lado, un LFC negativo indica que la abundancia es menor en la condición 4 en comparación con la condición 1.

Antes de entrar en detalle en cada una de las comparaciones, es importante destacar las observaciones generales que se pueden extraer del análisis. En primer lugar, se observaron diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal en la comparación 1. Además, se observó que la intervención fusionada 5 y 6 parece tener un mayor impacto en la comparación 3 en comparación con la intervención fusionada 2 y 3 de la comparación 2, tal y como se observó en los diferentes PCoA.

En la comparación 1 se observó que los géneros de las familias *Atopobiaceae* y *UCG-010* y los géneros *Rombustia*, *Faecalibaculum* y *Enterorhabdus* presentan una disminución significativa en la abundancia relativa de estas familias en los

ratones que se han sometido a la intervención 4 en comparación con los ratones que siguieron la intervención 1. Mientras que se observó un aumento significativo en otras familias como *Muribaculaceae* y *Mitochondia* y en los géneros *Allobaculum*, *Akermansia*, *Anaeroplasma*, *Bifidobacterium* y *Parasutterella* en la intervención 4 en comparación con la intervención 1. Sin embargo, en la familia *Erysipelotrichaceae*, se observó que algunos géneros presentaron un aumento en la abundancia relativa en la intervención 4, mientras que otros mostraron una disminución.

A pesar de no haber tantos cambios significativos en la comparación 2, se identificó un aumento significativo en la abundancia relativa de los géneros *UCG-005*, *Parabacteroides* y *Allobaculum* en los ratones de la intervención fusionada con la 2 y 3 en comparación con la 1. No obstante, se observa una disminución significativa del género *Desulfovibrio* en la intervención fusionada 2 y 3 en comparación con la 1. Por otro lado, en la comparación 3, se observó un aumento significativo en la abundancia relativa de la intervención fusioanda 5 y 6 respecto a la intervención 4 en los géneros *Anaeroplasma*, *Ruminococcus* y *Gastranaerophilales*, entre otros. Y también una disminución significativa en los géneros *Alistipes*, *Anaerotruncus* y *Intestinimonas*, entre otros, en la intervención fusionada 5 y 6 respecto a la intervención 4.

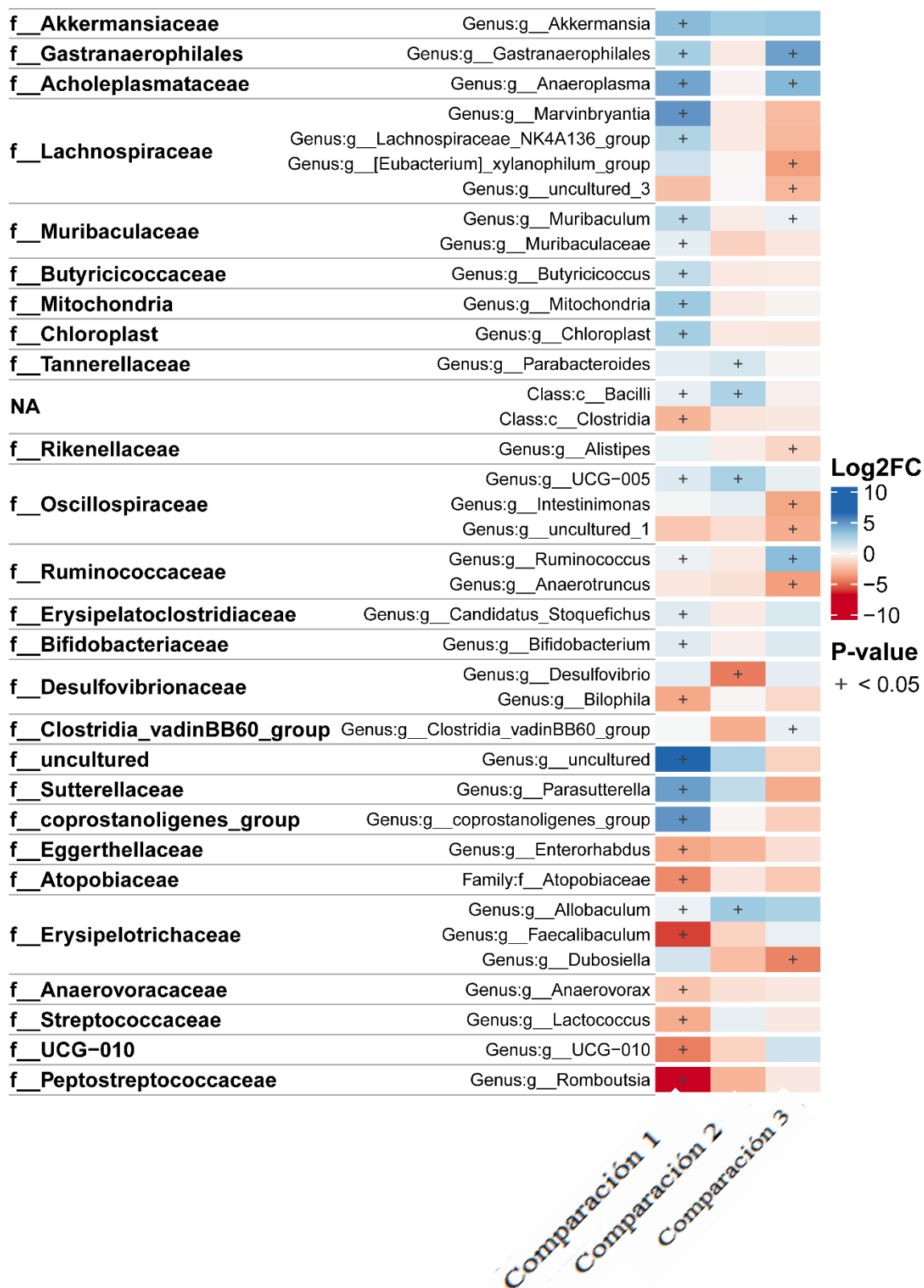


Figura 6: Representación gráfica del log fold change en forma de heatmap, mostrando la comparación de abundancia relativa de géneros agrupados por familias en diferentes intervenciones dietéticas (* $p < 0.05$). Realizado con la ayuda de Joan Badia Cabré.

También se realizó un análisis adicional a nivel de especie, agrupado por familias, utilizando la misma representación de log fold change en forma de heatmap como se puede ver en la Figura 7. Se compararon las mismas condiciones dietéticas. Al igual que en el heatmap anterior, se observan diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal en la comparación 1. No se distinguió ninguna especie que cambie significativamente en todas las dietas.

En la comparación 1, se encontró un aumento significativo en la abundancia relativa de las especies “uncultured” 5 y 14, entre otras, en la intervención 4 en comparación con la 1, mientras que se observó una disminución significativa en las especies “uncultured” 7, 9, 22 y 31, entre otras, en la intervención 4 respecto a la intervención 1.

En la comparación 2 cabe destacar el aumento de la especie *Parabacteroides goldsteinii* y la disminución de las bacterias *Dubosiella newyorkensis* y *Clostridium leptum* en la intervención fusionada 2 y 3 en comparación con la 1.

Finalmente, en la comparación 3, se identificó un aumento significativo en la abundancia de las especies “uncultured” 5 y 6 en la intervención fusionada de 5 y 6 en comparación a la intervención 4, y una disminución significativa en la especie “uncultured” 16 en el grupo fusionado de las intervenciones 5 y 6 respecto al grupo 4.

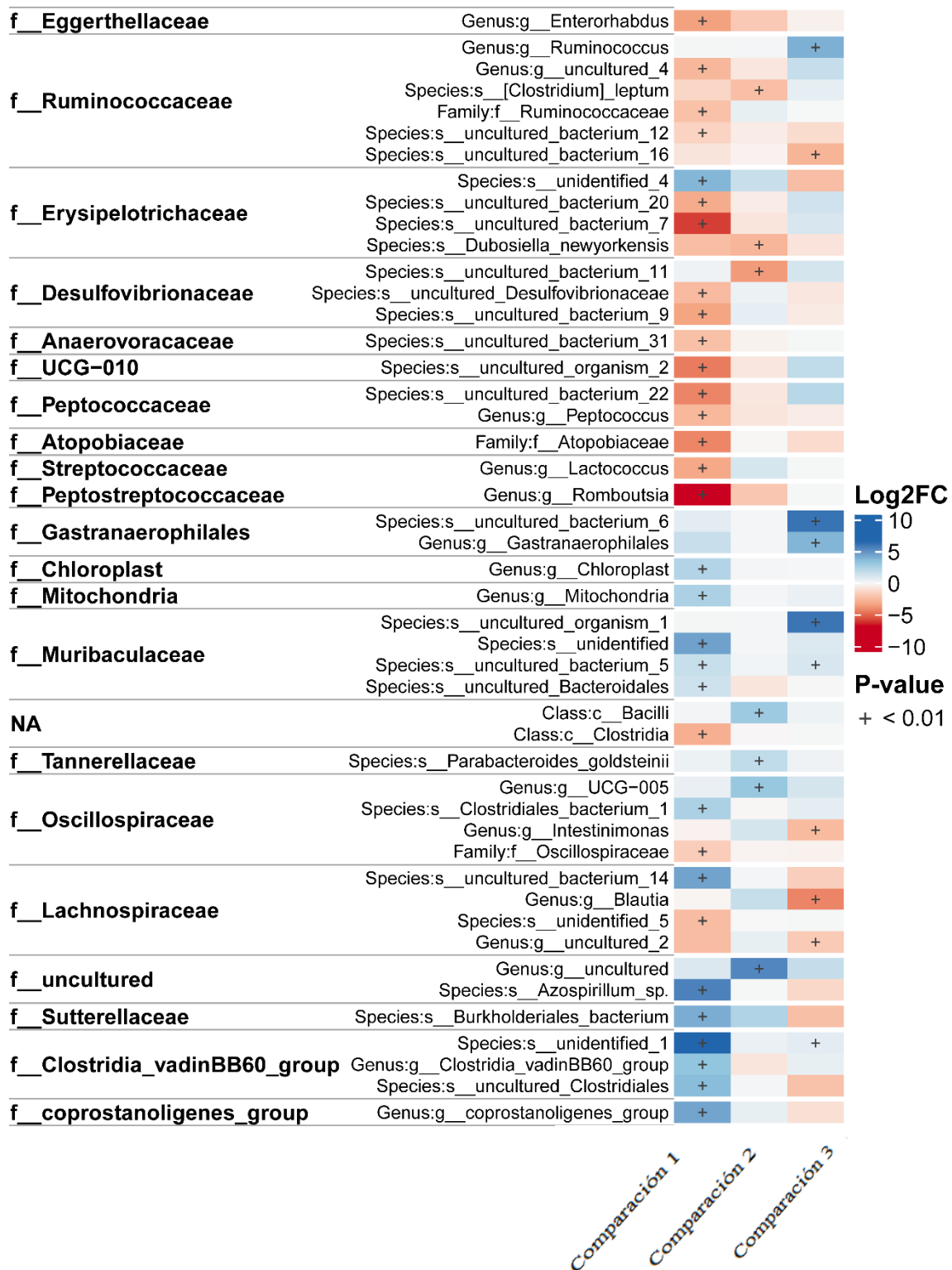


Figura 7: Representación gráfica del log fold change en forma de heatmap, mostrando la comparación de abundancia relativa de especies agrupadas por familias en diferentes intervenciones dietéticas: (*p < 0.05). Realizado con la ayuda de Joan Badia Cabré.

7 Discusión

Hoy en día, la obesidad es uno de los principales problemas de salud. A nivel mundial, se ha estimado que el 15% de las muertes por todas las causas, se deben a un BMI alto. A pesar de los esfuerzos realizados para tratar y prevenir esta condición, su prevalencia continúa en aumento (Riquelme et al., 2021). Ante esta situación, las dietas de CR y el IF pueden ser métodos efectivos para reducir la obesidad y sus complicaciones asociadas. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos efectos beneficiosos aún no se comprenden completamente. En este contexto, se ha estudiado el efecto limitado del IF combinado con HFD o LFD en ratones obesos, siendo escasos los estudios realizados hasta el momento (Gotthardt et al., 2016). Sin embargo, no se ha investigado de forma exhaustiva la comparación de los efectos de diferentes dietas y regímenes de IF en este contexto.

En este proyecto, nos propusimos profundizar en la comprensión de los efectos del IF y la CR en la microbiota intestinal, ya que existe una creciente evidencia de que la composición y función de la microbiota pueden desempeñar un papel crucial en la regulación metabólica y la homeostasis energética. Específicamente, nos centramos en investigar la interacción entre diferentes protocolos de IF y la composición de la dieta en ratones con obesidad inducida por la dieta.

En el marco de este proyecto, iniciado previamente por el grupo DIAMET, se evaluó minuciosamente el impacto de diversas intervenciones dietéticas en el fenotipo del peso corporal de los roedores utilizados en el estudio. Los resultados obtenidos revelaron que la implementación de la intervención 2 y 3 en comparación con la 1, proporcionó una protección significativa contra el aumento de peso. Por otro lado, las intervenciones 4, 5 y 6 se asociaron de manera evidente con una pérdida de peso destacada. Estos hallazgos respaldan la noción de que las intervenciones 4, 5 y 6 se presentan como la estrategia dietética más eficaz para lograr una pérdida de peso significativa en el modelo experimental de ratones con obesidad inducida por la dieta, mientras que las intervenciones 2 y 3 exhiben un efecto protector frente al aumento de peso.

Dentro del mismo proyecto, se encontró que las intervenciones 2 y 3 generaron mejoras metabólicas notables, similares a las obtenidas en las intervenciones 4, 5 y 6, al reducir los niveles basales de glucosa e insulina, los TG plasmáticos y mejorar la sensibilidad a la insulina. A pesar de ello, las intervenciones 2 y 3 también mejoraron la tolerancia a la glucosa y los niveles de colesterol, aunque se observó una mejor respuesta en las intervenciones 4, 5 y 6. En general, las intervenciones 2, 3, 4, 5 y 6, conducen a mejoras metabólicas similares. La capacidad de las intervenciones 2 y 3 para mejorar el metabolismo incluso en presencia de una dieta hipercalórica plantea una observación intrigante.

Nuestro estudio respalda la amplia investigación sobre la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad. Observamos cambios significativos en la composición y estructura de la microbiota en respuesta a las intervenciones dietéticas 2, 3, 4, 5 y 6. Este hecho se ha contrastado en otro estudio (Tekker & Ceylani, 2023), el cual respalda la idea de que la dieta desempeña un papel fundamental en la composición y estructura de la microbiota intestinal, y su modificación a través de intervenciones dietéticas puede tener efectos significativos en la diversidad microbiana.

En el estudio de la variabilidad microbiana de nuestro proyecto, se observaron patrones distintos en la riqueza microbiana en respuesta a las diferentes intervenciones dietéticas. Las intervenciones 4, 5 y 6 tenían una tendencia hacia valores más altos del índice de Shannon en comparación con las intervenciones 1, 2 y 3. Esto indica que los tratamientos 4, 5 y 6 pueden presentar una mayor diversidad microbiana en comparación con los tratamientos 1, 2 y 3. Este hecho es contrastado por varios estudios en los que se asocian las intervenciones 4, 5 y 6 con valores más altos del índice de Shannon, lo que indica una mayor diversidad microbiana en comparación con las intervenciones 1, 2 y 3 (Kern et al., 2023).

Asimismo, gracias al análisis de PCoA con Bray-Curtis a nivel de familia, género y especie, se observó una clara separación entre los grupos 4, 5 y 6 y los grupos 1, 2 y 3. Esta separación se mantuvo consistente en los niveles taxonómicos de familia, género y especie, lo que indica que la composición de la microbiota intestinal difiere significativamente entre estas intervenciones.

En este contexto, en las intervenciones 4, 5 y 6, se observó una mayor separación entre los grupos 5 y 6 en comparación con el 4. Estos hallazgos sugieren que las intervenciones 5 y 6 tienen un efecto aditivo en la modulación de la microbiota intestinal, lo que resulta en una composición microbiana aún más distinta entre los grupos. Sin embargo, es importante destacar que se observan efectos más pronunciados en la intervención 5, la cual muestra una mayor separación con respecto a la intervención 4, mientras que el grupo 6 se asemeja más al grupo 4. En el caso de los grupos 1, 2 y 3, se encontró una separación menos pronunciada entre el grupo 1 y los grupos 2 y 3 a nivel de familia, género y especie. Esto indica que las intervenciones 2 y 3 en los grupos tuvieron un impacto relativamente menor en la composición de la microbiota. Estos hechos sugieren que las diferentes intervenciones alteran la microbiota de manera dependiente al tipo de dieta y al tipo de IF.

Los hallazgos obtenidos, respaldan la evidencia existente de que la composición de la microbiota intestinal está asociada con la obesidad y sugieren que las intervenciones dietéticas 2, 3, 4, 5 y 6, pueden influir en la composición de la microbiota intestinal (Pinto et al., 2022; von Schwartzberg et al., 2021). Estos cambios en la microbiota podrían desempeñar un papel en los efectos beneficiosos observados en la regulación del metabolismo y la prevención de la obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas. Sin embargo, se requiere una mayor investigación para comprender los mecanismos subyacentes y aprovechar las estrategias de modificación de la microbiota intestinal como enfoques terapéuticos para abordar la obesidad y sus complicaciones.

Por otro lado, en este proyecto se decidió las intervenciones 2 y 3 y las intervenciones 5 y 6 para el análisis del log fold change mediante heatmap debido a la falta de diferencias significativas en los perfiles metabólicos y lipídicos entre ellos. Con ello, queremos comprobar que los cambios en la mejora metabólica podrían ser por cambios en la microbiota. Sin embargo, al analizar el PCoA, se observó una mayor separación entre los grupos de 2, 3, 4, 5 y 6, especialmente en el caso del protocolo 5. Dada esta observación y a que no se han reportado estudios previos que comparen específicamente los efectos de estas intervenciones, sería interesante realizar análisis adicionales en futuros

estudios para profundizar en el efecto de los diferentes intervenciones mencionadas en la microbiota intestinal.

Al realizar este último análisis, se observaron diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal, específicamente en la 1. Estas diferencias respaldan la noción de que la diferencia entre la intervención 1 y la 4 ejerce un impacto notable en la composición de la microbiota intestinal, lo cual está en línea con los conocimientos existentes (S. Wang et al., 2018). Sin embargo, también se observó un mayor impacto en la composición de la microbiota en los grupos de la comparación 3 en comparación con aquellos de la 2. Esta diferencia también se evidenció en los análisis de PCoA, donde se observó una mayor separación entre las intervenciones 5 y 6 en comparación con las intervenciones 2 y 3. No obstante, no se tiene mucha información sobre el papel que juega en la composición de la microbiota intestinal la combinación las intervenciones 2, 3, 4, 5 y 6, siendo prácticamente inexistente la bibliografía sobre este tema.

Entrando en detalle en los resultados obtenidos por el mapa de calor del LFC, se evidenció una disminución significativa en la comparación 1 (mayor abundancia en intervención 1 que en la 4) en la familia *UCG-010*. Estos hallazgos son respaldados por estudios recientes (Senior et al., 2021) que han reportado resultados similares. En relación a los géneros, se observó un incremento significativo en la abundancia del género *Allobaculum* durante la intervención fusionada 2 y 3 respecto a la 1, mientras que se observó una disminución del género *Desulfovibrio* en la misma intervención. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en modelos similares, que también informaron conclusiones parecidas (Beli et al., 2018; Fontana & Partridge, 2015). Además, se ha demostrado en estudios previos (Zhang et al., 2015) que el género *Allobaculum* puede contribuir al alivio de la inflamación, la resistencia a la insulina y la obesidad al reducir las endotoxinas intestinales en la sangre. Por otro lado, la abundancia del género *Ruminococcus* aumentó en la intervención fusionada 5 y 6 respecto al grupo 4, en concordancia con estudios previos (J. Liu et al., 2021).

A nivel de especie destacan *Dubosiella newyorkensis* y *Parabacteroides golsteinii*. En nuestro estudio se ha detectado una disminución de la especie *Dubosiella newyorkensis* en los ratones sometidos a las intervenciones 2 y 3. Sin embargo, es importante destacar que tanto en la comparación 1 como 3, también se observa una disminución, aunque no significativa. Este hallazgo es contrario a un estudio (T. H. Liu et al., 2023) que sugiere que *Dubosiella newyorkensis* puede tener efectos positivos en la salud. En este estudio se ha investigado que esta especie puede mejorar el estrés oxidativo, promover la función endotelial y modular la composición de la microbiota intestinal, aumentando la abundancia de géneros beneficiosos. Otra especie identificada con cambios significativos es *Parabacteroides golsteinii*. Se observa un aumento de la abundancia en todas las dietas, aunque solo significativo en la intervención fusionada 2 y 3. Estos resultados van en concordancia con estudios previos ya que, se ha demostrado (Wu et al., 2019) que la especie *Parabacteroides golsteinii* previene el aumento de peso corporal, mejora la integridad intestinal y reduce la inflamación y la resistencia a la insulina.

8 Conclusión

- Las intervenciones 2 y 3 muestran un efecto protector contra el aumento de peso, mientras que las intervenciones 4, 5 y 6 resultan en una pérdida de peso significativa.
- Las intervenciones 2, 3, 4, 5 y 6 generan mejoras metabólicas notables, incluyendo la reducción de los niveles de glucosa e insulina, triglicéridos plasmáticos y mejora de la sensibilidad a la insulina.
- Las intervenciones 4, 5 y 6 presentan una tendencia hacia un mayor índice de Shannon, lo que indica una mayor diversidad bacteriana. En cambio, las intervenciones 2 y 3 no parecen tener efecto sobre la diversidad.
- Las intervenciones 2, 3, 4, 5 y 6 producen cambios en la composición de la microbiota.
- Las intervenciones 2, 3, 4, 5 y 6 alteran de manera diferente la microbiota, en función del tipo de IF usado y del tipo de dieta.
- Las intervenciones 2, 3, 4, 5 y 6 producen cambios en la abundancia relativa. Siendo mayor en la intervención 4.

Este estudio revela que las intervenciones 2, 3, 4, 5 y 6 tienen efectos distintos en la microbiota intestinal. Además, se observa que el impacto del IF varía según el tipo de ayuno y la dieta utilizada. Estos hallazgos resaltan la importancia de continuar investigando la relación entre las mejoras metabólicas y la microbiota intestinal, con el objetivo de desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces para promover la salud y prevenir enfermedades, como la obesidad.

9 Bibliografía

- Anwar, H., Iftikhar, A., Muzaffar, H., Almatroudi, A., Allemailem, K. S., Navaid, S., Saleem, S., & Khurshid, M. (2021). Biodiversity of Gut Microbiota: Impact of Various Host and Environmental Factors. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5575245>
- Bagherniya, M., Butler, A. E., Barreto, G. E., & Sahebkar, A. (2018). The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Research Reviews*, 47, 183–197. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2018.08.004>
- Beli, E., Yan, Y., Moldovan, L., Vieira, C. P., Gao, R., Duan, Y., Prasad, R., Bhatwadekar, A., White, F. A., Townsend, S. D., Chan, L., Ryan, C. N., Morton, D., Moldovan, E. G., Chu, F. I., Oudit, G. Y., Derendorf, H., Adorini, L., Wang, X. X., ... Grant, M. B. (2018). Restructuring of the Gut Microbiome by Intermittent Fasting Prevents Retinopathy and Prolongs Survival in db/db Mice. *Diabetes*, 67(9), 1867–1879. <https://doi.org/10.2337/DB18-0158>
- Boutant, M., Kulkarni, S. S., Joffraud, M., Raymond, F., Métairon, S., Descombes, P., & Cantó, C. (2016). SIRT1 Gain of Function Does Not Mimic or Enhance the Adaptations to Intermittent Fasting. *Cell Reports*, 14(9), 2068–2075. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.02.007>
- Bray, G. A., Heisel, W. E., Afshin, A., Jensen, M. D., Dietz, W. H., Long, M., Kushner, R. F., Daniels, S. R., Wadden, T. A., Tsai, A. G., Hu, F. B., Jakicic, J. M., Ryan, D. H., Wolfe, B. M., & Inge, T. H. (2018). The Science of Obesity Management: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 39(2), 79–132. <https://doi.org/10.1210/ER.2017-00253>
- Cao, S. Y., Zhao, C. N., Xu, X. Y., Tang, G. Y., Corke, H., Gan, R. Y., & Li, H. Bin. (2019). Dietary plants, gut microbiota, and obesity: Effects and mechanisms. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 194–204. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.08.004>
- Cappellato, M., Baruzzo, G., & Camillo, B. Di. (2022). Investigating differential abundance methods in microbiome data: A benchmark study. *PLoS Computational Biology*, 18(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1010467>
- Cardona, S., Eck, A., Cassellas, M., Gallart, M., Alastrue, C., Dore, J., Azpiroz, F., Roca, J., Guarner, F., & Manichanh, C. (2012). Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiology*, 12, 158. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-158>
- Clin, N., Walter Suárez-Carmona, M., Jesús Sánchez-Oliver, A., Suárez-Carmona, W., Antonio, C., & Sánchez-Oliver, J. (2018). Relación con la fuerza y la actividad física > > AbstRAct. *Nutr Clin Med*, XII(3), 128–139. <https://doi.org/10.7400/NCM.2018.12.3.5067>
- Cornejo-Pareja, I., Muñoz-Garach, A., Clemente-Postigo, M., & Tinahones, F. J. (2018). Importance of gut microbiota in obesity. *European Journal of Clinical Nutrition* 2018 72:1, 72(1), 26–37. <https://doi.org/10.1038/S41430-018-0306-8>
- Deng, Y., Liu, W., Wang, J., Yu, J., & Yang, L. Q. (2020). Intermittent Fasting Improves Lipid Metabolism Through Changes in Gut Microbiota in Diet-Induced Obese

Mice. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e926789-1. <https://doi.org/10.12659/MSM.926789>

- Diamant, M., Blaak, E. E., & de Vos, W. M. (2011). Do nutrient–gut–microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity Reviews*, 12(4), 272–281. <https://doi.org/10.1111/J.1467-789X.2010.00797.X>
- Fernández, N. K. (n.d.). *Caracterización del papel del succinato y su receptor SUCNR1 en la fisiopatología de la obesidad y la diabetes de tipo 2*.
- Fontana, L., & Partridge, L. (2015). Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*, 161(1), 106–118. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.02.020>
- Gabel, K., Kroeger, C. M., Trepanowski, J. F., Hoddy, K. K., Cienfuegos, S., Kalam, F., & Varady, K. A. (2019). Differential Effects of Alternate-Day Fasting Versus Daily Calorie Restriction on Insulin Resistance. *Obesity*, 27(9), 1443–1450. <https://doi.org/10.1002/OBY.22564>
- Gao, X., Jia, R., Xie, L., Kuang, L., Feng, L., & Wan, C. (2018). A study of the correlation between obesity and intestinal flora in school-age children. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32730-6>
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 2224. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02224/FULL>
- Gotthardt, J. D., Verpeut, J. L., Yeomans, B. L., Yang, J. A., Yasrebi, A., Roepke, T. A., & Bello, N. T. (2016). Intermittent Fasting Promotes Fat Loss With Lean Mass Retention, Increased Hypothalamic Norepinephrine Content, and Increased Neuropeptide Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. *Endocrinology*, 157(2), 679–691. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1622>
- Henderson, C. G., Turner, D. L., & Swoap, S. J. (2021). Health Effects of Alternate Day Fasting Versus Pair-Fed Caloric Restriction in Diet-Induced Obese C57Bl/6J Male Mice. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.641532/FULL>
- Huber-Ruano, I., Calvo, E., Mayneris-Perxachs, J., Rodríguez-Peña, M. M., Ceperuelo-Mallafré, V., Cedó, L., Núñez-Roa, C., Miro-Blanch, J., Amoriaga-Rodríguez, M., Balvay, A., Maudet, C., García-Roves, P., Yanes, O., Rabot, S., Grimaud, G. M., De Prisco, A., Amoroso, A., Fernández-Real, J. M., Vendrell, J., & Fernández-Veledo, S. (2022). Orally administered *Odoribacter laneus* improves glucose control and inflammatory profile in obese mice by depleting circulating succinate. *Microbiome*, 10(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S40168-022-01306-Y/FIGURES/7>
- Joslin, P. M. N., Bell, R. K., & Swoap, S. J. (2017). Obese mice on a high-fat alternate-day fasting regimen lose weight and improve glucose tolerance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(5), 1036–1045. <https://doi.org/10.1111/JPN.12546>

- Kern, L., Kviatcovsky, D., He, Y., & Elinav, E. (2023). Impact of caloric restriction on the gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 73, 102287. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2023.102287>
- Kim, K. H., Kim, Y. H., Son, J. E., Lee, J. H., Kim, S., Choe, M. S., Moon, J. H., Zhong, J., Fu, K., Lenglin, F., Yoo, J. A., Bilan, P. J., Klip, A., Nagy, A., Kim, J. R., Park, J. G., Hussein, S. M. I., Doh, K. O., Hui, C. C., & Sung, H. K. (2017). Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Research*, 27(11), 1309–1326. <https://doi.org/10.1038/CR.2017.126>
- Kim, Y. H., Lee, J. H., Yeung, J. L. H., Das, E., Kim, R. Y., Jiang, Y., Moon, J. H., Jeong, H., Thakkar, N., Son, J. E., Trzaskalski, N., Hui, C. chung, Doh, K. O., Mulvihill, E. E., Kim, J. R., Kim, K. H., & Sung, H. K. (2019). Thermogenesis-independent metabolic benefits conferred by isocaloric intermittent fasting in ob/ob mice. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-39380-2>
- Lavie, C. J., Laddu, D., Arena, R., Ortega, F. B., Alpert, M. A., & Kushner, R. F. (2018). Healthy Weight and Obesity Prevention: JACC Health Promotion Series. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(13), 1506–1531. https://doi.org/10.1016/J.JACC.2018.08.1037/SUPPL_FILE/MMC1.DOCX
- Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R. G., Tian, Y., Li, L., Patel, D., Ma, Y., Brocker, C. N., Yan, T., Krausz, K. W., Xiang, R., Gavrilova, O., Patterson, A. D., & Gonzalez, F. J. (2017). Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metabolism*, 26(4), 672-685.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.08.019>
- Li, L., Su, Y., Li, F., Wang, Y., Ma, Z., Li, Z., & Su, J. (2020). The effects of daily fasting hours on shaping gut microbiota in mice. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-020-01754-2/FIGURES/3>
- Lin, X., & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.706978>
- Liu, J., Zhong, Y., Luo, X. M., Ma, Y., Liu, J., & Wang, H. (2021). Intermittent Fasting Reshapes the Gut Microbiota and Metabolome and Reduces Weight Gain More Effectively Than Melatonin in Mice. *Frontiers in Nutrition*, 8, 1002. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.784681/BIBTEX>
- Liu, T. H., Wang, J., Zhang, C. Y., Zhao, L., Sheng, Y. Y., Tao, G. S., & Xue, Y. Z. (2023). Gut microbial characteristic comparison reveals potential anti-aging function of *Dubosiella newyorkensis* in mice. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 94. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1133167/BIBTEX>
- Margină, D., Ungurianu, A., Purdel, C., Tsoukalas, D., Sarandi, E., Thanasoula, M., Tekos, F., Mesnage, R., Kouretas, D., & Tsatsakis, A. (2020). Chronic Inflammation in the Context of Everyday Life: Dietary Changes as Mitigating Factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 4135, 17(11), 4135. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17114135>
- Marlatt, K. L., & Ravussin, E. (2017). Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Current Obesity Reports*, 6(4), 389–396. <https://doi.org/10.1007/S13679-017-0283-6>

- Oliveira, L. da C., Morais, G. P., Ropelle, E. R., de Moura, L. P., Cintra, D. E., Pauli, J. R., de Freitas, E. C., Rorato, R., & da Silva, A. S. R. (2022). Using Intermittent Fasting as a Non-pharmacological Strategy to Alleviate Obesity-Induced Hypothalamic Molecular Pathway Disruption. *Frontiers in Nutrition*, 9, 458. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.858320/BIBTEX>
- Patterson, E. E., Ryan, P. M., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Paul Ross, R., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. E. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal*, 92(1087), 286–300. <https://doi.org/10.1136/POSTGRADMEDJ-2015-133285>
- Pinto, F. C. S., Silva, A. A. M., & Souza, S. L. (2022). Repercussions of intermittent fasting on the intestinal microbiota community and body composition: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 80(3), 613–628. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUAB108>
- Purnell, J. Q. (2018). Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279167/>
- Queipo-Ortuño, M. I., Seoane, L. M., Murri, M., Pardo, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Cardona, F., Casanueva, F., & Tinahones, F. J. (2013). Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. *PLOS ONE*, 8(5), e65465. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0065465>
- Quinn, T. P., Erb, I., Gloor, G., Notredame, C., Richardson, M. F., & Crowley, T. M. (2019). A field guide for the compositional analysis of any-omics data. *GigaScience*, 8(9), 1–14. <https://doi.org/10.1093/GIGASCIENCE/GIZ107>
- Riquelme, R., Rezende, L. F. M., Guzmán-Habinger, J., Chávez, J. L., Celis-Morales, C., Ferreccio, C., & Ferrari, G. (2021). Non-communicable diseases deaths attributable to high body mass index in Chile. *Scientific Reports*, 11(1), 15500. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-94974-Z>
- Roswell, M., Dushoff, J., & Winfree, R. (2021). A conceptual guide to measuring species diversity. *Oikos*, 130(3), 321–338. <https://doi.org/10.1111/OIK.07202>
- Santiago, A., Panda, S., Mengels, G., Martinez, X., Azpiroz, F., Dore, J., Guarner, F., & Manichanh, C. (2014). Processing faecal samples: a step forward for standards in microbial community analysis. *BMC Microbiology*, 14(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-112>
- Sbierski-Kind, J., Grenkowitz, S., Schlickeiser, S., Sandforth, A., Friedrich, M., Kunkel, D., Glaubens, R., Brachs, S., Mai, K., Thürmer, A., Radonić, A., Drechsel, O., Turnbaugh, P. J., Bisanz, J. E., Volk, H. D., Spranger, J., & von Schwanberg, R. J. (2022). Effects of caloric restriction on the gut microbiome are linked with immune senescence. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-022-01249-4>
- Senchukova, M. A. (2023). Microbiota of the gastrointestinal tract: Friend or foe? *World Journal of Gastroenterology*, 29(1), 19. <https://doi.org/10.3748/WJG.V29.I1.19>
- Senior, T. M., Thesis, H., Hursting, S. D., Carroll, I., & Mcfarlane, T. (2021). *Metaboendocrine, Inflammatory, and Bacterial Correlates of Tumor Growth*

Following Caloric Restriction and Vertical Sleeve Gastrectomy in a Murine Model of Breast Cancer.

- Song, D.-K., & Kim, Y.-W. (2023). Beneficial effects of intermittent fasting: a narrative review. *Journal of Yeungnam Medical Science*, 40(1), 4. <https://doi.org/10.12701/JYMS.2022.00010>
- Tanca, A., Abbondio, M., Palomba, A., Fraumene, C., Marongiu, F., Serra, M., Pagnozzi, D., Laconi, E., & Uzzau, S. (2018). Caloric restriction promotes functional changes involving short-chain fatty acid biosynthesis in the rat gut microbiota. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33100-y>
- Teker, H. T., & Ceylani, T. (2023). Intermittent fasting supports the balance of the gut microbiota composition. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 26(1), 51–57. <https://doi.org/10.1007/S10123-022-00272-7>
- von Schwartzberg, R. J., Bisanz, J. E., Lyalina, S., Spanogiannopoulos, P., Ang, Q. Y., Cai, J., Dickmann, S., Friedrich, M., Liu, S. Y., Collins, S. L., Ingebrigtsen, D., Miller, S., Turnbaugh, J. A., Patterson, A. D., Pollard, K. S., Mai, K., Spranger, J., & Turnbaugh, P. J. (2021). Caloric restriction disrupts the microbiota and colonization resistance. *Nature* 2021 595:7866, 595(7866), 272–277. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03663-4>
- Wagner, B. D., Grunwald, G. K., Zerbe, G. O., Mikulich-Gilbertson, S. K., Robertson, C. E., Zemanick, E. T., & Harris, J. K. (2018). On the use of diversity measures in longitudinal sequencing studies of microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1037. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01037/BIBTEX>
- Wan, R., Camandola, S., & Mattson, M. P. (2003). Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *The Journal of Nutrition*, 133(6), 1921–1929. <https://doi.org/10.1093/JN/133.6.1921>
- Wang, B., Kong, Q., Cui, S., Li, X., Gu, Z., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., & Wang, G. (2021). Bifidobacterium adolescentis Isolated from Different Hosts Modifies the Intestinal Microbiota and Displays Differential Metabolic and Immunomodulatory Properties in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*, 13(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/NU13031017>
- Wang, S., Huang, M., You, X., Zhao, J., Chen, L., Wang, L., Luo, Y., & Chen, Y. (2018). Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31353-1>
- Wu, T. R., Lin, C. S., Chang, C. J., Lin, T. L., Martel, J., Ko, Y. F., Ojcius, D. M., Lu, C. C., Young, J. D., & Lai, H. C. (2019). Gut commensal Parabacteroides goldsteinii plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from Hirsutella sinensis. *Gut*, 68(2), 248–262. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2017-315458>
- Xu, Y., Wang, N., Tan, H. Y., Li, S., Zhang, C., & Feng, Y. (2020). Function of Akkermansia muciniphila in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Frontiers in Microbiology*, 11, 219. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00219>

Zhang, X., Zhao, Y., Xu, J., Xue, Z., Zhang, M., Pang, X., Zhang, X., & Zhao, L. (2015). Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep14405>

10 Autoevaluación

En primer lugar, cuando se aborda un proyecto de investigación, es fundamental tener claras las expectativas que se tienen respecto al mismo. En este sentido, en el desarrollo del proyecto de investigación sobre la microbiota intestinal de ratones obesos, se plantearon diversas expectativas que se esperaba alcanzar al finalizar el proyecto.

Entre las principales expectativas se encontraba la identificación de posibles diferencias significativas en la abundancia relativa de la microbiota intestinal de ratones obesos al aplicar diferentes protocolos dietéticos. Asimismo, se esperaba obtener una comprensión más detallada sobre la complejidad de la microbiota intestinal y su posible relación con la obesidad.

Otra expectativa era poder evaluar la utilidad de la librería ANCOMBC para el análisis de datos de microbiota, y su comparación con otros métodos de análisis de datos similares. También se buscaba obtener una visión más amplia sobre las técnicas de visualización de datos, con el fin de poder representar la información obtenida de forma clara y concisa.

Además de las expectativas relacionadas con los resultados del proyecto, también se tenían en cuenta las expectativas personales del investigador. En este sentido, se esperaba adquirir un conocimiento más profundo en el ámbito de la microbiota intestinal y su relación con la salud, así como mejorar las habilidades en el manejo de herramientas y técnicas de análisis de datos.

En cuanto a los aprendizajes adquiridos durante la realización del trabajo, puedo decir que ha sido una experiencia muy enriquecedora en varios aspectos. En primer lugar, he aprendido a trabajar con la librería ANCOMBC en R, lo cual ha sido una experiencia muy valiosa, ya que me ha permitido adquirir habilidades en el análisis de datos microbiológicos complejos.

Además, he mejorado mi capacidad para interpretar resultados estadísticos complejos, lo que me ha permitido comprender mejor los conceptos teóricos que subyacen a la investigación de la microbiota intestinal. Aprendiendo a realizar diferentes tipos de gráficos y visualizaciones para representar los datos de

manera clara y comprensible. Esto ha sido muy importante para poder comunicar los resultados de forma efectiva en la memoria final.

Por otro lado, también he aprendido sobre el proceso de investigación científica, desde la formulación de la hipótesis hasta la interpretación de los resultados. He adquirido conocimientos sobre la literatura científica relacionada con el tema de estudio y sobre cómo realizar una revisión sistemática de la misma.

Asimismo, también he aprendido a trabajar en equipo de manera efectiva, ya que este trabajo ha requerido la colaboración de varios miembros del equipo. Esto ha implicado la comunicación constante para compartir avances y resolver problemas juntos, lo cual ha sido una experiencia muy valiosa para el desarrollo de habilidades interpersonales y de trabajo en equipo.

También he adquirido una mayor capacidad de organización y planificación del trabajo, lo que me ha permitido gestionar el proyecto de manera más eficiente y obtener mejores resultados.

En conclusión, este proyecto me ha permitido adquirir valiosos conocimientos técnicos en el análisis de datos microbiológicos y estadísticos utilizando herramientas como R y la librería ANCOMBC. Además, he desarrollado habilidades en la elaboración de gráficos y visualizaciones para presentar de manera clara y efectiva los resultados obtenidos.

Asimismo, la realización de este trabajo ha supuesto un importante reto personal, ya que he tenido que enfrentarme a la planificación y ejecución de un proyecto de investigación de gran complejidad. A lo largo del proceso he aprendido a manejar situaciones de incertidumbre y a tomar decisiones en momentos críticos, lo que ha fortalecido mi capacidad de resolución de problemas y liderazgo en el trabajo en equipo.

En definitiva, este proyecto ha sido una experiencia altamente enriquecedora, que me ha permitido desarrollar tanto habilidades técnicas como personales que sin duda me serán de gran utilidad en mi futuro profesional.