Universidad de Oviedo

Biomedicina y Oncología Molecular

Modulación de procesos inflamatorios y neoplásicos en colon mediante alimentos funcionales en modelos animales murinos

TESIS DOCTORAL

Javier Fernández Fernández

24 de mayo de 2018

Universidad de Oviedo

Tesis Doctoral

Modulación de procesos inflamatorios y neoplásicos en colon mediante alimentos funcionales en modelos animales murinos

Javier Fernández Fernández **Felipe Lombó Brugos** **Mª del Carmen Rodríguez Sánchez**
Claudio Jesús Villar Granja

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Modulación de procesos inflamatorios y neoplásicos en colon mediante alimentos funcionales en modelos animales murinos	Inglés: Modulation of colon inflammatory and neoplastic processes by functional foods in murine models

2.- Autor	
1. Nombre: Javier Fernández Fernández	DNI/Pasaporte/NIE
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias	

RESUMEN (en español)

Las enfermedades intestinales de origen inflamatorio y/o neoplásico están aumentando entre la población occidental debido a varios factores de riesgo en el estilo de vida de estas regiones, como el sedentarismo, estrés, mala alimentación (consumo de carnes rojas o procesadas), etc. Entre estas enfermedades destacan la colitis ulcerosa (CU) y el cáncer colorrectal (CCR).

En los países occidentales, la CU se ha incrementado un 60% en las últimas décadas. Esta enfermedad muestra periodos de brotes, caracterizados por síntomas como diarrea, sangrado, anemia, tenesmo, dolor abdominal y otras manifestaciones genéricas.

En Europa, el CCR es el segundo carcinoma en incidencia y mortalidad, con una supervivencia media de un 56,2%, dependiendo del estadio en el que se detecte la enfermedad. Esta enfermedad está causada por factores que se van acumulando, como mutaciones genéticas o alteraciones epigenéticas, que acaban alterando la regulación y diferenciación normal de un colonocito.

El uso de alimentos que contienen compuestos nutracéuticos puede permitir prevenir este tipo de enfermedades. Así, por ejemplo, alimentos ricos en ácidos grasos monoinsaturados (como el ácido oleico) y poliinsaturados (como los omega-3) activan mecanismos antiinflamatorios en la mucosa del colon, reduciendo los efectos de la CU. Por otro lado, la adición de prebióticos (como la inulina) permite modular la microbiota intestinal, produciéndose compuestos antitumorales (ácidos grasos de cadena corta) tras su fermentación por parte de la microbiota intestinal, especialmente en el colon, que ejercen de potentes agentes proapoptóticos en colonocitos tumorales.

Además, el consumo de flavonoides (como las antocianinas presentes en los frutos rojos) también permite aumentar los niveles de antioxidantes en esta mucosa del colon, ofreciendo una protección adicional frente a daños genéticos y frente al CCR.

Los objetivos principales de esta tesis son el estudio y la prevención de las enfermedades intestinales de carácter inflamatorio, en concreto CU y CCR, mediante el uso de alimentos funcionales por la adición de diversos nutracéuticos. Para realizar este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudio de alimentos cárnicos funcionales enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados para la prevención de CU en un modelo animal.

FOR-MAT-VOA-010-BIS-2

2. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con antocianinas para la prevención de CCR en un modelo animal.
3. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con prebióticos derivados de lactulosa para la prevención de CCR en un modelo animal.
4. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo animal de CCR inducido químicamente y otro de origen genético.

En cuanto a los resultados de esta tesis doctoral, se ha comprobado que el uso de jamón ibérico de bellota con alto contenido en ácido oleico produce una reducción estadísticamente significativa en los daños en la mucosa del colon inducidos por CU en un modelo animal que utiliza DSS, asociada a unos menores niveles circulantes de interleucinas proinflamatorias, menores niveles de mieloperoxidasa en la mucosa del colon, mejores parámetros histológicos en la mucosa del colon, y a cambios beneficiosos en la microbiota intestinal.

Por otro lado, el uso de alimentos funcionales con nutracéuticos añadidos en su composición permitió prevenir el desarrollo del CCR en varios modelos animales. En este caso, diversos efectos se produjeron por el aumento de la capacidad antioxidante debido a la presencia de antocianinas (en salchichas funcionales) o a la producción de ácidos grasos de cadena corta (propionato y butirato principalmente) tras la fermentación de los prebióticos inulina (en chorizo y jamón cocido funcionales) y GOS-Lu (disuelto en el agua de bebida). Estos ácidos grasos de cadena corta producen una inhibición de las histonas deacetilasas, induciendo apoptosis en los colonocitos tumorales.

En estos modelos animales se ha visto una modulación de la microbiota intestinal por parte de todos estos alimentos funcionales, aumentando la proporción de diversos taxones bacterianos que son capaces de fermentar fibras prebióticas, y reduciéndose ciertos taxones con capacidad proinflamatoria (como por ejemplo el género *Desulfovibrio*). Por tanto, la adición de nutracéuticos promueve una microbiota intestinal más saludable y los metabolitos derivados de su actividad, como los ácidos grasos de cadena corta, son capaces de prevenir y reducir el desarrollo de estas enfermedades intestinales.

En definitiva, el uso de alimentos cárnicos funcionales puede ser una alternativa saludable en países donde el consumo de estos es elevado, pudiendo ayudar a prevenir enfermedades intestinales de origen inflamatorio y CCR.

RESUMEN (en Inglés)

Intestinal diseases with inflammatory and/or neoplastic origin are increasing among the Western populations, due to several risks factors associated to the lifestyle in these regions, such as sedentary lifestyle, stress, unhealthy diet (consumption of red or processed meats), etc. These diseases include ulcerative colitis (UC) and colorectal cancer (CRC).

In Western countries, UC has increased by 60% during last decades. This disease shows periods of outbreaks, characterized by symptoms such as diarrhea, bleeding, anemia, tenesmus, abdominal pain and other generic manifestations.

In Europe, the CCR is the second carcinoma in incidence and mortality, with an average survival of 56.2%, depending on the stage in which the disease is detected. This disease is caused by factors that accumulate along time, such as genetic mutations or epigenetic

alterations, which end up altering the regulation and normal differentiation of a colonocyte.

The use of foods that contain nutraceutical compounds can make it possible to prevent this type of disease. Thus, for example, foods rich in monounsaturated fatty acids (such as oleic acid) and polyunsaturated fatty acids (such as omega-3) activate anti-inflammatory mechanisms in the colon mucosa, reducing the effects of UC.

On the other hand, the addition of prebiotics (such as inulin) allows modulating the intestinal microbiota, producing antitumor compounds (such as short chain fatty acids) after their fermentation by the intestinal microbiota, especially in the colon. These short chain fatty acids exert a powerful proapoptotic activity in tumor colonocytes.

In addition, the consumption of flavonoids (such as the anthocyanins present in berries) also allows to increase the levels of antioxidants in the colon mucosa, offering additional protection against genetic damage and therefore against CRC.

The main objectives of this thesis are the study and prevention of intestinal diseases with inflammatory or neoplastic origin, specifically CU and CRC, through the use of functional foods through the addition of diverse nutraceuticals. To carry out this study, the following objectives were set:

1. Study of functional meat foods enriched with monounsaturated fatty acids for the prevention of UC in an animal model.
2. Study of functional meat foods with anthocyanins for the prevention of CRC in an animal model.
3. Study of functional meat foods with lactulose-derived prebiotics for the prevention of CRC in an animal model.
4. Study of functional meat foods with inulin for the prevention of CRC in two animal models for CRC, one chemically induced and another one of genetic origin.

Regarding the results of this PhD thesis, it has been proven that the use of Iberian acorn-fed ham with high oleic acid content produces a statistically significant reduction in damage to the colon mucosa induced by UC in an animal model that uses DSS. This protection is associated with lower circulating levels of proinflammatory interleukins, lower levels of myeloperoxidase in the colon mucosa, better histological parameters in the colon mucosa, and beneficial changes in the intestinal microbiota.

On the other hand, the use of functional foods with added nutraceuticals in their composition allowed to prevent the development of the CCR in several animal models. In this case, various effects were produced by the increase in antioxidant capacity due to the presence of anthocyanins (in functional sausages) or the production of short chain fatty acids (mainly propionate and butyrate) after the fermentation of the prebiotic inulin (in chorizo and cooked ham) and GOS-Lu (dissolved in drinking water). These short chain fatty acids produce an inhibition of the histone deacetylases, inducing apoptosis in the tumor colonocytes.

In these animal models, a modulation of the gut microbiota by all these functional foods has been seen, increasing the proportion of various bacterial taxa that are able to carry out the fermentation of prebiotic fibers, and reducing certain taxa with proinflammatory capacity (as for example the genus *Desulfovibrio*). Therefore, the addition of nutraceuticals promotes a healthier intestinal microbiota and diverse metabolites derived from its activity, such as short chain fatty acids, are capable of preventing and reducing the development of these intestinal diseases.

In short, the use of functional meat foods can be a healthy alternative in countries where the consumption of these foods is high, and may help prevent intestinal diseases of inflammatory origin and CRC.

ÍNDICES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 31

1.1. Enfermedades intestinales de origen inflamatorio 33

1.1.1. Síndrome de intestino irritable 33

1.1.1.1. Epidemiología 33

1.1.1.2. Etiología y sintomatología. 33

1.1.1.3. Tratamiento clínico 35

1.1.2. Enfermedad inflamatoria intestinal. 36

1.1.2.1. Epidemiología. 37

1.1.2.2. Etiología y sintomatología. 38

1.1.2.3. Diagnóstico y tratamiento 39

1.1.2.4. Modelos animales 40

1.2. Carcinoma colorrectal 41

1.2.1. Epidemiología 41

1.2.2. Desarrollo del cáncer colorrectal 43

1.2.3. Cáncer colorrectal hereditario 47

1.2.4. Factores que influyen en la aparición de CCR 49

1.2.5. Microbiota y CCR 52

1.2.6. Cribado del CCR 54

1.2.7. Tratamiento del CCR 55

1.2.8. Modelos animales de CCR 57

1.2.8.1. Modelos inducidos químicamente 57

1.2.8.2. Modelos animales de CCR genéticos 59

1.3. Nutracéuticos y alimentos funcionales 61

1.3.1. Prebióticos 62

1.3.1.1. Estructura química de los prebióticos 63
1.3.1.2. Síntesis de SCFAs a partir de prebióticos 65
1.3.1.3. Efectos intestinales de los SCFAs 68
1.3.2. Probióticos 69
1.3.2.1. Mecanismo de acción de los probióticos 70
1.3.3. Fitoquímicos 73
1.3.4. Ácidos grasos insaturados 75
2. OBJETIVOS 77
2.1. Objetivos 79
3. MATERIAL Y MÉTODOS 81
3.1. Modelos animales 83
3.1.1. Modelo animal para CU 83
3.1.2. Modelo animal de CCR inducido químicamente 83
3.1.3. Modelo animal de CCR genético 85
3.2. Tipos de alimentación 85
3.3. Medidas físicas 90
3.4. Muestras de sangre y de tejidos 91
3.5. Estudios histológicos 91
3.6. Ensayo de la actividad de mieloperoxidasa 93
3.7. Ensayo de permeabilidad de la mucosa 94
3.8. Capacidad antioxidante en plasma sanguíneo 94
3.9. Análisis de citoquinas en plasma sanguíneo 94
3.10. Cuantificación de SCFAs en heces por cromatografía de gases masas 94
3.11. Cuantificación de ácidos grasos por CG-MS en muestras cárnicas y de plasma sanguíneo 96
3.12. Extracción de ADN genómico y metagenómica de la subunidad del ARN ribosomal 16S 96
3.13. Análisis filogenético de la secuenciación 97
3.14. Cultivo celular 97
3.14.1. Líneas celulares 97

3.14.2. Estudios de proliferación celular 98

3.14.3. Evaluación de la muerte y ciclo celular..... 99

3.15. Análisis estadísticos y representación de datos..... 100

4. RESULTADOS..... 101

4.1. Estudio de alimentos cárnicos funcionales enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados para la prevención de CU en un modelo animal. 103

4.1.1. Comparación nutricional entre el jamón control y el jamón ibérico de bellota..... 103

4.1.2. Efecto de las dietas en los pesos de los animales y en el índice de actividad de la enfermedad 104

4.1.3. Efecto del jamón de bellota en parámetros histológicos..... 106

4.1.4. Efecto del jamón de bellota sobre los niveles plasmáticos de citoquinas y la capacidad antioxidante..... 108

4.1.5. Efecto del jamón de bellota sobre la concentración de SCFAs en heces de ciego intestinal..... 109

4.1.6. Efecto del jamón de bellota en la concentración de ácidos grasos en plasma sanguíneo 111

4.1.7. Efecto del jamón de bellota sobre la composición de la microbiota intestinal 112

4.2. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con antocianinas para la prevención de CCR en un modelo animal..... 115

4.2.1. Efecto de las salchichas funcionales sobre el peso corporal..... 116

4.2.2. Efecto de las salchichas funcionales sobre el número de placas de Peyer hiperplásicas 117

4.2.3. Efecto de las salchichas funcionales sobre la capacidad antioxidante en plasma sanguíneo 118

4.2.4. Efecto de las salchichas funcionales sobre el peso del ciego..... 119

4.2.5. Efecto de las salchichas funcionales sobre el número de tumores y el área intestinal afectada 120

4.2.6. Efecto de las salchichas funcionales sobre la composición de la microbiota intestinal 121

4.3. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con prebióticos derivados de lactulosa para la prevención de CCR en un modelo animal 125

4.3.1. Efecto del GOS-Lu sobre el peso corporal 126

4.3.2. Efecto del GOS-Lu sobre el peso del ciego intestinal 127

4.3.3. Efecto del GOS-Lu sobre el número de pólipos y la extensión colónica afectada 127

4.3.4. Efecto del GOS-Lu sobre la concentración de SCFAs en heces del ciego intestinal 128

4.3.5. Efecto del GOS-Lu sobre la composición de la microbiota intestinal 129

4.3.6. Correlaciones entre microbiota intestinal, producción de SCFAs y tumores..... 136

4.3.7. Cultivo celular 137

4.3.7.1. Ensayos de viabilidad celular mediados por SCFAs..... 137

4.3.7.2. Ensayos de apoptosis celular mediados por SCFAs 141

4.3.7.3. Ensayos de ciclo celular mediados por SCFAs 142

4.4. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR inducido químicamente 143

4.4.1. Efecto del alimento funcional sobre los niveles plasmáticos de triacilglicéridos..... 144

4.4.2. Efecto del alimento funcional sobre el peso del ciego..... 145

4.4.3. Efecto del alimento funcional sobre el número placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado 146

4.4.4. Efecto del alimento funcional sobre el número de pólipos y la superficie afectada en la mucosa del colon 146

4.4.5. Efecto del alimento funcional sobre la concentración de SCFAs en heces..... 147

4.4.6. Efecto del alimento funcional sobre la composición de la microbiota intestinal 148

4.5. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR genético 154

4.5.1. Efecto del alimento funcional sobre el peso corporal 155

4.5.2. Efecto del alimento funcional sobre el peso del ciego 156

4.5.3. Efecto del alimento funcional sobre el número de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado 157

4.5.4. Efecto del alimento funcional sobre el número de pólipos y la superficie afectada en la mucosa del colon 158

4.5.5. Efecto del alimento funcional sobre la concentración de SCFAs en heces..... 159

4.5.6. Efecto del alimento funcional sobre la composición de la microbiota intestinal 160

5. DISCUSIÓN 169

5.1. Estudio de alimentos cárnicos funcionales enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados para la prevención de CU en un modelo animal 171

5.2. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con antocianinas para la prevención de CCR en un modelo animal. 171

5.3. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con prebióticos derivados de lactulosa para la prevención de CCR en un modelo animal 181

5.4. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR inducido químicamente 186

5.5. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR genético 192

6. CONCLUSIONES 207

7. BIBLIOGRAFÍA 213

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Escala de Bristol. Clasificación de las deposiciones en 7 tipos atendiendo a su apariencia. 34

Figura 2: A) Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de todos los tipos de cáncer en varones en las regiones de Europa (izquierda) y en países en vías de desarrollo (derecha). B) Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de todos los tipos de cáncer en mujeres en las regiones de Europa (izquierda) y en países en vías de desarrollo (derecha). C) Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de todos los tipos de cáncer combinando ambos sexos en las regiones de Europa (izquierda) y en todo el mundo (derecha). Globocan 2012 (IARC 2012).....42

Figura 3: Esquema de generación de una célula madre tumoral (en azul) con crecimiento descontrolado por una mutación génica. Las posteriores divisiones de esta célula madre aberrante generan una cripta con todas sus células tumorales (Humphries & Wright 2008). 43

Figura 4: Esquema de la evolución desde una cripta normal hasta un adenocarcinoma, pasando por las etapas intermedias de foco de cripta aberrante (ACF), microadenoma y adenoma grande (pólipo) (Bruce & Corpet 1996). 44

Figura 5: Esquema resumido de las 3 vías principales de oncogénesis en CCR.....46

Figura 6: (A) Planta perteneciente a las cicadáceas. (B) Molécula de cicasina.....58

Figura 7: Representación esquemática del gen apc. (A) Estructura del gen *apc* Con las posiciones del dominio de dimerización, el dominio de unión ASEF (repeticiones Armadillo), dominio de unión a β-catenina (15 repeticiones aa), dominio de degradación de β-catenina (20 repeticiones aa), un dominio de unión a axina (repeticiones SAMP), dominio de unión a microtúbulos (dominio básico), y el dominio C-terminal (dominios de unión EB-1 y hDLG). (B) Correlación entre mutaciones y severidad de PAF indicando en que pares de bases ocurren (Irving et al. 2014a). 59

Figura 8: Estructuras químicas de las principales familias de polisacáridos prebióticos (Fernández et al. 2015).....64

Figura 9: Rutas metabólicas de producción de SCFAs (acetato, propionato y butirato) a partir de la fermentación de polisacáridos prebióticos. PK: Piruvato quinasa; PC: piruvato carboxilasa; MDH: malato deshidrogenasa; F: Fumarasa; FR: Fumarato reductasa; SCoAS: succinil-CoA sintetasa; MCM: Metilmalonil-CoA mutasa; MMD: metilmalonil descarboxilasa; PCoAT: Propionato-CoA transferasa; LDH: Lactato deshidrogenasa; LCoAS: Lactoil-CoA sintetasa; LCD: Lactoil-CoA deshidratasa; AR: acriloil reductasa; LR: Lactaldehído reductasa; PD: piruvato deshidrogenasa; PDH: Propanediol deshidratasa; PH: Propionaldehido deshidratasa; PFL: formiato liasa de piruvato; PFO: piruvato: ferredoxin oxidorreductasa; PAT: fosfato acetil transferasa; THL: tiolasa; BHBD: β-OH-butiril-CoA deshidrogenasa; CRO: Crotonasa; BCD: butiril-CoA deshidrogenasa; PTB: fosfotransbutirilasa; BUK: butirato quinasa; PERO: butiril-CoA: acetil-CoA transferasa; ACK: acetato quinasa (Fernández et al. 2016a). 67

Figura 10: Efectos de los SCFAs sobre un colonocito. Se muestra su acumulación celular y entrada en el núcleo, con la posterior inhibición de las HDACs, causando modificaciones transcripcionales de genes involucrados en apoptosis y parada del ciclo celular (Fernández et al. 2016a). 69

Figura 11: Esquema de la composición de los grupos experimentales. 8 ratas de cada uno de los 3 grupos se les indujo CU mediante la administración de DSS al 3% y las otras 2 ratas de cada grupo se les administró agua de consumo sirviendo como control absoluto. 103

Figura 12: Efecto de la alimentación sobre el peso corporal y el índice de actividad de la enfermedad (DAI). A, porcentaje de reducción de peso corporal en la cohorte pienso; B, en la cohorte de jamón control; C, en la cohorte de jamón de bellota; y D, en las ratas de control absoluto (sin administración de DSS). Los datos se tomaron todas las semanas a lo largo del experimento de CU. El tratamiento de DSS tuvo lugar entre los días 7 y 14 del experimento. Las ratas se sacrificaron 1 semana después del final de la administración de DSS (día 21). E, índice de actividad de la enfermedad (DAI) para las cohortes de pienso (4 ± 0,84) y de jamón de bellota (0,87 ± 0,29). DAI es la suma de dos parámetros: pérdida de peso corporal (0, más del 5% de ganancia de peso corporal; 1, menos del 5% de ganancia de peso corporal y menos del 5% de pérdida de peso corporal; 2, del 5 al 10% de pérdida de peso corporal; 3, de 10 a 20% de pérdida de peso corporal; 4, más del 20% de pérdida de peso corporal) y consistencia de las heces (0, heces normales; 1, heces blandas; 2, diarrea acuosa; 3, diarrea viscosa con poca sangre; 4, diarrea acuosa severa con sangre). 105

Figura 13: Efecto del jamón de bellota en las mediciones histológicas de colon. A, evaluación del daño macroscópico en la CU: 1, sin ulceración e hiperemia local; 2, ulceración sin hiperemia; 3, ulceración e inflamación en un solo sitio; 4, dos o más sitios de ulceración e inflamación. B, índice de la alteración del epitelio del colon: 0, sin alteración; 1, pérdida focal de células caliciformes; 2, pérdida extensa de células caliciformes; 3, pérdida de criptas menor que en el 50% de la superficie de la mucosa; 4, pérdida de criptas en más del 50% de la superficie de la mucosa y / o regeneración polipoidea. C, densidad celular inflamatoria en la mucosa del colon: 0, sin inflamación; 1, inflamación leve; 2, inflamación moderada; 3, inflamación severa. D, ensayo de mieloperoxidasa (MPO). 106

Figura 14: Efecto del jamón de bellota sobre los parámetros del colon y del intestino delgado. Los círculos y cuadrados indican el valor correspondiente para cada rata. A, porcentaje de reducción de la longitud del colon, en comparación con el valor medio para animales de control absoluto en cada cohorte. B, presencia de cambios reparativos en la mucosa del colon: 0, sin cambios reparativos; 1, cambios reparativos leves (menos del 50% de las ulceraciones de la superficie se vuelven a reepitelizar); 2, cambios reparativos moderados (más del 50% de las ulceraciones se vuelven a reepitelizar); 3, cambios reparativos severos (reepitelización de ulceraciones totales). C, porcentaje de incremento en el número de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado, en comparación con el valor medio de los controles absolutos en cada cohorte. D, ensayo de permeabilidad de Azul de Evans que indica alteraciones en la permeabilidad del colon (más elevado en condiciones de CU). 107

Figura 15: Efecto de la capacidad antioxidante total y los niveles de citoquinas en plasma sanguíneo. A, capacidad antioxidante total (FRAP). B, niveles plasmáticos medios de la citoquina IL-17 proinflamatoria. C, niveles plasmáticos medios de interferón-γ (IFN-γ). 109

Figura 16: Efecto del jamón de bellota en la concentración de SCFA en heces de ciego. A, concentración (mM) de ácido isobutírico en heces del ciego. B, concentración (mM) de ácido isovalérico en heces del ciego. C, concentración (mM) de ácido valérico en heces del ciego. D, concentración (mM) de ácido propiónico en las heces del ciego. E, concentración (mM) de ácido butírico en las heces del ciego.....110

Figura 17: Efecto del jamón de bellota en los niveles plasmáticos de ácidos grasos de cadena corta. A, niveles plasmáticos de ácido oleico en ambas cohortes de ratas. B, niveles plasmáticos de ácidos grasos omega-6 en ambas cohortes de ratas. C, proporción plasmática de omega-6 / omega-3 en ambas cohortes de ratas. D, niveles plasmáticos de ácido linolénico en ambas cohortes de ratas. 112

Figura 18: Composición de la microbiota intestinal (Filo). Composición a nivel de Filos (*Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Deferribacteres*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*) para todos los animales supervivientes en este estudio. A, animales de la cohorte de pienso; B, animales de la cohorte de jamón control; C, animales de la cohorte de jamón de bellota. P: pienso, C: jamón control; B: jamón de bellota.....113

Figura 19: Composición de la microbiota intestinal (Familias). Composición a nivel de familias para todos los animales supervivientes en este estudio. A, animales de la cohorte de pienso; B animales de la cohorte de jamón control; C, animales de la cohorte de jamón de bellota. P: pienso, C: jamón control; B: jamón de bellota.....114

Figura 20: Composición de la microbiota intestinal (filo). Los animales de control absoluto (aquellos que no recibieron el tratamiento de DSS), mostraron diferencias importantes de microbiota, debido a las diferentes composiciones de dieta. Los animales de la cohorte de alimentación contenían principalmente *Firmicutes* (85%) y *Bacteroidetes* (14%). Sin embargo, ambos tipos de animales de cohortes de jamón mostraron un claro aumento en las poblaciones de *Bacteroidetes* (35%) y en *Proteobacteria* (25%), con claras reducciones en las poblaciones de *Firmicutes*. Además, el filo *Actinobacteria* solo apareció en ambas cohortes de jamón. F: pienso, C: jamón control; A: jamón de bellota. 115

Figura 21: Esquema de la composición de los grupos experimentales. 8 ratas de cada uno de los 3 grupos de les indujo CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 2 periodos de DSS al 3% y 2%. Las otras 2 ratas de cada grupo no se les administró el tratamiento sirviendo como control absoluto.....116

Figura 22: A, Evolución del peso corporal durante todo el experimento para las ocho ratas tratadas para inducirles CCR en las tres cohortes. El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 3, 4, 7, 15 y 20; B, Evolución del peso corporal a lo largo de todo el experimento para los dos controles absolutos (sin inducción de CCR) en las tres cohortes. El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 3, 4, 7, 15 y 20. P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales. 117

Figura 23: A, Número medio de placas de Peyer hiperplásicas en cada cohorte de alimentación (8 ratas de cada grupo que se les indujo CCR) con diferencias significativas entre ellos; B, Imagen que muestra una placa de Peyer hiperplásica sobre la superficie del intestino delgado, aparece como una protuberancia redondeada y blanquecina de unos 2-3 mm de diámetro (flecha negra). P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales. 118

Figura 24: Valor medio de la capacidad antioxidante total en sangre de las 8 ratas con CCR de cada cohorte de alimentación medido en equivalentes Trolox (μM). P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales.....119

Figura 25: Valor medio en gramos del peso del ciego para las 3 cohortes de alimentación, siendo incluidos las 8 ratas de cada grupo a las que se las indujo CCR. P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales.....119

Figura 26: A, Valor medio de los pólipos del intestino grueso en las 8 ratas que se les indujeron CCR en cada cohorte de alimentación. Las ratas utilizadas como control absoluto (ratas 9 y 10 de cada cohorte) no mostraron ningún tipo de lesión en la mucosa colónica; B, Valor medio del área del intestino grueso afectada por tumores. Para cada animal se calculó el área individual de cada pólipo sumándose todos y generando la media de cada cohorte. P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales. 120

Figura 27: Composición de la microbiota intestinal, a nivel de filo, en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchichas control (SC1 a SC10), y en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchichas funcionales (SF1 a SF10). SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional. 122

Figura 28: Diferencias en la composición media de la microbiota intestinal a nivel de familias para las ratas pertenecientes a ambas cohortes de salchichas. SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional.....123

Figura 29: Composición de la microbiota intestinal a nivel de familias en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchicha control (SC1 a SC10) y en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchicha funcional (SF1 a SF10). SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional. 124

Figura 30: Diferencias en la composición de *Bilophila wadsworthia* para las ratas pertenecientes a la cohorte de salchicha control y la cohorte de salchicha funcional. SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional.....125

Figura 31: Esquema de la composición de los 2 grupos experimentales. 8 ratas de cada uno de los 2 grupos de les indujo CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 2 periodos de DSS al 3% y 2%. Las otras 2 ratas de cada grupo no se les administró el tratamiento sirviendo como control absoluto.....126

Figura 32: Evolución del peso corporal a lo largo de todo el experimento para las 8 ratas con inducción de CCR en las dos cohortes: pienso control (círculos) y GOS-Lu (cuadrados). El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 3, 4, 7, 15 y 20.....126

Figura 33: Valores medios del peso del ciego para cada una de las dos cohortes. El aumento de peso en la cohorte GOS-Lu fue estadísticamente significativo (p-valor de 0,001). 127

Figura 34: (A) Valor medio del número de pólipos en el colon de cada cohorte (ratas 1 a 8 en cada caso). (B) Valor medio del área de los pólipos de cada cohorte. Para cada animal, se calculó el área de cada pólipo individual, y luego se sumaron estos valores, representando la media de cada grupo en mm2. 128

Figura 35: (A) Concentraciones de propionato cecal en las cohortes de pienso (0,86 ± 0,1) y GOS-Lu (1,35 ± 0,03). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (p-valor de 0,003). (B) Concentraciones de butirato cecal en las cohortes de pienso (1,29 ± 0,2) y GOS-Lu (0,51 ± 0,1). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (C) Concentraciones de hexanoato cecal en las cohortes de pienso (0,73 ± 0,2) y GOS-Lu (0,13 ± 0,06). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (D) Concentraciones de valerato cecal en las cohortes de pienso (0,07 ± 0,004) y GOS-Lu (0,06 ± 0,008). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (E) Concentraciones de isobutirato cecal en las cohortes de pienso (0,04 ± 0,01) y GOS-Lu (0,03 ± 0,009). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (F) Concentraciones de isovalerato cecal en las cohortes de pienso (0,004 ± 0,0007) y GOS-Lu (0,003 ± 0,0006). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. 129

Figura 36: Representación gráfica de la relación *Firmicutes* / *Bacteroidetes* en ambas cohortes. 130

Figura 37: Índices de diversidad de la microbiota intestinal en cada cohorte. (A) El índice de Shannon es de 3,47 ± 0,17 para la cohorte de pienso y 4,32 ± 0,09 para la cohorte de GOS-Lu (diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor de 0,0004). (B) El índice de Chao es de 33,56 ± 3,66 para la cohorte de pienso y 46,2 ± 1,13 para la cohorte de GOS-Lu (diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor de 0,0086). (C) El índice de Simpson es de 0,8494 ± 0.02 para la cohorte de pienso y 0,9177 ± 0,01 para la cohorte de GOS-Lu (diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor de 0,0086). 131

Figura 38: Diferencias en la composición media de la microbiota intestinal a nivel de familia para las 2 cohortes estudiadas. 132

Figura 39: Composición de la microbiota intestinal a nivel de familia en las ratas pertenecientes a la cohorte de pienso (Pienso 1 a Pienso 10), y en las ratas pertenecientes a la cohorte de GOS-Lu (GOS-Lu 1 a GOS-Lu 10). 133

Figura 40: Familias que muestran diferencias estadísticamente significativas entre las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso y de GOS-Lu.....134

Figura 41: Correlaciones significativas entre (A) los taxones bacterianos y los niveles de producción de SCFAs, y (B) los taxones bacterianos con el número de pólipos o el área total del tumor. 137

Figura 42: Curvas de viabilidad celular frente a propionato. (A) Viabilidad celular en la línea HCT116 frente a las concentraciones de propionato de 2, 4, 8, 12 y 16 mM. (B) Viabilidad celular en la línea HT29 frente a las concentraciones de propionato de 2, 4, 8, 12 y 16 mM. (C) Viabilidad celular en la línea T84 frente a

las concentraciones de propionato de 30, 60, 90, 120 y 150 mM. (D) Viabilidad celular en la línea BHK21 frente a las concentraciones de propionato de 1, 2, 4, 8 y 16 mM. 138

Figura 43: Curvas de viabilidad celular frente a butirato. (A) Viabilidad celular en la línea HCT116 frente a las concentraciones de butirato de 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM. (B) Viabilidad celular en la línea HT29 frente a las concentraciones de butirato de 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM. (C) Viabilidad celular en la línea T84 frente a las concentraciones de butirato de 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM. (D) Viabilidad celular en la línea BHK21 frente a las concentraciones de butirato de 1, 2, 4, 8 y 16 mM. 139

Figura 44: Comparativa de viabilidad celular realizada por la acción de propionato y butirato en las tres líneas celulares de CCR. (A) Comparación en la línea celular HCT116. (B) Comparación en la línea celular HT29. (C) Comparación en la línea celular T84. 140

Figura 45: Ensayos de apoptosis mediados por butirato y propionato en las tres líneas celulares de CCR. En los gráficos se muestra el porcentaje de células que sufrieron necrosis, apoptosis o que siguen viables tras el tratamiento. (A) Estudio de apoptosis en la línea celular HCT116. (B) Estudio de apoptosis en la línea celular HT29. (C) Estudio de apoptosis en la línea celular T84. Las concentraciones utilizadas de butirato y propionato son las que producen la CI_{70} para cada línea celular. 141

Figura 46: Ciclo celular de las tres líneas ensayadas de CCR cuando son tratadas con propionato y butirato. En el eje vertical se muestra el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo (G1, G2 y S). (A) Ciclo celular en la línea HCT116. (B) Ciclo celular en la línea HT29. (C) Ciclo celular en la línea T84. 142

Figura 47: Esquema con la composición de los 5 grupos animales experimentales. A 7 de las ratas de cada uno de los 5 grupos se les indujo CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 2 periodos de tratamiento con DSS. A las otras 3 ratas de cada grupo no se les administró este tratamiento (controles absolutos). 143

Figura 48: Niveles de triacilglicéridos en el plasma sanguíneo de los 3 grupos experimentales (círculos para pienso, cuadrados para cárnico control y triángulos para cárnico funcional). Las unidades están expresadas en mg/dL. 145

Figura 49: Valores medios del peso del ciego en las tres cohortes del experimento. Las unidades están expresadas en gramos (g). 145

Figura 50: Número medio de placas de Peyer hiperplásicas en cada cohorte (en las 7 ratas de cada grupo a las que se les indujo CCR). 146

Figura 51: (A) Valor medio del número de pólipos en el colon de cada cohorte. (B) Valor medio del área total de los pólipos de cada cohorte. Para cada animal, se calculó el área de cada pólipo individualmente, y luego se sumaron estos valores, representándose la media de cada grupo en mm^2. 147

Figura 52: Concentraciones de los dos principales SCFAs en heces de ciego. (A) Concentraciones medias de propionato en las tres cohortes (B) Concentraciones medias de butirato en las tres cohortes. Las unidades se expresan en mM. 148

Figura 53: Representación gráfica de la relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* en las tres cohortes de alimentación. 149

Figura 54: Dendrograma de las principales familias presentes en los animales de las tres cohortes del estudio. P: Pienso. CC: Chorizo control. JC: Jamón control. CF: Chorizo funcional. JF: Jamón funcional. 150

Figura 55: Familias que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso, cárnico control y cárnico funcional. 152

Figura 56: Esquema de la composición de los 4 grupos experimentales. A 8 ratas de cada uno de los 4 grupos se les potenció el desarrollo del CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 1 periodo de DSS al 3% en el agua de bebida. A las otras 2 ratas de cada grupo no se les administró el tratamiento (controles absolutos). 154

Figura 57: Evolución del peso corporal a lo largo de todo el experimento para las ratas de las cuatro cohortes: pienso control (círculos), chorizo control (cuadrados), chorizo funcional (triángulos), chorizo funcional con probióticos (triángulos invertidos). El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 8, 13, 18 y 20. 155

Figura 58: Valores medios del peso del ciego para cada una de las cuatro cohortes. El aumento de peso en las cohortes de chorizo funcional y chorizo funcional más probióticos fue estadísticamente significativo respecto a las otras dos cohortes (p-valores <0,001). 156

Figura 59: Valores medios de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado para cada una de las cuatro cohortes. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre la cohorte de chorizo control y el resto: pienso (p-valor <0,0001), chorizo funcional (p-valor de 0,001), y chorizo funcional con probióticos (p-valor de 0,0003). 157

Figura 60: (A) Valor medio del número de pólipos en el colon de cada cohorte. (B) Valor medio del área total de los pólipos en cada cohorte. Para cada animal, se calculó el área de cada pólipo individual, y luego se sumaron estos valores, representando la media de cada grupo en mm^2. 158

Figura 61: (A) Concentraciones de propionato cecal en las cuatro cohortes. (B) Concentraciones de butirato cecal en las cuatro cohortes. (C) Concentraciones de hexanoato cecal en las cuatro cohortes. (D) Concentraciones de isobutirato cecal en las cuatro cohortes. (E) Concentraciones de valerato cecal en las cuatro cohortes. P: Pienso, CC: Chorizo control, CF: Chorizo funcional, CFP: Chorizo funcional con probióticos 159

Figura 62: Relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* en las tres cohortes de alimentación. P: Pienso. CC: Chorizo control. CF: Chorizo funcional. 162

Figura 63: Composición de la microbiota intestinal, a nivel de familias, en cada animal de las tres cohortes estudiadas en esta fase. P: Pienso. CC: Chorizo control. CF: Chorizo funcional. 163

Figura 64: Familias con diferencias estadísticamente significativas entre las tres cohortes analizadas en esta fase. P: Pienso. CC: Chorizo control. CF: Chorizo funcional. 164

Figura 65: Diferencias estadísticamente significativas a nivel de filos entre la cohorte chorizo funcional y la cohorte chorizo funcional con probióticos. (A) Diferencias en el filo *Proteobacteria*. (B) Diferencias en el filo *Actinobacteria*. (C) Diferencias en el filo *Synergistetes*. CF: Chorizo funcional. CFP: Chorizo funcional con probióticos. 166

Figura 66: Diferencias estadísticamente significativas a nivel de familia entre la cohorte chorizo funcional y la cohorte chorizo funcional con probióticos. (A) Diferencias a nivel de la familia *Lachnospiraceae*. (B) Diferencias a nivel de la familia *Coriobacteriaceae* (C) Diferencias a nivel de la familia *unclassified Clostridiales*. CF: Chorizo funcional. CFP: Chorizo funcional con probióticos. 167

Figura 67: Potenciales taxones reductores de nitrato a nitrito presentes en la microbiota de las ratas control absoluto de la cohorte jamón control y de la de jamón de bellota. C: Jamón control. B: Jamón de bellota. 180

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición nutricional de los dos jamones utilizados. 87

Tabla 2: Composición de ácidos grasos en los dos jamones utilizados 87

Tabla 3: Características de las 3 líneas celulares ensayadas. 97

Tabla 4: Niveles medios de ácidos grasos en el plasma sanguíneo de las cohortes de ratas pertenecientes al jamón de bellota y de pienso. Se muestran los porcentajes para cada ácido graso. Los datos incluyen ácidos grasos saturados (como ácido mirístico o ácido palmítico), monoinsaturados (como ácido oleico o ácido palmitoleico), ω-6 (como ácido linoleico o ácido araquidónico) y ω-3 (como α-linolénico o DHA). La relación ω-6 / ω-3 es un parámetro muy importante con respecto a los problemas de salud del animal, esta relación se muestra en la parte inferior de la tabla para los dos tipos de plasma sanguíneo. 111

Tabla 5: Media del porcentaje de la composición de la microbiota intestinal a nivel de Filo en las 3 cohortes de alimentación estudiadas. 121

Tabla 6: Composición de la microbiota intestinal a nivel de filo para las dos cohortes estudiadas, mostrando la media del porcentaje respecto al total. El * indica diferencias estadísticamente significativas (p-valores de 0,008 para *Actinobacteria*, 0,035 para *Bacteroidetes*, 0,042 para *Firmicutes*, 0,029 para *Synergistetes* y 0,002 para *Tenericutes*). 130

Tabla 7: Diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota intestinal a nivel de géneros y especies para las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso y de GOS-Lu. 135

Tabla 8: Concentración inhibitoria 50% (CI50) de propionato y butirato en las cuatro líneas celulares estudiadas (HCT116, HT29, T84 y BHK21). Concentraciones expresadas en mM. 140

Tabla 9: Composición de la microbiota intestinal a nivel de filo para las tres cohortes estudiadas, mostrándose la media del porcentaje respecto al total. El * indica diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes P (pienso), CC (cárnico control) y CF (cárnico funcional). 149

Tabla 10: Porcentajes a nivel de géneros y especies y diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota intestinal para las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso, cárnico control y cárnico funcional. P: Pienso, CC: cárnico control y CF: cárnico funcional. 153

Tabla 11: Composición de la microbiota intestinal a nivel de filo para las tres cohortes estudiadas, mostrando la media del porcentaje respecto al total de bacterias cuantificadas. El * indica diferencias estadísticamente significativas entre P (Pienso), CC (Chorizo control) y CF (Chorizo funcional). 161

Tabla 12: Diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota intestinal a nivel de géneros y especies para las ratas pertenecientes a las tres cohortes analizadas. P: Pienso. CC: Chorizo control: CF: Chorizo funcional. 165

Abreviaturas:

ACF: Foco de cripta aberrante

AOM: Azoximetano

aPAF: Poliposis adenomatosa familiar atenuada

CCR: Cáncer colorrectal

CI50: Concentración inhibitoria al 50%

CU: Colitis ulcerosa

DAI: Índice de severidad de la enfermedad

DMH: 1,2-dimetilhidracina

DSS: Dextrano sulfato sódico

EC: Enfermedad de Crohn

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ENU: N-etil-N-nitrosourea

F344: Cepa de rata Fischer 344

FAO: Organización de Naciones Unidas para la agricultura y alimentación

FOS: Fructooligosacáridos

FU: Fluorouracilo

GC-MS: Cromatografía de gases masas

GLP: Péptido similar al glucagón

GOS: Galactooligosacáridos

GOS-Lu: Galactooligosacáridos de lactulosa

HDACs: Histonas deacetilasas

HMO: Oligosacáridos de leche materna

IARC: Agencia internacional de investigación en cáncer

IFN: Interferón

IL: Interleucina

ISSAP: Asociación científica internacional de prebióticos y probióticos

IUOPA: Instituto universitario de oncología del Principado de Asturias

KAD: Cepa de rata Kyoto Apc delta

MAM: Metilazoximetanol

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MPO: Mieloperoxidasa

NF-κB: Factor nuclear kappa B

OMS: Organización mundial de la salud

PAF: Poliposis adenomatosa familiar

PAM: Poliposis asociada a MUTYH

PIRC: Poliposis en colon de rata (cepa de rata)

PRB: Proteína del retinoblastoma

RN: Tinción vital rojo neutro

SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta

SFB: Suero fetal bovino

SII: Síndrome de intestino irritable

SNC: Sistema nervioso central

TGF: Factor de crecimiento transformante

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico

UFC: Unidades formadoras de colonia

VEGF: Factor de crecimiento endotelial

ω-3,6: Ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades intestinales de origen inflamatorio

1.1.1. Síndrome de intestino irritable

Se define el síndrome de intestino irritable (SII) como un trastorno funcional digestivo que se caracteriza por la presencia de molestias abdominales y cambios en los hábitos de las deposiciones (Longstreth 2005).

1.1.1.1. Epidemiología

Al no tener una sintomatología claramente definida, la prevalencia de la enfermedad varía entre un 3-20% en la población, dependiendo del método usado para su diagnóstico. Esta prevalencia también es variable dependiendo de características generales de la población de estudio, como pueden ser: el sexo al que va dirigido el estudio, la zona geográfica, la edad o la población objeto de dicho estudio (Grundmann & Yoon 2010).

Se estima que en los países occidentales la prevalencia es de entre un 10-18%, mientras que en los países asiáticos se reduce hasta un 1-9%. En España, la prevalencia oscila entre el 7-8%. Se observa una mayor prevalencia en la mujer, con una ratio 2:1, pero esta diferencia solo se ha observado en países occidentales. Además, el SII es más frecuente entre personas jóvenes (Mearin et al. 2001; Choung & Locke 2011; Longstreth 2005).

La incidencia real del SII es difícil de calcular, porque a menudo muchos pacientes que tienen la sintomatología de la enfermedad no acuden al médico. Aun así, se estima que en los países occidentales pueden padecer esta enfermedad entre 200-300 personas por cada 100.000 habitantes/año, aunque estas cifras pueden estar infravaloradas y según otras estimaciones podrían verse afectadas unas 400 personas por cada 100.000 habitantes/año (Choung & Locke 2011; Ruigómez et al. 1999).

1.1.1.2. Etiología y sintomatología.

Es difícil establecer una serie de criterios con los que se pueda realizar un diagnóstico claro del SII, debido a que presenta una sintomatología muy diversa. Por ello, se han adoptado una serie de consensos, denominados Criterios de Roma. El último vigente es el Roma III y data de 2006.

El criterio Roma III establece que para el diagnóstico del SII deben cumplirse una serie de premisas:

a) La presencia de molestias abdominales durante al menos 3 días al mes durante un mínimo de 3 meses.
b) Más un cambio en la frecuencia y/o forma de las deposiciones.
c) Además, todas estas molestias deben haber comenzado 6 meses antes del diagnóstico.
d) Pueden darse otros síntomas como fiebre, pérdida de peso o sangre en heces (Lacy et al. 2016).

Atendiendo a cambios en las deposiciones, se pueden establecer diferentes subtipos de SII. Para ello se tiene en cuenta la escala Bristol, que establece categorías en función de la consistencia de las heces (O'Donnell et al. 1990). Hay así 4 categorías principales (Longstreth et al. 2006):

Figura 1: Escala de Bristol. Clasificación de las deposiciones en 7 tipos atendiendo a su apariencia.

a) SII con diarrea: cuando más del 25% de las deposiciones están en la escala 6-7 [Figura1].
b) SII con estreñimiento: cuando más del 25% de las deposiciones están en la escala 1-2 [Figura 1].
c) SII con patrón alterno: si hay más del 25% de ambas formas.

d) SII con patrón indefinido: cuando no se puede clasificar en las anteriores categorías.

Con todas estas variables, la etiología de la enfermedad no es clara y puede tener origen multifactorial. Los síntomas principales se deben a cambios en la motilidad por contracciones gastrointestinales anómalas o por una incorrecta secreción biliar. Puede existir una hipersensibilización debido a un incorrecto procesamiento de la información dolorosa por parte del sistema nervioso central (SNC). Además, los factores psiquiátricos como síndromes de ansiedad, cambios en el patrón del sueño, estrés o pánico aumentan considerablemente la prevalencia de la enfermedad (Ford et al. 2009).Varios estudios muestran además que pueden estar involucrados factores genéticos, ya que los familiares de un paciente tienden a ser 2-3 veces más propensos a padecer la enfermedad, aunque se desconocen con seguridad los genes exactos involucrados en el SII (Cremonini & Talley 2005).

Por otro lado, las bacterias presentes en el intestino parecen tener importancia a la hora de disparar el proceso patológico, ya que se han observado cambios en la microbiota en los pacientes con SII respecto a la población sana, en especial descensos en poblaciones de *Lactobacillus* o bifidobacterias (Moayyedi et al. 2010). También puede observarse en ocasiones un sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado de los pacientes, lo que provoca cambios en la motilidad y sobreproducción de gases. Este sobrecrecimiento puede ocurrir tras una infección gastrointestinal bacteriana (Pimentel et al. 2011).

Por último, varios procesos inflamatorios pueden ser desencadenantes de SII, ya que en estos pacientes se produce un aumento de los linfocitos, mastocitos y citosinas proinflamatorias.

1.1.1.3. Tratamiento clínico

Al no haber una sintomatología ni una etiología definida y específica para esta enfermedad, antes de aplicar un tratamiento específico para SII se realizan diferentes estudios para descartar cualquier otra patología con sintomatologías coincidentes, como por ejemplo celiaquía, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), carcinoma colorrectal (CCR), etc.

No existe un único tratamiento estándar para el SII. Los diferentes síntomas y las complejas etiologías hacen que el tratamiento sea en realidad una medida paliativa para mitigar o eliminar síntomas presentes en el paciente.

En cuanto a modificaciones en la dieta, pese a no demostrarse una mayor incidencia de alergias alimentarias en estos pacientes, sí se observa que la restricción de determinados alimentos como grasas, lácteos, carbohidratos o un aumento de la fibra soluble mitigan los efectos del SII. Otros cambios conductuales como deporte practicado de forma regular o un buen hábito de sueño también mejoran los síntomas (Rajilić-Stojanović et al. 2015).

Determinados fármacos son útiles en el tratamiento de la sintomatología, como los antidiarreicos, los antiespasmódicos, los inhibidores de los receptores de serotonina (la hormona que regula las funciones motoras del intestino), los activadores de canales de cloro (que provocan la liberación de sodio y agua hacia la luz intestinal) o los agentes psicoactivos (principalmente antidepresivos), que aumentan la neurogénesis (Ford et al. 2009; Tack et al. 2006).

Otro potencial tratamiento se centra en paliar la disbiosis presente en el intestino, mediante el uso de probióticos, prebióticos, simbióticos, o bien el uso de antibióticos de baja absorción cuando existe un sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado o en procesos de infección gastrointestinal (Moayyedi et al. 2010; Pimentel et al. 2011; Rajilić-Stojanović et al. 2015).

En definitiva, el SII puede ser definido como un conjunto de síntomas con una etiología muy diversa que pueden ser desencadenados por procesos microinflamatorios. El diagnóstico y tratamiento debe realizarse por tanto en función de los síntomas que padezca el paciente de SII.

1.1.2. Enfermedad inflamatoria intestinal.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad inflamatoria localizada en el tubo digestivo causada por una reacción autoinmune.

Es una enfermedad inmunológica de carácter crónico, con una sintomatología que se manifiesta en brotes imprevisibles en duración y grado, seguidos de periodos se ausencia de

síntomas. Dentro de la EII destaca la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), siendo estas las afecciones con mayor incidencia y prevalencia.

La principal diferencia entre ambas se centra en la zona de afectación, ya que en la CU es el intestino grueso el que se ve afectado, mientras que en la EC puede verse afectada cualquier parte del tubo digestivo (Domènech et al. 2014).

1.1.2.1. Epidemiología.

En el último siglo, la incidencia de la EII ha ido incrementándose progresivamente, en especial en los países desarrollados. Este incremento ha sido de un 75% en el caso de la EC y de un 60% en el de la CU.

La mayor tasa de incidencia y prevalencia de la EII se encuentra en Europa Occidental y Norteamérica. La incidencia máxima se detecta en Norteamérica (19,2 casos de CU y 20,2 casos de EC por cada 100.000 habitantes/año) y en Europa del Norte (24,3 casos de CU en Islandia y 10,6 casos de EC en Reino Unido por cada 100.000 habitantes/año) (Molodecky et al. 2012). Se calcula una prevalencia total de 2,5-3 millones de pacientes en Europa y 1-1,5 millones de personas en Norteamérica. En estas zonas, la prevalencia se sitúa entre 150-505 casos por cada 100.000 habitantes (Burisch & Munkholm 2013)

La distribución de la enfermedad en Europa es muy heterogénea, siendo los países del norte los más afectados y siendo además más frecuente en zonas rurales que urbanas. La tasa de mortalidad es muy baja, con casi la totalidad de los casos atribuibles a la EC, (1 por cada 200 pacientes), debido principalmente a complicaciones indirectas de esta enfermedad (Economou & Pappas 2008).

En España se observa un claro ascenso continuado de la prevalencia, con unos 180 casos por cada 100.000 habitantes, siendo muy heterogénea su dispersión entre las diferentes regiones del norte y del sur del país (Barreiro-de Acosta et al. 2017).

Tanto la CU como la EC surgen mayoritariamente en adultos jóvenes. 5 de cada 10 pacientes se diagnostican entre los 20 y los 39 años, y un 25% de los mismos inician la sintomatología antes de los 25 años. La incidencia entre sexos es muy similar, siendo más frecuente los casos de CU en hombres y los de EC en mujeres (Molodecky et al. 2012).

1.1.2.2. Etiología y sintomatología.

Los síntomas de la EII aparecen agrupados en periodos de afectación, denominados brotes, que se producen con diferente grado de severidad y van precedidos de periodos de remisión. Dentro de las dos afecciones principales, la EC y la CU, hay síntomas compartidos como la diarrea o el estreñimiento, la aparición de sangrado en la defecación, fiebre (debida al proceso inflamatorio), anemia (debida a malabsorción de nutrientes y pérdida de sangre en heces), sensación de evacuación incompleta (tenesmo), fatiga, pérdida de peso y otras manifestaciones genéricas (Hoffmann & Kruis 2004).

El dolor abdominal y las lesiones anales son más frecuentes en la EC En cambio, las manifestaciones extraintestinales ocurren en un 10% de los casos de CU, pero afectan a un 20-40% de los pacientes de EC (Hoffmann & Kruis 2004).

La probabilidad de padecer CCR parece aumentar al padecer UC. En un meta-análisis de 116 estudios se llega a la conclusión de que el riesgo de padecer CCR aumenta un 2% tras 10 años de enfermedad, un 8% tras 20 años y un 18% tras 30 años (Burisch & Munkholm 2013).

De todas formas, no todos los pacientes presentan todos los síntomas y con la misma intensidad. La clasificación de Montreal sirve para estandarizar los casos de EII dependiendo de la intensidad de los brotes: leves (afectan al 50% de la población enferma), moderados (35%) y fuertes (15%) (Satsangi et al. 2006).

En cuanto a la etiología de la enfermedad, no se conoce el mecanismo por el que se produce la reacción inmunológica, aunque parecen existir una serie de factores de riesgo que incrementan la probabilidad de padecer EII. Por ejemplo, unas buenas condiciones higiénicas, como el acceso a agua potable, podrían favorecer el desarrollo de EII. También son factores de riesgo una dieta rica en grasas saturadas y pobre en frutas, verduras y fibra; el uso de antibióticos, los tratamientos antiacné, los anticonceptivos orales y las terapias hormonales (Castiglione et al. 2012; Khalili et al. 2013; Lee et al. 2015).

Además, hay estudios que demuestran que la probabilidad de padecer EII en el caso de tener antecedentes familiares aumenta un 12% en el caso de la EC y cerca del 9% en el de la CU. En gemelos idénticos se ha visto que padecen CU simultáneamente en un 20-50% de los

casos (10% para el resto de gemelos). Estos porcentajes son de un 16% y un 4% respectivamente en el caso de EC (Moller et al. 2015).

Finalmente, varios factores inducen cierta protección frente a EII. Éste es el caso de la eliminación del apéndice, que da cierta protección frente a la aparición de CU, descendiendo el riesgo hasta un 69%. La lactancia materna reduce la probabilidad de padecer una enfermedad autoinmune como la EII. Una menor exposición a la radiación solar se relaciona con una mayor incidencia de EII (menores niveles de vitamina D), de ahí que exista una relación directa con el aumento de esta enfermedad en países del norte respecto a los del sur (Ananthakrishnan 2015; Ponder & Long 2013).

1.1.2.3. Diagnóstico y tratamiento

La EII tiene una sintomatología diversa, muy heterogénea dependiendo de la intensidad y grado de cada caso, por lo que el diagnóstico puede ser difícil y normalmente es tardío. Cuando los síntomas están bien definidos, se realiza una batería de pruebas analíticas, ecografías y endoscopias, lo que permite que se llegue a un diagnóstico claro de la enfermedad.

Los principales tratamientos para la EII son farmacológicos, de los cuales los más ampliamente utilizados son:

a) Aminosalicilatos para reducir los procesos inflamatorios. Son los más ampliamente usados, en especial en casos de CU.
b) Corticoides: se usan en periodos de brotes de la enfermedad para regular la respuesta inmune. Su uso debe de ser en cortos periodos debido a los efectos secundarios que producen.
c) Inmunomoduladores: se usan en los casos más graves de la enfermedad, ya que reducen la actividad del sistema inmune, originando graves efectos secundarios.

En casos de EC también se utilizan en ocasiones tratamientos biológicos, que son capaces de disminuir los procesos inflamatorios y de restablecer mediante una correcta cicatrización la mucosa intestinal afectada (Veljacca 2004).

La cirugía se utiliza en especial en pacientes de EC, que generalmente sufren varios procesos quirúrgicos a lo largo de su enfermedad. Sin embargo, para estos pacientes no se trata de una

solución definitiva, ya que la EC tiene una localización difusa a lo largo de todo el sistema digestivo. En el caso de pacientes de CU, la cirugía solo se utiliza en los casos más graves, pudiendo llegar a eliminarse todo el intestino grueso del paciente (Lönnfors et al. 2014).

Finalmente, existen tratamientos experimentales, como el trasplante de medula ósea, que pueden llevar a la curación del paciente (DiNicola et al. 2017).

1.1.2.4. Modelos animales

Los principales modelos animales de experimentación en EII están destinados a la CU. Estos modelos muestran similitudes con la enfermedad en humanos tanto en los síntomas como en sus características histológicas. Los principales métodos para generar la EII en animales son la inducción química, la transferencia adoptiva y los modelos genéticos (Jurjus et al. 2004).

En los **modelos químicos** se utilizan varios compuestos para inducir colitis. Los dos más utilizados son el dextrano sulfato sódico (DSS) y el ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Ambos provocan daños a nivel de la barrera intestinal. El DSS causa daños más parecidos a la CU y el TNBS más a la EC (Alex et al. 2009).

El DSS es un compuesto que se administra disuelto en agua de bebida de los animales de experimentación, en concentraciones cercanas al 3%. Su efecto se debe a que afecta a la capa interna de la mucosa intestinal, lo que provoca aumento de la permeabilidad y translocación bacteriana, que acaban provocando la activación de la cascada inflamatoria en la mucosa (Johansson et al. 2010).

En cambio, el TNBS induce la formación de compuestos prooxidantes, dañándose el colon al producirse zonas de necrosis, rodeadas de zonas de inflamación. Este proceso parece deberse a la infiltración de neutrófilos en el tejido, provocando un aumento de la permeabilidad de la mucosa y reacciones de inflamación causadas por macrófagos. El daño en la mucosa es más profundo que con el tratamiento de DSS (Tatsumi & Lichtenberger 1996).

En los **modelos de transferencia adoptiva** se transfieren células T a un receptor histocompatible; dando lugar a un cuadro de CU por la interrupción de la homeostasis de las células T. La severidad de esta CU inducida depende de varios factores, como el tipo de

protocolo utilizado, el animal receptor y los componentes del sistema inmune transferidos desde el donante (Ostanin et al. 2009).

En los **modelos genéticos** se utilizan cepas animales que tienen una mayor predisposición a padecer CU. Por ejemplo, los modelos animales deficientes en interleucina 10 ($IL10^{-/-}$) provocan CU crónica, debido a una mayor respuesta inflamatoria frente a la presencia de microbiota intestinal, por ejemplo, frente a especies del género *Enterococcus*. En ratones axénicos mutantes para IL-10 no se observa en cambio esta inducción de CU(Sydora et al. 2003).

Otro modelo animal genético frecuente es el afectado en la proteína Mdr1a, una proteína de la membrana del enterocito transportador de compuestos hidrofóbicos (Huebner et al. 2009).

El modelo animal $Nod2^{2939iC}$ está afectado en una proteína que reconoce receptores del sistema inmune innato, dando lugar entonces a la translocación del factor nuclear kappa B (NF-κB) al núcleo, lo que origina una respuesta inmune (Inohara et al. 2002). En ratones con el alelo $Nod2^{2939iC}$ no se manifiesta la enfermedad, pero cuando se les administra un tratamiento con DSS se observa una potenciación de sus efectos respecto a ratones normales. Este efecto parece deberse a la microbiota presente en el intestino del animal, y que gracias a la alteración de la permeabilidad causada por el DSS causa la activación alterada de NF-κB (inflamación) y a la secreción de IL-1 (Maeda et al. 2005). Este alelo por sí solo no genera la enfermedad, pero incrementa por tanto la susceptibilidad para que la respuesta frente a algunas especies bacterianas de la microbiota intestinal conduzca a procesos inflamatorios en este tejido.

1.2. Carcinoma colorrectal

1.2.1. Epidemiología

En el mundo, el CCR ocupa el tercer puesto en incidencia y el cuarto en mortalidad entre todos los tipos de cáncer, si tenemos en cuenta ambos sexos. Estos datos aumentan si solo se incluyen los datos de los países desarrollados [Figura 2A]. En Europa estas cifras son más elevadas, ya que en varones es el tercer cáncer en incidencia (tras pulmón y próstata) y el segundo en mortalidad (tras pulmón) [Figura 2B] y en mujeres está situado como segundo cáncer en incidencia (tras mama) y el tercero en mortalidad (tras mama y pulmón) [Figura

2C]. Si juntamos ambos sexos, en Europa es el segundo carcinoma en incidencia (tras mama) y en mortalidad (tras pulmón) (IARC 2012).

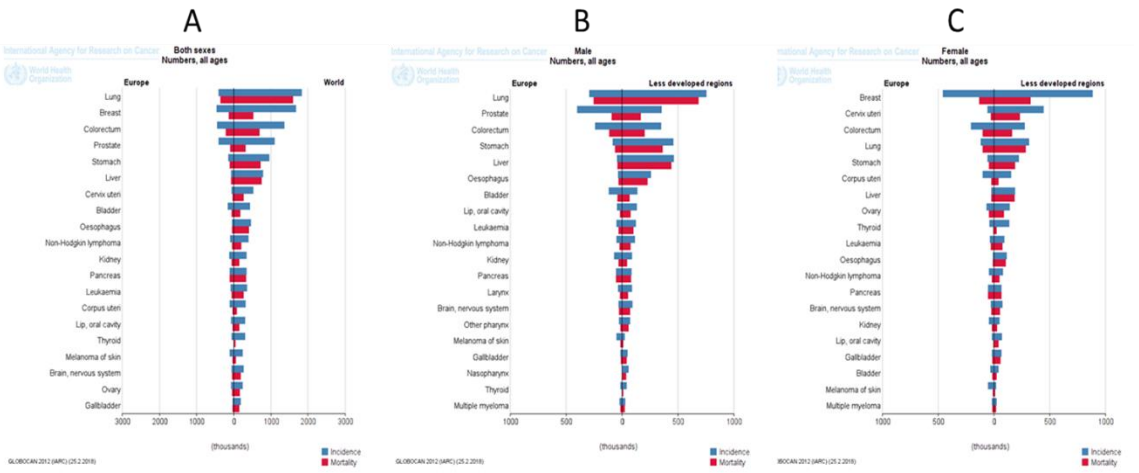

Figura 2: A) Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de todos los tipos de cáncer en varones en las regiones de Europa (izquierda) y en países en vías de desarrollo (derecha). B) Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de todos los tipos de cáncer en mujeres en las regiones de Europa (izquierda) y en países en vías de desarrollo (derecha). C) Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de todos los tipos de cáncer combinando ambos sexos en las regiones de Europa (izquierda) y en todo el mundo (derecha). Globocan 2012 (IARC 2012).

Dentro de Europa, España se sitúa en una posición intermedia, con unos 22.000 casos nuevos cada año, con un mayor número de casos en Asturias y País Vasco. En 2016, la mortalidad se situó en 11.781 personas, un 2,2% más que en 2015.

Tanto en España como en el resto de países occidentales se observa un progresivo aumento de la incidencia, así como una variación con respecto a la edad, aumentando los diagnósticos de forma significativa a partir de los 50 años. En España, la supervivencia media a los 5 años es de un 61,5%, situándose unos puntos por encima de la media europea que es de un 56,2%. Esta supervivencia va a depender del estadio en el que se encuentre la enfermedad en el momento del diagnóstico. En estadio I la supervivencia a los 5 años es de un 95-100%, 70-85% en estadio II, 50-70% en estadio III y por último de un 5-15% en estadio IV (Berrino et al. 2007; Ribes et al. 2009).

La localización de los tumores a lo largo del intestino grueso varía, siendo la zona del recto la zona con mayor frecuencia (37% de los casos), la región sigmoide presenta un 31% de los casos, seguida del colon ascendente (9%), ciego (8%), colon descendente (5%), colon

transverso y ángulo hepático (4%) y finalmente el ángulo esplénico con un 2% de todos los casos (Piñol et al. 2004).

La mayoría de los casos de CCR se deben a factores ambientales, atribuyéndose menos del 10% de los casos a CCR hereditarios. Los dos tipos de CCR hereditarios más frecuentes son el síndrome de Lynch, que supone el 2-5% de todos los casos, y la poliposis adenomatosa familiar (PAF) con menos del 1% del total. Aun así, se estima que entre el 15-20% del total de casos de CCR pueden deberse a alguna causa hereditaria que no ha sido aún identificada (Kuipers et al. 2015).

1.2.2. Desarrollo del cáncer colorrectal

El CCR es una enfermedad muy heterogénea, causada por factores que se van agregando, como mutaciones genéticas o alteraciones epigenéticas, que acaban alterando genes que intervienen en procesos regulatorios o que modifican la diferenciación celular normal en el colonocito (Fléjou 2011).

Las etapas iniciales de un proceso tumoral en la mucosa del colon se desarrollan en las criptas, presentes a millones en este tejido. Estas criptas son invaginaciones tubulares formadas por unas pocas decenas de células estructuradas en varias capas organizadas en profundidad (Humphries & Wright 2008).

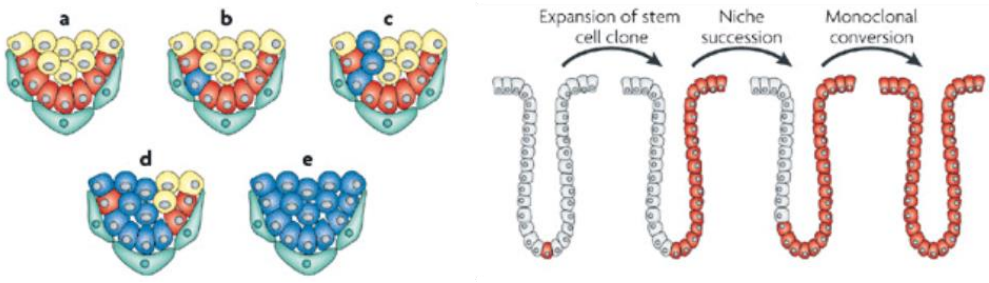

Figura 3: Esquema de generación de una célula madre tumoral (en azul) con crecimiento descontrolado por una mutación génica. Las posteriores divisiones de esta célula madre aberrante generan una cripta con todas sus células tumorales (Humphries & Wright 2008).

En el fondo de cada cripta se encuentran las células madre de la mucosa del colon, que serán las encargadas de llevar a cabo los procesos de multiplicación celular continua necesarios para mantener la estructura y función de este epitelio. Estas células madre reciben las señales para su multiplicación celular desde los miofibroblastos pericrípticos que las rodean en la

base de la cripta. La división de estas células madre puede dar lugar a más células madre o a células descendientes ya diferenciadas hacia células progenitoras de los diferentes tipos celulares presentes en el colon. Estas células progenitoras se sitúan en la zona intermedia de las criptas de la mucosa, y su división y diferenciación da lugar a las células diferenciadas que se encuentran en la zona superior de cada cripta y en toda la superficie de la mucosa del colon [Figura3].

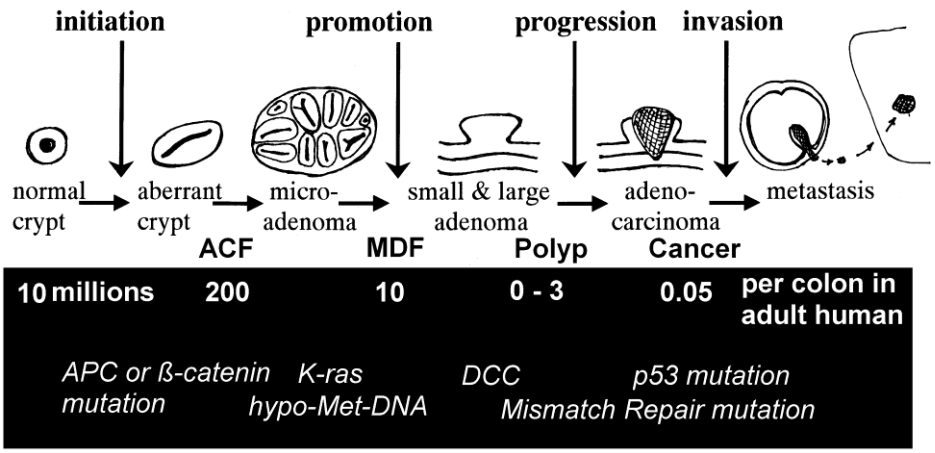

Figura 4: Esquema de la evolución desde una cripta normal hasta un adenocarcinoma, pasando por las etapas intermedias de foco de cripta aberrante (ACF), microadenoma y adenoma grande (pólipo) (Bruce & Corpet 1996).

Si una de las células madre situadas en el fondo de una cripta sufre mutaciones que la convierten en tumoral con crecimiento descontrolado, sus descendientes, también tumorales y con crecimiento descontrolado, van a ir expandiéndose por toda la cripta, reemplazando a las células madre normales y al resto de células progenitoras normales, y dando lugar eventualmente a una cripta con forma aberrante (ACF), luego a un microadenoma en este lugar de la mucosa, a un adenoma grande (pólipo), y finalmente a un adenocarcinoma que generará con el tiempo metástasis (Kinzler & Vogelstein 1996; Bruce & Corpet 1996) [Figura 4].

Cada adenoma se puede clasificar según su grado de displasia (bajo o alto) y por la presencia de componente velloso (adenoma tubular, túbulo-velloso o velloso). Los adenomas con displasia de alto grado y componente velloso tienen más probabilidad de transformarse a carcinoma. En estos tipos, el riesgo de desarrollar carcinoma pasa de un 25,4% a los 55 años a un 41,8% a los 80 años (IJspeert et al. 2015).

Los casos esporádicos de CCR, por la tanto, son el resultado de la acumulación de mutaciones en el colonocito (en las células madre de sus criptas). Existen tres vías principales para que este proceso ocurra, la vía de la inestabilidad cromosómica, la vía de la inestabilidad de los microsatélites, y la vía serrada.

En la vía de la **inestabilidad cromosómica** se produce una activación gradual debida a mutaciones en oncogenes y a la inactivación de genes supresores tumorales. Los principales protooncogenes que se activan aquí son *kras* o *c-myc.* Además, se inactivan genes supresores tumorales, como *apc*, *tp53* o la heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 18. El 70% de los casos de CCR son debidos a esta vía (Bhalla et al. 2013).

La inactivación del gen *apc* produce la activación permanente de la señalización Wnt/β-catenina, acumulándose β-catenina en el citoplasma, que finaliza translocándose al núcleo, donde actúa de coactivador del factor de transcripción TCF/LEF, el cual va a finalizar activando genes involucrados en el crecimiento y proliferación celular. Otro mecanismo implica la mutación en el gen *kras,* que está mutado en el 30-50% de los casos de CCR. *Kras* pertenece a la familia de los oncogenes *ras,* que actúan sobre el ciclo celular y la inducción a apoptosis. Las mutaciones en *kras* interrumpen las vías de señalización normales y la célula se descontrola. El gen supresor *tp53* es otro de los genes que suelen estar mutados en CCR, produciendo una desregularización del ciclo celular. Finalmente, las deleciones en el brazo largo del cromosoma 18, donde se encuentran varios genes supresores tumorales, como *smad4*, acaban generando características de mayor invasividad en los procesos de CCR (Ogino et al. 2007; Esteller et al. 2000) [Figura 5].

En la vía de la **inestabilidad de microsatélites** se produce una hipermutación génica debida a fallos en el sistema de reparación de desapareamientos de bases (*mismatch repair system*). Este complejo proteico se encarga de detectar desajustes en el ADN, uniéndose a la hebra incorrecta de ADN y reparando el error en las bases incorrectas afectadas. Cuando el sistema funciona de forma incorrecta se acumulan así mutaciones como inserciones o deleciones en microsatélites, que van a acabar dando lugar a un proceso de CCR. Esta vía es la responsable del 10-15% de todos los casos de CCR esporádicos (Geiersbach & Samowitz 2011).El grado de inestabilidad en los microsatélites se puede clasificar de bajo grado, de alto grado o estables. En las mutaciones de alto grado se puede producir el silenciamiento del gen *mlh1*, situado en el cromosoma 3. Este gen está involucrado en corregir errores en el ADN

producidos durante la replicación. En las alteraciones de bajo grado o estables, los tumores se acaban produciendo por la vía de la inestabilidad cromosómica y tienen peor pronóstico que los que ocurren por inestabilidad de microsatélites de alto grado (Fang et al. 1999) [Figura 5].

Por último, en el caso de la **vía serrada,** los pólipos generados tienen una forma dentada e irregular muy característica. En este caso se producen mutaciones diferentes a las de la vía APC, ya que afectan principalmente al gen *braf* (codificador de una proteína quinasa), que juega un papel importante en la regulación de la ruta de señalización MAPK/ERK, la cual afecta a la división, diferenciación y secreción celular. Esta vía es la responsable de entre el 15 al 30% de los casos de CCR (Snover 2011; Jass 2007). Estas mutaciones en *braf* activan la señalización de la ruta MAPK/ERK, cuya cascada activa efectores que van a inducir proliferación celular incontrolada, angiogénesis, invasividad y al final metástasis. En la vía serrada también se silencian genes implicados en la cascada de señalización por p16. Esta cascada inhibe quinasas, impidiendo así, que se produzca la fosforilación y activación de la proteína supresora de tumores del retinoblastoma (pRB), que es la encargada de inhibir la entrada en mitosis hasta que la célula no esté correctamente preparada (Mundade et al. 2014) [Figura5].

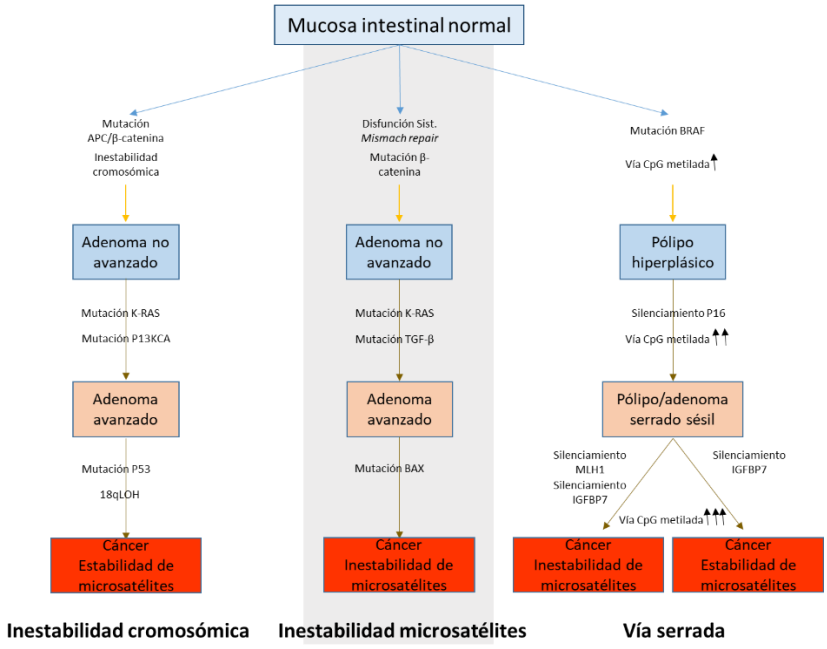

Figura 5: Esquema resumido de las 3 vías principales de oncogénesis en CCR.

Debido a toda esta heterogeneidad de vías posibles y de modificaciones dentro de ellas, cada tumor colorrectal tendrá su propia combinación de alteraciones genéticas, lo que afectará a su diagnóstico y tratamiento.

1.2.3. Cáncer colorrectal hereditario

Las formas hereditarias de este cáncer afectan a menos del 10% del total de pacientes y se pueden clasificar en varios tipos de síndromes que pueden finalmente desembocar en un cuadro de CCR.

El síndrome de Lynch es el tipo más común y está implicado en el 2-4% de los casos de CCR, Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante. Tiene una alta penetrancia y el CCR producido a partir de esta enfermedad es de aparición temprana, en torno a los 45 años, mientras que en la población general está por encima de los 67 años. Además, la población afectada tiene mayor riesgo de padecer cáncer extraintestinal (Ma et al. 2018). En este síndrome se producen mutaciones que afectan a uno de los alelos de los genes involucrados en la reparación de daños en el ADN, principalmente *mlh1* y *mlh2* (90% de los casos), *msh6* (10% de los casos) y *pms2* (en casos muy raros). La mutación de estos genes de reparación va a producir fallos en la síntesis de ADN e inestabilidad de microsatélites. Los pacientes con síndrome de Lynch tienen un 50% más de riesgo de padecer CCR, aunque no se observa en ellos un aumento del número de pólipos adenomatosos (Lynch et al. 2009).

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) representa el segundo tipo de CCR hereditario más común, con el 1% del total de casos. Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante debida a una mutación del gen supresor tumoral *apc*, situado en el cromosoma 5q21. Su sintomatología más clara es la aparición de cientos de pólipos en el intestino grueso en edades tempranas, ya que antes de los 35 años los pacientes desarrollan multitud de pólipos adenomatosos que comienzan como focos de criptas aberrantes y finalizan siempre con la aparición de CCR (Petersen et al. 1991a).

En esta enfermedad, sólo el 1% de los pólipos va a dar lugar a un tumor, por lo que hay eventos posteriores a la mutación del gen *apc* que favorecen el desarrollo del mismo. Se trata aquí de otras mutaciones, como las que afectan a *kras* o *tp53*., Estos dos genes por sí solos no son capaces de iniciar el proceso oncológico, pero combinados con *apc* sí.

La principal acción de la proteína APC es modular la cascada de señalización Wnt, APC se une a axina y a otros cofactores para degradar el exceso de β-catenina y evitar que se acumule en el interior celular. Si el gen *apc* esta mutado, no se forma el complejo APC-axina y la β-catenina se acumula en el citoplasma, translocándose al núcleo, donde afecta a la transcripción de genes de proliferación como *tcf* y a la activación de la vía de señalización Wnt, necesaria para mantener la homeostasis de las criptas intestinales (Drost et al. 2015).

En la **poliposis adenomatosa familiar atenuada (aPAF)** s los pacientes tienen menos de 100 pólipos y un riesgo mucho más leve de padecer CCR. El 10% de los pacientes de aPAF tienen mutado el gen *apc,* y el 7% el gen *mutyh* (Brosens et al. 2016).

En la **poliposis asociada a MUTYH (PAM),** se produce un síndrome recesivo causado por mutaciones en el gen *mutyh*, que codifica una proteína implicada en la reparación del ADN mediante la vía de escisión de bases. En este síndrome aparecen hasta 100 adenomas en la mucosa del colon, aumentando el riesgo de padecer CCR de un 43% a un 100% a los 48 años de edad (Kantor et al. 2017).

En el **síndrome de Peutz-Jeghers,** se produce una hiperpigmentación de melanina y pólipos hamartomatosos intestinales. Estos pólipos son tumores no neoplásicos constituidos por tejido conectivo, y están cubiertos por la mucosa, pudiendo generar CRC. Los pólipos aparecen con un 96% de probabilidad en el intestino delgado, un 25% en el estómago y en un 30% en el colon. El riesgo a padecer un cáncer gastrointestinal durante la vida del paciente es de un 70%.

Este síndrome cursa, en el 90% de los pacientes con una mutación en el gen *stkii*/*lkbi*, aunque no se puede establecer un genotipo completo claro. La proteína LKBI regula varios procesos del ciclo celular y la apoptosis mediada por la ruta p53, pero además, una deficiencia en este gen puede causar daños directamente en el ADN (Beggs et al. 2010).

El **síndrome de la poliposis juvenil** es dominante y está causado por una mutación, en el 50-60% de los pacientes, del gen *smad4* o *bmpr1a*, que regula la proliferación y diferenciación celular. Los pacientes tienen criptas dilatadas con inflamación a nivel del epitelio y al menos 3 pólipos, de forma esférica, en el colon y estómago, que pueden causar sangrado y anemia. Además, el riesgo de CCR varía entre un 9 y un 50% en estos pacientes (Brosens et al. 2011).

El **síndrome tumoral PTEN Hamartoma** es un conjunto de síndromes con herencia dominante, causados por la mutación del gen *pten*. Este gen es un supresor tumoral localizado en el cromosoma 10. La proteína que codifica posee actividad fosfatasa y regula el crecimiento y reparación el ADN. Su deficiencia conduce a una proliferación descontrolada y a una neoplasia intraepitelial. Estos pacientes tienen pólipos a lo largo del colon y riesgo a padecer tumores en otras localizaciones (mama, endometrio o tiroides) (Jelsig et al. 2014).

Finalmente, el síndrome de la poliposis serrada es de causa genética desconocida. Aquí el CCR se desarrolla por la vía serrada. En este síndrome aparecen alguna de estas características: aparición de al menos 5 pólipos serrados proximales cerca de la zona sigmoide (siendo al menos 2 o más pólipos mayores de 10 mm), aparición de pólipos serrados en la zona proximal (en el caso de un individuo con antecedentes familiares) o aparición de más de 20 pólipos serrados a lo largo de todo el colon. La edad media de aparición es de 55-65 años y estos pacientes tienen un riesgo de más del 50% de padecer CCR (Crowder et al. 2012).

1.2.4. Factores que influyen en la aparición de CCR

Más del 90% de los casos de CCR son esporádicos, se deben a causas no hereditarias. Un 65-75% de todos los casos son evitables y están relacionados con el estilo de vida, jugando la dieta un papel fundamental. Hay diversos factores que aumentan el riesgo de padecer CCR asociadas a un estilo de vida occidental, aunque también nos encontramos con factores protectores en el desarrollo de esta enfermedad.

Respecto al consumo de **carne roja y procesada,** existen numerosos estudios que evidencian una causalidad entre el mismo y el riesgo a padecer CCR. El consumo de carne roja de forma elevada puede implicar un mayor riesgo a sufrir cáncer en el recto, debido a que ésta contiene diferentes componentes de riesgo, como la hemoglobina, u otros producidos durante un cocinado intenso, como las aminas heterocíclicas, los hidratos de carbono policíclicos o los compuestos nitrosos. Todos ellos producen aductos en el ADN, estrés oxidativo y compuestos genotóxicos y mutagénicos (Cascella et al. 2018).

En 2015, la IARC *(International Agency for Research on Cancer*) evaluó la carcinogenecidad de la carne roja y de los alimentos cárnicos procesados (por curación,

ahumado, fermentación, salado o con otros conservantes) revisando más de 800 estudios epidemiológicos. Por ejemplo, en 12 de 18 estudios de cohortes, en Japón, Europa y EEUU se observaron asociaciones positivas entre el consumo de estos productos y el desarrollo de CCR. Se observó un 17% de incremento del riesgo de CCR por cada 100 g de consumo diario de carne roja y un 18% por cada 50 g al día de carnes procesadas.

Tras este estudio, la OMS (Organización Mundial de la Salud) clasificó a la carne procesada dentro del grupo 1, como agente carcinógeno para humanos). Además publicó que existe una suficiente evidencia entre el CCR y el consumo de carne roja, que fue clasificada dentro del grupo 2ª (posible agente carcinógeno en humanos)(Bouvard et al. 2015; Chan et al. 2011).

Por el contrario, el consumo elevado de fibra se ha relacionado con un efecto protector sobre el CCR. Diversos estudios asocian un consumo elevado de frutas (fuente de fibra soluble) con una reducción del riesgo de padecer CCR. Sin embargo, en varios estudios con cereales y alimentos ricos en fibras insolubles no se observan diferencias (Koushik et al. 2007; Terry et al. 2001).

Algunos autores sugieren que algunos componentes de la pared celular vegetal, como la lignina o la suberina, pueden adsorber aminas heterocíclicas en el tubo digestivo, protegiéndolo frente al CCR (Harris et al. 1996). El consumo de fibra en los países occidentales generalmente es bajo, por debajo de los 21 g diarios recomendados(Peters et al. 2003).

En algunos estudios se observa una reducción del número de casos de CCR asociada al consumo de ácido fólico. Un estudio epidemiológico, por ejemplo, describe una reducción de 68 a 15 casos de CCR por cada 10.000 mujeres de 55 a 69 años en una población de enfermeras cuando se comenzó a tomar ácido fólico de forma prolongada en el tiempo y en concentraciones moderadas (Jacobs et al. 2003; Giovannucci et al. 1998).

El **calcio y** la **vitamina D** son micronutrientes que ayudan a reducir el riesgo de CCR, evitando la proliferación celular descontrolada y promoviendo la diferenciación celular. Existen estudios que muestran que, por lo general, las regiones de zonas geográficas más septentrionales tienen mayor riesgo de CCR que las zonas más meridionales, debido principalmente a los cambios en los niveles de vitamina D (por déficit de radiación solar).

La vitamina D inhibe la vía Wnt-β-catenina, que es una de las principales rutas de generación de CCR esporádico (Pritchard et al. 1996; Ryan-Harshman & Aldoori 2007). También se observa un efecto beneficioso en el caso del calcio (Boutron et al. 1996; De Stefani et al. 1997). Estudios recientes sugieren que la vitamina D y el calcio pueden actuar de manera conjunta, ya que la suplementación con calcio no reduce la aparición de adenomas cuando los niveles de vitamina D están por debajo de 29,1 ng/ml. Además, la suplementación con vitamina D se asocia a un menor riesgo de CCR cuando los pacientes reciben suplementos de calcio (Grau et al. 2003).

En el caso del etanol, por sí mismo no tiene un efecto carcinogénico directo en el intestino, sino un subproducto de su metabolismo, el acetaldehído, que es un potente compuesto mutagénico. Una ingesta de 30 g/día de alcohol se asocia a un incremento del 16% del riesgo de CCR y una dosis de 45 g/día eleva el riesgo a un 41% (Giovannucci et al. 1993). Además, a largo plazo, el alcohol puede limitar la absorción de vitamina D y aumentar los daños por estrés oxidativo en la mucosa intestinal (Pritchard et al. 1996).

Por otro lado, el tabaco está establecido como cancerígeno y los estudios epidemiológicos así lo demuestran, aumentando un 38% el riesgo de CCR en fumadores habituales y un 18% en fumadores ocasionales, en comparación con personas no fumadoras. También se observa un efecto dosis, ya que los fumadores de menos de 30 cajetillas/año incrementan un 19% su riesgo, frente al 258% que se incrementa a los que fuman más de 30 cajetillas/año. El tabaco se asocia con tumores que poseen mutaciones en *TP53* y *BRAF*, con alta inestabilidad de microsatélites, por lo que no activa la vía clásica pólipo-carcinoma, sino que se observa una activación de la vía serrada (Tsoi et al. 2009; Fagunwa et al. 2017).

En la mayoría de estudios hay una correlación negativa entre el riesgo de CCR y un buen estilo de vida. Algunos estudios muestran hasta una reducción del 40% del riesgo en personas con una actividad física regular, que va a depender de la intensidad, la duración y el tipo de actividad (Vainio et al. 2002). También se observa una asociación entre el contenido en grasa corporal y un aumento del riesgo, mayor en personas con un índice de masa corporal superior a 30, sobre todo en varones, donde la grasa se acumula principalmente en la región abdominal (Sodagari et al. 2015a).

Finalmente, respecto a la **quimioprevención,** se observa una reducción del riesgo de CCR asociado al consumo de ciertos antiinflamatorios, como el ácido acetilsalicílico, cuando se

administra de forma prolongada (más de 10 años) y a dosis mayores de 300 mg/día. El efecto de la aspirina se basa principalmente en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas derivadas de ácido araquidónico, implicadas en invasión, angiogénesis y crecimiento celular (Sehdev & O'Neil 2015).

Otro ejemplo de fármaco con cierta actividad preventiva es la metformina, usada en el tratamiento de la diabetes de tipo II. Este fármaco reducía un 15% el riesgo de padecer CCR y causaba un descenso en el número de focos de criptas aberrantes. Su actividad anticancerígena puede deberse a una reducción de la hiperglucemia, que puede limitar el efecto Warburg en las células tumorales, así como a la inhibición de la proliferación celular por la reducción de factores de crecimiento como insulina o leptina (Sehdev et al. 2015; Pierotti et al. 2013).

1.2.5. Microbiota y CCR

La microbiota intestinal es un complejo ecosistema formado por más de 1.000 especies diferentes. En humanos, a nivel de filo predominan los *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguidos de *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, con otros minoritarios como *Verrumicrobia* y *Fusobacteria*. La composición general puede sufrir variaciones dependiendo del estado general del individuo y de su alimentación. Por ejemplo, en dietas con predominancia de productos cárnicos, aumenta la proporción de los géneros *Bacteroides* (filo *Bacteroidetes*) y *Ruminococcus* (filo *Firmicutes*), mientras que en dietas ricas en vegetales aumentan géneros como *Prevotella* (filo *Bacteroidetes*) (Damman et al. 2012; Qin et al. 2010).

Esta microbiota intestinal aporta importantes funciones fisiológicas (O'Hara & Shanahan 2006) :

a) Degradación de productos no digeribles por el tracto gastrointestinal (como fibras prebióticas) y su transformación en compuestos con valor nutricional (como ácidos grasos de cadena corta).
b) Detoxificación de productos derivados del metabolismo.
c) Señalización para la renovación celular.
d) Prevención de la colonización por patógenos.
e) Secreción de productos beneficiosos como ácidos grasos de cadena corta, lactato, bacteriocinas, etc.

f) Fortalecimiento del sistema inmune.
g) Regulación del estado fisiológico de órganos lejanos, como el músculo cardíaco o las funciones cerebrales.

En situaciones de CCR, el balance *Firmicutes*/*Bacteroidetes* puede jugar un papel crítico en la progresión de la enfermedad. Se observa una clara asociación entre la abundancia de determinadas poblaciones como las de *Fusobacterium*, *Escherichia coli*, bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno (familia *Desulfovibrionaceae*) y degradadoras de ácidos biliares, y el incremento en el riesgo de CCR. También se observa un descenso de la abundancia de *Clostridium*, *Roseburia, Eubacterium* y otras bacterias productoras de butirato en pacientes con adenomas, respecto a controles sanos (Marchesi et al. 2011; Zeller et al. 2014).

Además de estas diferencias en la composición microbiana entre pacientes e individuos sanos, el metabolismo intestinal también difiere, observándose un aumento de enzimas degradadoras de fibra, por lo que la microbiota de individuos sanos permite una mayor utilización de la fibra. En cambio, en el colon de los pacientes con CCR se observa un mayor porcentaje de energía derivada directamente desde componentes celulares (Zeller et al. 2014).

Una revisión pormenorizada de la composición microbiana en casos de CCR muestra un aumento de las poblaciones bacterianas de *Fusobacterium, Alistipes, Porphyromonadaceae, Coriobacteridae, Staphylococcaceae* y *Methanobacteriales,* así como una disminución de las poblaciones de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* y *Roseburia*. Así mismo, en situaciones de CCR parece existir una clara correlación entre el incremento del metabolismo de aminoácidos y una disminución de metabolitos protectores, como el butirato (Borges-Canha et al. 2015).

La inflamación contribuye tanto a la iniciación como a la progresión tumoral, por lo que en diversos modelos animales se ha observado la implicación de bacterias proinflamatorias en el desarrollo del CCR. En los adenomas, por ejemplo, se producen alteraciones de la barrera intestinal, permitiendo que compuestos de origen bacteriano promuevan el crecimiento tumoral mediado por IL-23/IL-17, o activando respuestas inmunes de tipo T-*helper* 17T, promotoras de procesos de tumorogénesis (Wu et al. 2009).

Un ejemplo de esta activación de rutas proinflamatorias mediada por algunos tipos bacterianos se observa cuando se inoculan cepas comensales como *E. coli* NC101 en ratones $IL10^{-/-}$ tratados con azoximetano (AOM), un agente inductor de CCR. Se produce entonces el desarrollo de carcinomas invasivos debido a la liberación de genotoxinas. Sin embargo, al utilizar cepas mutadas en los genes de estas genotoxinas, se reduce la carcinogénesis en este modelo animal. Otro ejemplo son las infecciones crónicas por *Salmonella*, que producen inflamación persistente, aumentando el riesgo de CCR. La acetiltransferasa AvrA secretada por *Salmonella* altera la ubiquitinación y la acetilación de proteínas del colonocito, desubiquitinando y estabilizando la β-catenina, impidiendo por tanto su degradación y aumentando la tumorogénesis y la progresión tumoral (Petersen et al. 1991b; Lu et al. 2014).

Éstas y otras evidencias demuestran la relación entre microbiota y CCR, pero es muy difícil observar una causa directa a nivel de especies en la mayoría de los casos. La microbiota se debe entender como un conjunto de microorganismos que se encuentran de forma balanceada, en el que determinados cambios en su proporción o la aparición de ciertos grupos bacterianos pueden producir unos efectos promotores de estados de enfermedad. El consumo de una correcta alimentación, rica en fibras y baja en grasas saturadas, el uso de probióticos, prebióticos o los trasplantes de microbiota fecal pueden ser técnicas que nos permitan modificar nuestra microbiota intestinal y balancearla hacia una composición poblacional que sea más beneficiosa para la salud del individuo, también en el caso del CCR (O'Keefe et al. 2015).

1.2.6. Cribado del CCR

El CCR es una enfermedad silenciosa en la que los síntomas son difusos y suelen aparecer en estadios tardíos de la enfermedad, lo que dificulta su tratamiento posterior. Las recomendaciones de cribado poblacional van a depender del riesgo personal, historia familiar de cáncer, enfermedades inflamatorias y otros factores. La Sociedad Americana de Cánceres Digestivos recomienda un cribado a la población general a partir de los 50 años y hasta los 75 años (Smith et al. 2013). Los métodos más usados son el test de sangre oculta en heces, el enema con doble contraste de bario, la tomografía de colon, la sigmoidoscopia flexible y la colonoscopia.

El **test de sangre oculta en heces** es muy barato y el menos invasivo. Consiste en detectar la presencia del grupo hemo de la hemoglobina en heces, lo que nos indicaría presencia de sangrado. Se pueden dar falsos positivos por interferencia de alimentos u otras patologías (como úlcera duodenal). Su sensibilidad es mayor del 95% para detectar CCR, y del 90% para detectar pólipos adenomatosos de alto riesgo. Sin embargo, su especificidad no supera el 50%. Es un test ideal para un cribado general y muy fácil de usar (Carroll et al. 2014).

El enema de doble contraste de bario consiste en realizar una radiografía en la que se administra bario y aire en el colon para observar con mayor contraste anormalidades del colon. Sin embargo, aproximadamente un 22% de los casos pueden ser falsos negativos, dependiendo de la capacidad del médico para interpretar los resultados. Es un test invasivo y se necesita cierta preparación previa (Toma et al. 2008).

La tomografía colónica se realiza con un equipo especial de rayos X, mientras que con un pequeño colonoscopio se inyecta aire para tomar imágenes con buena resolución. Tiene una sensibilidad del 94% para pólipos de menos de 10 mm y del 89% para pólipos menores de 6 mm. Se requiere cierta preparación, pero tiene ventajas frente a la colonoscopia ya que no se necesita sedación, teniendo además un menor riesgo de sangrado y de perforación intestinal (Patel & Chang 2016).

La sigmoidoscopia flexible consiste en una endoscopia limitada a la observación del recto y la parte más distal del colon. Su principal limitación es detectar lesiones en la zona central y proximal del colon.

Por último, la **colonoscopia** permite una visualización directa de todo el colon y es la mejor prueba para detectar un posible CCR. No se utiliza como primer cribado debido a que es un método muy invasivo, costoso y lento, que requiere sedación del paciente y que entraña ciertos riesgos (menos del 0,1% de riesgo de perforación). Es el método de confirmación de CCR definitivo (Stracci et al. 2014).

1.2.7. Tratamiento del CCR

El tratamiento del CCR va a depender en gran medida del estadio en que se encuentre el paciente. En estadios 0 (intraepitelial o invasión de lámina propia), I (submucosa T1 o muscularis propia T2) y II (no afectación de tejidos pericolónicos y perirrectales T3 o

afectación a tejidos u órganos adyacentes T4) la supervivencia relativa a los 5 años es del 90%. En estadio III (afectación de nódulos linfáticos regionales), la supervivencia baja al 70% y en estadio IV (metástasis distantes), la supervivencia cae hasta un 20% (Uranga et al. 2017)

Los primeros estadios (I y II) tienen un buen pronóstico y la cirugía local es el mejor tratamiento, aunque a veces, en un 20-50% de los casos, se producen recidivas. El tratamiento quirúrgico más radical es la escisión total del mesorrecto, que en pacientes con estados avanzados se combina con radioquimioterapia adyuvante.

Un 25% de los pacientes diagnosticados con CCR han desarrollado ya metástasis y un 50% de los pacientes la desarrollará en el transcurso de la enfermedad ya diagnosticada. En estos casos más avanzados, los tratamientos más utilizados son los quimioterápicos (Xiong & Ajani 2004).

Actualmente hay 10 fármacos aprobados para tratar CCR. La mayoría de ellos son fármacos convencionales, como el 5-fluorouracilo (5-FU), la capecitabina, el oxaliplatino y el irinotecan. Pero también existen fármacos antiangiogénicos, como los anti-VEGF o anti-VEGFR (bevazicumab, ziv-aflibercept, ramucirumab y regorafenib), y anticuerpos anti-EGFR (cetuximab y panitumumab).

El 5-FU es un análogo de pirimidina que actúa bloqueando la síntesis de ADN y ARN mediante el bloqueo de la timidilato sintasa. En su administración por vía sanguínea se combina con leucovorina, un análogo del ácido fólico que potencia los efectos del 5-FU. Un derivado muy usado del 5-FU es la capecitabina, ya que se administra de forma oral y luego en el tracto gastrointestinal se transforma enzimáticamente a 5-FU.

Las combinaciones de fármacos son muy frecuentes en los tratamientos de CCR, ya que se reducen así las dosis de los fármacos individuales y aumenta la supervivencia de los pacientes. Combinaciones usadas frecuentemente son el 5-FU con oxaliplatino (un agente alquilante), o con irinotecán (un inhibidor de la topoisomerasa I). Incluso existen combinaciones de los tres agentes (FOLFOXIRI), aumentando la supervivencia, aunque se producen efectos secundarios como neurotoxicidad o neutropenia (Juretić 2017; Gustavsson et al. 2015; Mahipal & Grothey 2016). En la actualidad también se combinan estos tratamientos clásicos con anticuerpos monoclonales frente a VEGF o EGFR.

El uso de anticuerpos conjugados con fármacos y que sean específicos del tejido dañado o bien inhibidores de rutas de señalización que están modificadas en las células tumorales (vía MAPK, RAF, ERF, mTOR, Wnt/β-catenina, inhibidores tirosin quinasa, inhibidores de la histona deacetilasa) permitirá en el futuro disminuir los efectos secundarios y aplicar medicina personalizada (Seeber & Gastl 2016).

1.2.8. Modelos animales de CCR

En los últimos años se han utilizado diferentes modelos animales de CCR para entender mejor la enfermedad, su prevención y tratamiento. Los diferentes tipos de modelos animales se han basado en una inducción del cáncer de diferentes formas, bien de forma espontánea, inducido químicamente, en modelos genéticos, en animales inmunodeficientes o vía trasplantes singénicos (Taketo & Edelmann 2009). Cada modelo tiene ciertas ventajas e inconvenientes, y en este apartado nos vamos a centrar en modelos inducidos químicamente mediante el compuesto azoximetano (AOM) y en los modelos genéticos *apc*.

1.2.8.1. Modelos inducidos químicamente

Los primeros estudios de estos modelos animales surgen a partir de la hidracina. Se observó que al administrar a ratas harina de cicadáceas, una planta que posee fósiles de hace 280 millones de años [Figura 6A], se observaba que algunos animales desarrollaban adenocarcinoma de colon. El carcinogénico que producía el daño tisular era la cicasina [Figura 6B], un metilazoximetanol (MAM). Posteriormente, se descubrió su precursor, la 1,2-dimetilhidracina (DMH). La DMH es un compuesto que genera una forma reproducible de CCR en animales, aunque actualmente se usa mayoritariamente el AOM para generar un modelo espontaneo de CCR. El AOM es el principal metabolito activo de la DMH y posé una serie de ventajas frente a ésta, como que es mucho más potente y es más estable en solución para su administración (Rosenberg et al. 2009).

La isoforma CYP2E1 del citocromo P450produce una hidroxilación del AOM, dando lugar a MAM, que se rompe enzimáticamente en formaldehido y en metildiazonio, un compuesto alquilante que añade grupos metilo en la posición 6 y 7 de las guaninas del ADN. Estas mutaciones en el ADN son las que van a permitir el desarrollo del CCR (Tong et al. 2011).

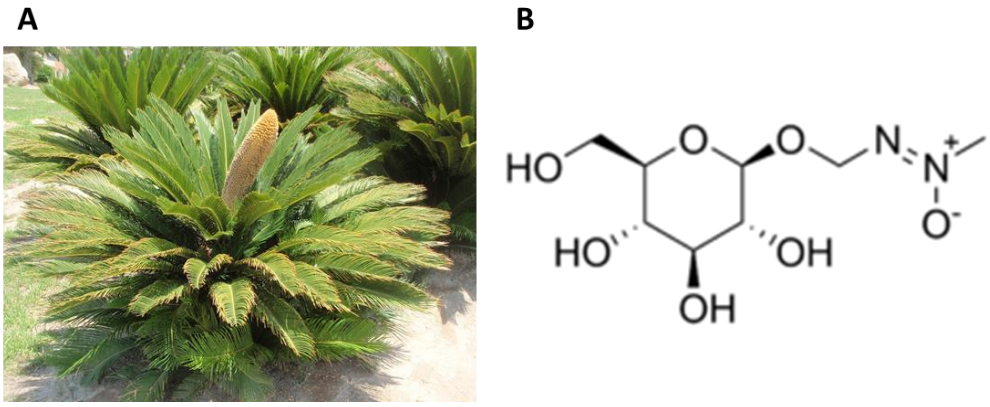

Figura 6: (A) Planta perteneciente a las cicadáceas. (B) Molécula de cicasina.

El AOM causa mutaciones, debido a la formación de aductos O6-metildeoxiguanina, en el codón 12 del gen *kras* pasando de G:C hacia A: T, por lo que el aminoácido glicina se sustituye por un aspartamo en la proteína codificada. Este cambio activa la proteína KRAS, causando una desregularización del crecimiento celular, proliferación y aumento del metabolismo de la glucosa. También se producen mutaciones en los codones 33 y 41 del gen de la β-catenina, que codifican lugares diana para la fosforilación por GSK-3β, una enzima clave en la degradación citosólica de β-catenina. En esta situación, por tanto, no se degrada y su acumulación produce cambios transcripcionales en oncogenes a nivel de núcleo y la siguiente proliferación celular. El AOM también reduce la actividad de TGFβ, inhibiendo sus formas activas, que normalmente son inductoras de apoptosis y bloquean la proliferación y el crecimiento celular (Chen & Huang 2009).

Una de las principales desventajas de este modelo animal inducido de CCR es que no actúa sobre el gen *apc* ni sobre la ruta dependiente de P53, que en humanos representan un alto porcentaje de las alteraciones a nivel genético.

El AOM se puede administrar por diferentes vías, aunque la administración oral es muy poco efectiva. La administración intraperitoneal es la que muestra mayor eficiencia. La forma de administración, el número de dosis y su espaciado, la concentración y el sexo de los animales son factores que van a influir en el resultado final, tanto en el número y tamaño de los tumores como en su grado de diferenciación (Kobaek-Larsen et al. 2000).

El uso de AOM se puede potenciar mediante la adición de DSS, que produce una inflamación continuada capaz de promover el proceso neoplásico. Cuando se combinan AOM y DSS se

mejoran mucho los procesos de inducción de CCR en animales. Por ejemplo, con una dosis intraperitoneal de AOM (20 mg/kg), seguida de una semana de tratamiento con DSS al 1% en agua, se consigue un buen modelo para el estudio de carcinogénesis en tan solo 17 semanas(Tanaka et al. 2009; Fazio et al. 2011).

Una de las principales limitaciones de este modelo de CCR esporádico es que el compuesto carcinogénico AOM/DMH necesita activarse enzimáticamente, y hay que tener mucho cuidado con que los compuestos que vayamos a probar en este modelo no interfieran con los mecanismos enzimáticos implicados en esta activación, como en el caso de inhibidores de CYP2E1. Además, este modelo de CCR metastatiza muy poco, llegando como mucho a afectar los ganglios regionales o el peritoneo. Sin embargo, en el CCR en humanos es muy frecuente que se produzca metástasis en hígado y pulmón. A pesar de estas limitaciones, este modelo inducido de CCR es muy útil para el estudio de terapias emergentes (Perše & Cerar 2011).

1.2.8.2. Modelos animales de CCR genéticos

Los principales modelos genéticos son los producidos en el gen apc e imitan las neoplasias producidas en humanos que se producen en la poliposis adenomatosa familiar.

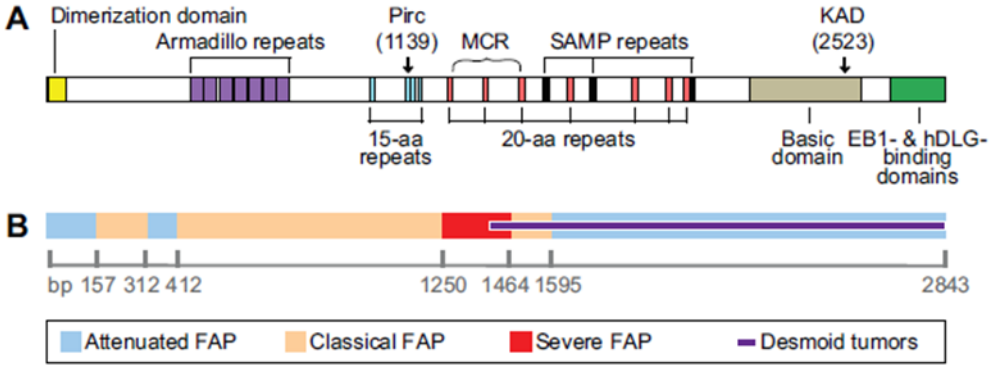

Figura 7: Representación esquemática del gen apc. (A) Estructura del gen *apc* Con las posiciones del dominio de dimerización, el dominio de unión ASEF (repeticiones Armadillo), dominio de unión a β-catenina (15 repeticiones aa), dominio de degradación de β-catenina (20 repeticiones aa), un dominio de unión a axina (repeticiones SAMP), dominio de unión a microtúbulos (dominio básico), y el dominio C- terminal (dominios de unión EB-1 y hDLG). (B) Correlación entre mutaciones y severidad de PAF indicando en que pares de bases ocurren (Irving et al. 2014a).

Dependiendo del lugar de mutación del gen *apc* se va a producir la enfermedad con mayor o menor intensidad. Así, mutaciones entre los codones 1250 y 1464 producen una poliposis

severa, mientras que mutaciones en la zona proximal del codón 157 o en la distal del 1595 producen una poliposis más leve. El gen *apc* codifica una proteína multifuncional que está compuesta por diferentes secciones: un sitio de dimerización (sus mutaciones causan PAF atenuada), un dominio de unión a ASEF, un dominio de unión a β-catenina (sus mutaciones causan PAF clásica), un dominio de degradación de β-catenina (sus mutaciones causan PAF severa), un dominio de unión a axina, un dominio básico (de unión a microtúbulos) y un dominio C-terminal de unión a EB1 y hDLG (sus mutaciones causan PAF atenuada) (Irving et al. 2014b).

Los dos modelos animales derivados de la mutación en *apc* son la poliposis heterocigótica en colon de rata *(Pirc rat)* y la cepa homocigótica Kyoto Apc Delta (*KAD rat*).

La rata $Apc^{Pirc/+}$ (*Pirc rat*) fue desarrollada mediante mutagénesis germinal con el compuesto N-etil-N-nitrosourea (ENU) en la rata consanguínea F344/NTac. De 1360 ratas inducidas a mutación, sólo un macho tenía una mutación en el codón 1137 del gen *apc*. Esta mutación causa un truncamiento de un aminoácido en el segundo dominio de unión a β-catenina y es letal en forma recesiva, por lo que esta cepa de rata se mantiene de forma heterocigota coisogénica y está comercializada por Taconic (Amos-Landgraf et al. 2007).

La rata KAD (F344-Apc^{m1Kyo}) de la Universidad de Kyoto se estableció por mutagénesis dirigida mediante ENU en la rata consanguínea F344/NSIc. Estas ratas son homocigotas para una mutación en el codón 2523 del gen *apc*, sustituyendo G:C por T: A, lo que conduce a la finalización temprana de la proteína. Esta mutación mantiene los dominios de unión a β-catenina, pero carece de los enlaces extra EB-1 y hDLG de anclaje estable β-catenina (Mashimo et al. 2008).

Los tumores en las ratas *Pirc* ocurren antes en los machos que en las hembras, afectando a la multiplicidad y morbilidad. A los 7 meses, en machos aparecen unos 20 tumores de media, mientras que en hembras aparecen una media de 9 tumores. Además, los machos se vuelven moribundos a partir de los 11 meses de edad debido a problemas como sangrado o bloqueos intestinales. Si se añade DSS se observa una potenciación de los resultados, multiplicando por 6 el número de tumores en hembras y más del doble en machos (45 y 56 tumores) tras 140 días de tratamiento. Este modelo muestra una composición tumoral parecida a los humanos, con un 71% de adenomas crecientes, 25% estáticos y un 4% que muestran

regresión, lo que permite un seguimiento tumoral más exacto de lo que sucede en humanos (Irving et al. 2011; Irving et al. 2014a).

El modelo tumoral de rata *KAD*, por el contrario, puede sobrevivir más de 1,5 años sin desarrollar tumores. La forma truncada del gen *apc* está expresada en niveles similares a los que poseen las ratas normales sin la mutación, por lo que la señalización Wnt está intacta. La formación de tumores va a depender aquí de procesos inflamatorios, y así, cuando se les administra AOM (20 mg/kg) y una semana de tratamiento con DSS al 2% se desarrollan más tumores y más grandes en machos (9,5 de media) que en hembras (5,8) tras 15 semanas. Los machos tratados se vuelven moribundos tras 28 semanas y los tumores ocurren al igual que en humanos con mayor frecuencia en el recto y colon distal. Un tercio de los tumores son adenocarcinomas tubulares diferenciados que invaden otras capas del tejido del colon y se asemejan a etapas operables en humanos (Yoshimi et al. 2013; Yoshimi et al. 2009).

Estos modelos se han desarrollado en rata y no en ratón debido a que la estructura genómica de la rata se asemeja más a la humana, con cromosomas metacéntricos, mientras que los cromosomas del ratón son telocéntricos. Además, el mayor tamaño del colon en rata facilita la detección y monitorización de los tumores (Amos-Landgraf et al. 2007). Estos dos modelos son muy útiles para estudiar métodos de detección temprana y tratamientos frente al CCR.

1.3. Nutracéuticos y alimentos funcionales

El término nutracéutico fue acuñado en 1989 por Stephen De Felice a partir de la palabra nutrición y farmacéutica. Se define como nutracéutico a un alimento o parte de dicho alimento que produce beneficios para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Kalra 2003).

Por el contrario, un alimento funcional puede definirse como un alimento que es consumido como parte normal de una dieta y para el cual se han demostrado beneficios fisiológicos que pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas, más allá de la nutrición básica que aporta dicho alimento. La principal diferencia entre nutracéutico y alimento funcional radica que el primero puede ser sólo la parte funcional del alimento, como un extracto de la molécula o compuesto bioactivo presente en el mismo, mientras que el segundo se refiere a todo el alimento (Cencic & Chingwaru 2010).

De todas las familias de nutracéuticos, que incluyen más de 21.000 compuestos, muchos de ellos fitoquímicos, nos vamos a centrar en las de interés en esta tesis y en su relación con las enfermedades intestinales que se han comentado previamente: los ácidos grasos (mono- y poliinsaturados), los flavonoides (en concreto las antocianidinas), los compuestos organosulfurados, los prebióticos (en concreto la inulina y otros menos frecuentes en la naturaleza) y los probióticos.

1.3.1. Prebióticos

El término prebiótico fue acuñado en 1995 por Gibson y Roberfroid, como "un alimento no digerible que afecta beneficiosamente al huésped, estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de un número limitado de bacterias beneficiosas que residen en el colon"(Gibson & Roberfroid 1995). En 2004, Gibson modificó el concepto y lo redefinió como "ingredientes que al ser fermentados selectivamente dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, confiriendo beneficios tanto para la salud como para el bienestar del individuo". Esta definición de prebiótico tiene que cumplir 3 requisitos:

- Ser resistente al hidrólisis ácida de las enzimas digestivas de los mamíferos.
- Ser fermentado por la microbiota intestinal.
- Estimular el crecimiento selectivo y la actividad de las bacterias intestinales relacionadas con la salud.

Finalmente, el concepto fue actualizado por organismos internacionales como Naciones Unidas (FAO) y la asociación científica internacional de prebióticos y probióticos (ISSAP) como "ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios a la salud del individuo"(Corzo et al. 2015; Gibson et al. 2010).

Los prebióticos incluyen, por tanto, oligosacáridos no digeribles que poseen diferentes propiedades químicas, longitudes de cadena, composición, tipo de unión y ramificaciones. Muchos de estos prebióticos se acumulan en los vegetales como fuente de reserva energética como, por ejemplo, en achicoria, ajo, cebolla, agave, alcachofa, etc.

La resistencia a la digestión es debida principalmente al tipo de monómero presente, al tipo de unión entre esos monosacáridos (que no se ve afectada por las amilasas o maltasas del sistema digestivo de mamíferos) y a la conformación anomérica del anillo del monosacárido (D o L). Estas características permiten que el prebiótico llegue intacto al colon, donde es selectivamente fermentado por diferentes microorganismos y sus interacciones a nivel de microbiota intestinal, produciendo como resultado ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), como el butirato o el propionato (Fernández et al. 2015).

Las principales moléculas aceptadas dentro de la definición de prebiótico son los fructooligosacáridos (FOS), que incluyen la inulina y la oligofructosa; los galactooligosacáridos (GOS), la lactulosa y los oligosacáridos derivados de la leche materna (HMO). Como candidatos a esta definición figuran actualmente los oligosacáridos derivados de arabinosa, xilosa, glucosa, isomaltosa, y otros que están en fase de estudio.

1.3.1.1. Estructura química de los prebióticos

Tanto los **FOS** como la **inulina** están presentes en varios vegetales, como la achicoria, la cebolla, el ajo, el puerro o el agave. Estos prebióticos están constituidos por cadenas de fructosas, unidas en ocasiones a una glucosa terminal. Los enlaces glicosídicos son β-(2-1), y generalmente se trata de cadenas formadas por desde 2 a 65 unidades. Dependiendo de su longitud varía su nombre, siendo los FOS aquellos con entre 2 y 10 unidades, e inulina aquellas moléculas con más de 10. Esto implica que los FOS pueden derivar de la inulina por hidrólisis debida a endoglicosidasas (van de Wiele et al. 2007).

El enlace β (2-1) entre estas fructosas no es digerible por las enzimas humanas, llegando estas moléculas intactas al colon, donde ejercen un efecto positivo en el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y una reducción de las poblaciones de *Bacteroides* y *Clostridium* (Macfarlane et al. 2007).

Los galactooligosacáridos se encuentran de forma natural en la leche materna, pero pueden generarse industrialmente mediante transglicosilación, usando β-galactosidasas a partir de lactosa. Esta síntesis genera mezclas de oligosacáridos con diferentes grados de polimerización, normalmente de 2 a 10 unidades de galactosa unidas a una glucosa inicial. Estos enlaces glicosídicos pueden ser de tipo β-(1,1), β-(1,2), β-(1,3), β-(1,4) o β-(1,5). Estas moléculas poseen un potente efecto bifidogénico (Macfarlane et al. 2007).

Los oligosacáridos de leche materna son principalmente GOS (5 g/L) y HMO (10 g/L). Los HMO son carbohidratos complejos constituidos por una lactosa inicial, a la que se unen diferentes monosacáridos por medio de la acción de glicosiltransferasas. Se forman así más de 200 tipos de combinaciones conocidas a partir de glucosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico).

La presencia de fucosa y ácido siálico en posiciones finales de la cadena hace que estos polisacáridos sean indigeribles y promueve así el crecimiento de *Bifidobacterium* en el colon. Estos prebióticos son muy importantes en las primeras fases de la vida del bebé para mantener un crecimiento y una población estable de estas bacterias beneficiosas en el colon. Además, la fucosa y el ácido siálico sirven de defensa frente a patógenos, ya que su estructura es muy parecida a los glicanos del epitelio intestinal donde se adhieren los patógenos (Bode 2006; Barile & Rastall 2013).

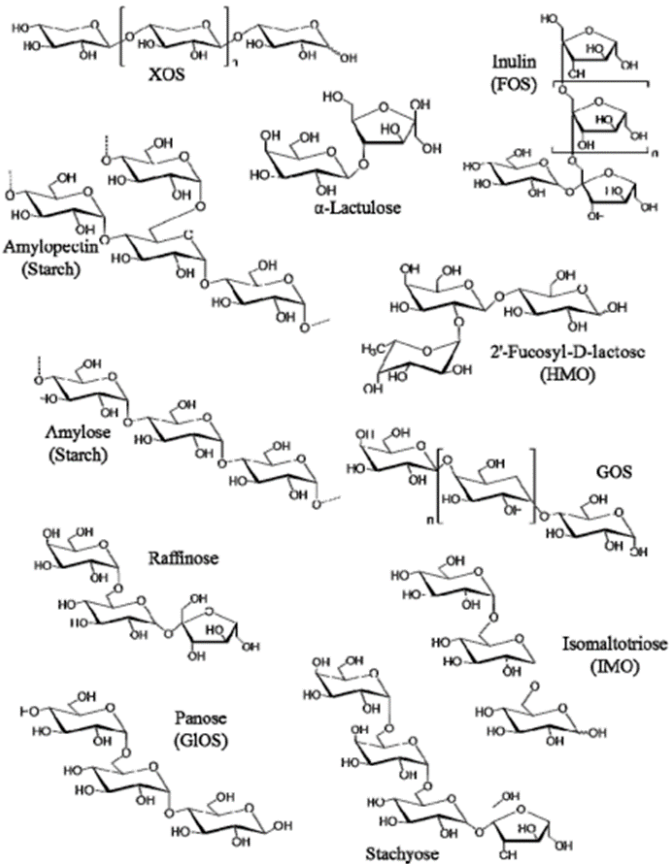

Figura 8: Estructuras químicas de las principales familias de polisacáridos prebióticos (Fernández et al. 2015)

La lactulosa es un disacárido sintético compuesto por galactosa y fructosa unidas por un enlace glicosídico β-(1,4), y que se genera industrialmente por isomerización de lactosa o mediante β-galactosidasas a partir de lactosa y fructosa. La lactulosa no puede ser digerida en el tracto gastrointestinal, por lo que queda disponible para ser utilizado en el colon por la microbiota intestinal, mostrando un gran efecto bifidogénico y disminuyendo las poblaciones de enterobacterias y estreptococos. Además se usa farmacológicamente en casos de estreñimiento, para mantener los niveles de glucosa e insulina y para prevenir o tratar la encefalopatía hepática, reduciendo la absorción de amonio desde el intestino (Panesar & Kumari 2011; Schumann 2002).

A partir de lactulosa, por transgalactosilación, se pueden sintetizar galactooligosacáridos de lactulosa (GOS-Lu), formados por diferentes combinaciones de penta-, tetra-, tri- y disacáridos, principalmente trisacáridos 6´-galactosil-lactulosa y 1-galactosil-lactuosa, y los disacáridos galactosil-galactosa y galactosil-fructosa. El GOS-Lu es por tanto una mezcla polisacarídica compleja (32% DP2, 43% DP3 y 25% ≥DP4) (Hernández-Hernández et al. 2011). Diversos estudios han mostrado que el GOS-Lu no es digerido en el tracto gastrointestinal y que posé un fuerte efecto bifidogénico tanto *in vitro* como *in vivo*, así como un efecto inhibidor de varios factores proinflamatorios en ensayos sobre líneas celulares (Hernández-Hernández et al. 2012; Laparra et al. 2013).

1.3.1.2. Síntesis de SCFAs a partir de prebióticos

La microbiota intestinal utiliza los prebióticos como fuente de energía, fermentándolos y dando lugar a grandes cantidades lactato, piruvato, acetato, propionato y butirato; además de a dióxido de carbono e hidrógeno gas. Se producen también concentraciones menores de otros SCFAs, como valerato y hexanoato. Se estima que por cada 10 g de fibra se genera una concentración de 100 mM de SCFAs en el colon, y que las concentraciones sintetizadas de butirato:propionato:acetato en el colon mantienen normalmente una proporción 1:1:3 (Canfora et al. 2015).

El butirato es el SCFA más importante, ya que va a ser utilizado como fuente de energía en los colonocitos, muestra actividad antiinflamatoria y regula la expresión genética y la inducción de apoptosis en células tumorales. El propionato va a ser absorbido también por los colonocitos y un elevado porcentaje va a pasar a la circulación sanguínea, desde donde

va inhibir la acumulación de colesterol y a producir gluconeogénesis (en el hígado). En el caso del acetato, todo este SCFA absorbido por el colonocito va a pasar al torrente sanguíneo, desde donde va ser transportado a diversos tejidos para ser usado como fuente de energía (Wong et al. 2006).

Existe por tanto un gran interés en identificar bacterias intestinales buenas productoras de butirato, bien mediante aislamiento de las mismas a partir de muestras fecales o por la identificación de enzimas implicadas en la síntesis de butirato. Muchas de las bacterias implicadas en estos procesos pertenecen al filo *Firmicutes*, como *Roseburia spp*., *Anaerostipes spp*. *Eubacterium hallii* y *E. rectale* (familia *Lachnospiraceae*) o *Faecalibacterium prausnitzii* (familia *Clostridaceae*) (Louis et al. 2010).

Con las nuevas técnicas de biología molecular se han podido identificar nuevas enzimas que catalizan las reacciones finales de producción de butirato, y tras comparar sus secuencias con las librerías genómicas bacterianas conocidas se ha visto que están involucradas especies de al menos nueve filos diferentes, además del ya mencionado *Firmicutes*. Entre estos filos productores de butirato destacan *Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes* y *Thermotogae* (Vital et al. 2014).

Así, hay dos vías principales en la síntesis de butirato. Una de ellas parte de la enzima fosfotransbutirilasa, generando butirilfosfato, y este intermediario se transforma en butirato por la acción de la butirato-quinasa, como ocurre en el caso de *Coprococcus eutactus*. La otra vía usa la enzima butiril-CoA-transferasa, que a partir de acetato genera butirato y acetil-CoA. Esta última vía parece ser la más utilizada en el colon, debido a que las concentraciones de acetato son elevadas (Louis et al. 2004; Duncan et al. 2004) [Figura 9].

La producción de SCFAs se realiza por reacciones que ocurren a partir de una colaboración mutualista de numerosas bacterias, como en el caso del género *Roseburia,* capaz de degradar almidón (*Roseburia inulinivorans* degrada fucosa) o *F. prausnitzii,* que degrada inulina. Otras especies bacterianas van a ser capaces de utilizar compuestos intermediarios formados en el colon, como en el caso de *E. hallii* y *Anaerostipes caccae,* que usan el acetato y el lactato para convertirlos en butirato, o *Veillonella spp.,* que convierte el acetato en propionato.

Además del uso de lactato para dar propionato, este SCFA se puede sintetizar a partir de compuestos como fucosa o rhamnosa, como en el caso de *R. inulinivorans* o *R. obeum* mediante la vía del propanodiol. Aunque la vía más común en la síntesis de propionato es a partir del succinato, el cual se forma a partir de la conversión del piruvato en oxalacetato (*Bacteroides, Phascolarctobacterium, Dialister* o *Veillonella*) (Louis et al. 2014; Reichardt et al. 2014) [Figura 9].

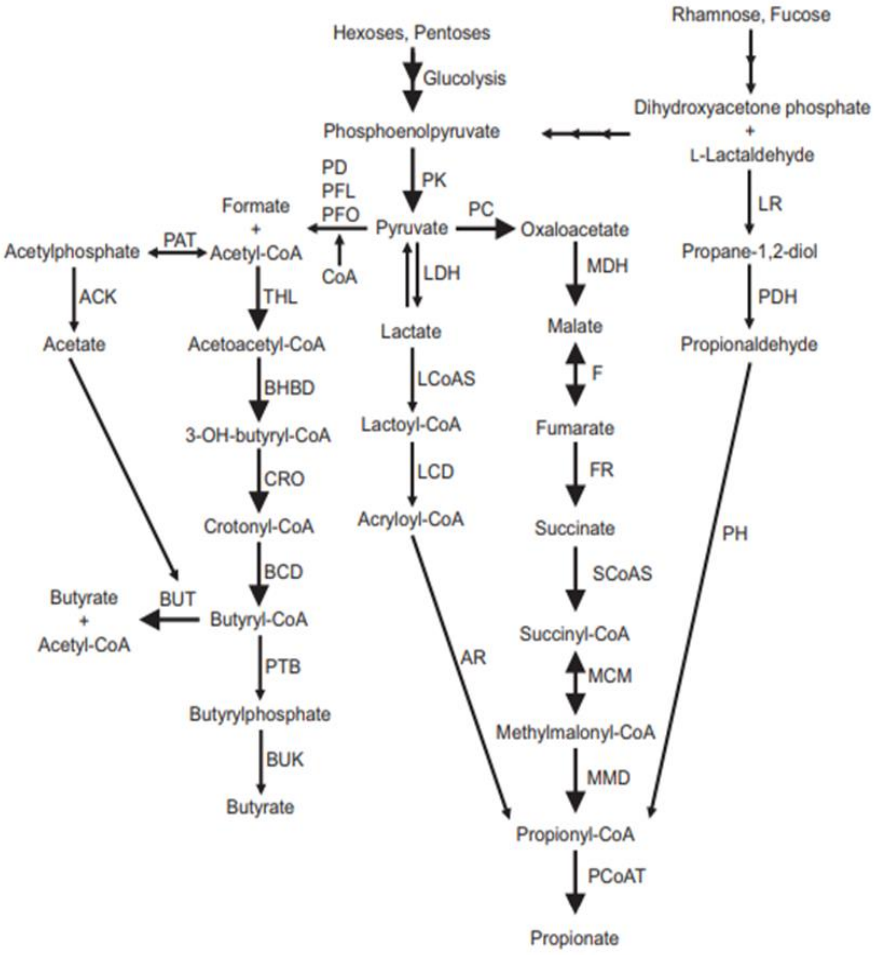

Figura 9: Rutas metabólicas de producción de SCFAs (acetato, propionato y butirato) a partir de la fermentación de polisacáridos prebióticos. PK: Piruvato quinasa; PC: piruvato carboxilasa; MDH: malato deshidrogenasa; F: Fumarasa; FR: Fumarato reductasa; SCoAS: succinil-CoA sintetasa; MCM: Metilmalonil-CoA mutasa; MMD: metilmalonil descarboxilasa; PCoAT: Propionato-CoA transferasa; LDH: Lactato deshidrogenasa; LCoAS: Lactoil-CoA sintetasa; LCD: Lactoil-CoA deshidratasa; AR: acriloil reductasa; LR: Lactaldehído reductasa; PD: piruvato deshidrogenasa; PDH: Propanediol deshidratasa; PH: Propionaldehido deshidratasa; PFL: formiato liasa de piruvato; PFO: piruvato: ferredoxin oxidorreductasa; PAT: fosfato acetil transferasa; THL: tiolasa; BHBD: β-OH-butiril-CoA deshidrogenasa; CRO: Crotonasa; BCD: butiril-CoA deshidrogenasa; PTB: fosfotransbutirilasa; BUK: butirato quinasa; PERO: butiril-CoA: acetil-CoA transferasa; ACK: acetato quinasa (Fernández et al. 2016a).

1.3.1.3. Efectos intestinales de los SCFAs

En la mucosa intestinal en condiciones fisiológicas, el butirato es la principal fuente energética, sobre un 70% del total. En estas condiciones, tras la digestión y asimilación de los nutrientes en el estómago e intestino delgado, los niveles de glucosa y de piruvato que llegan a las criptas de la mucosa del colon son muy escasos, por lo que los colonocitos utilizan como fuente energética el butirato producido tras la fermentación de prebióticos por la microbiota intestinal. En estas condiciones, el butirato es utilizado en la mitocondria del colonocito mediante β-oxidación, manteniéndose los niveles citoplasmáticos de este SCFA siempre bajos en el colonocito (Zhang et al. 1998).

En los colonocitos tumorales, en cambio, la glucosa es la principal fuente de energía, debido a que estas células transformadas sobreexpresan los trasportadores GLUT, tienen muy reducidas el número de mitocondrias funcionales y sufren el efecto Warburg, incrementándose la glucólisis y el uso del piruvato citosólico, que va a ser fermentado a lactato. Por lo tanto, en estas células tumorales que utilizan sobre todo la glucosa, el butirato se acumula en el citoplasma y cuando sus concentraciones son muy elevadas, este SCFA pasa al núcleo celular, causando un bloqueo específico de las histonas deacetilasas (HDACs) y por tanto una hiperacetilación de las histonas. Este proceso conlleva a una conformación relajada de la cromatina, que permite la transcripción de genes proapoptóticos. Esta respuesta es llevada a cabo por el factor de transcripción Sp3, que regula positivamente a las proteínas apoptóticas Bak y p21 [Figura10], induciendo una cascada de señalización que induce apoptosis y el bloqueo del ciclo celular en fase G2/M. Estos efectos también se observan con propionato, pero en menor medida, ya que un porcentaje de este otro SCFA se transfiere desde los colonocitos al torrente sanguíneo (Donohoe et al. 2012; Ruemmele et al. 2003; Heerdt et al. 1997).

Los SCFAs también poseen un papel antiinflamatorio en patologías con base inflamatoria crónica como en la EII. La base proinflamatoria en estas enfermedades puede ser debida, en parte, a una disbiosis de la microbiota intestinal, lo que provoca una alteración de la barrera intestinal, provocando una translocación bacteriana que induce inflamación local o sistémica. En estos casos, cuando se administran bacterias sobreproductoras de SCFAs, se observa una mayor producción de mucina en la mucosa del colon, mejorándose el estado de la barrera intestinal y aumentando la producción del péptido similar al glucagón 2 (GLP-2),

que reduce la concentración en sangre de factores proinflamatorios y del lipopolisacárido bacteriano (Orel 2014; Hudcovic et al. 2012; Cani et al. 2009).

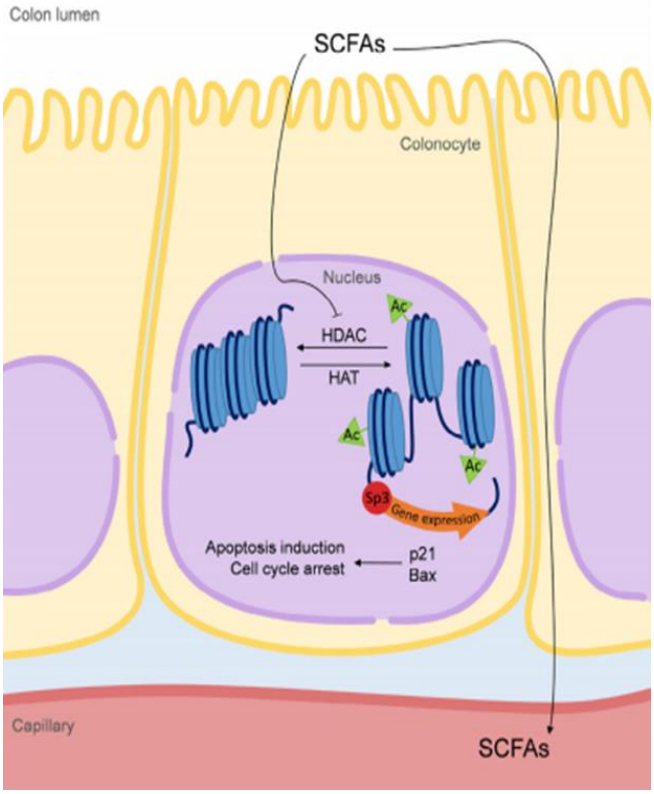

Figura 10: Efectos de los SCFAs sobre un colonocito. Se muestra su acumulación celular y entrada en el núcleo, con la posterior inhibición de las HDACs, causando modificaciones transcripcionales de genes involucrados en apoptosis y parada del ciclo celular (Fernández et al. 2016a).

1.3.2. Probióticos

El término probiótico quedó establecido en 2001 por un grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador"

Se deben cumplir una serie de requisitos mínimos para que un microorganismo pueda ser definido como probiótico:

a) **Identificación y aislamiento** del microorganismo a nivel de especie y cepa. Se recomienda la secuenciación de su gen ARN 16S y su depósito en una colección de cultivos.

b) **Evaluación de la seguridad** a nivel de administración, exposición, estado de salud del huésped, etc. Además, se debe comprobar que la cepa no sea patogénica, ni produzca metabolitos no deseados, ni inmunoestimulación excesiva, ni inmunodepresión, ni que contenga genes que confieran resistencia a antibióticos.
c) **Evaluación de la funcionalidad** del probiótico, en la que se estudia su viabilidad a través del tracto gastrointestinal y la corroboración de sus propiedades beneficiosas tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.
d) **Validación de la eficacia** del microorganismo mediante ensayos de fase 2 y 3, doble ciego con placebo, documentando los posibles efectos adversos producidos.
e) El probiótico debe poder mantenerse **estable**, con unas células viables mínimas a su paso por el tracto digestivo, de forma que pueda ejercer el efecto beneficioso.

Debido a todos estos requisitos, no todos los microorganismos con potencial efecto beneficioso pueden ser denominados estrictamente como probióticos (Hill et al. 2014; Guarner et al. 2010).

1.3.2.1. Mecanismo de acción de los probióticos

Los probióticos tienen diferentes efectos beneficiosos para la salud (mejora de intolerancias, psicobióticos, protección frente a infecciones, etc.), en este apartado nos vamos a centrar en el mecanismo de acción frente a enfermedades inflamatorias y CCR.

Los probióticos mantienen estables las poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal, previniendo disbiosis en este ecosistema tan complejo. Además, evitan la invasión por patógenos mediante el fortalecimiento de la barrera epitelial, formada por mucus y defensinas del sistema inmune innato. Los probióticos son capaces de estimular la producción de mucina y defensinas por las células caliciformes, además de mantener las uniones estrechas (ocludina y ZO-1) que mantienen estas células epiteliales juntas. Todo esto evita que los patógenos puedan tener capacidad de translocarse y producir con ello procesos proinflamatorios (Kahouli et al. 2013).

Estos microorganismos beneficiosos mantienen además estables las condiciones físico-químicas del intestino, como el pH. Un descenso del pH del colon bloquea la acción de las enzimas producidas por las bacterias comensales; y disminuye la retención de agua en el lumen, lo que provoca irritación a nivel de colonocitos y un aumento de los niveles de bilis

y ácidos orgánicos, que son compuestos tóxicos presentes en mayores cantidades en situaciones de enfermedad intestinal (Chong 2014).

Cuando se produce una disbiosis intestinal, ciertos microorganismos van a producir enzimas como β-glucosidasas, nitrorreductasas o azorreductasas, que generan metabolitos potencialmente carcinogénicos como las sales biliares secundarias, el sulfuro de hidrógeno o las aminas aromáticas. Los probióticos son capaces de reducir estas actividades enzimáticas, evitando la formación de compuestos tóxicos. Pero además pueden metabolizar estos compuestos, evitando que interaccionen con las células epiteliales (Wollowski et al. 2001).

Los probióticos también mejoran la respuesta inmune, inhibiendo la producción de compuestos inflamatorios y promoviendo la secreción de sustancias antiinflamatorias:

a) Interactúan con los receptores TLRs que inducen la producción de citoquinas antiinflamatorias
b) promueven la regulación de células T, aumentando la fagocitosis bacteriana
c) aumentan la actividad de las células *natural killer*
d) inhiben la producción de NF-κB en macrófagos
e) regulan la producción de IL-8, necesaria para el reclutamiento de neutrófilos.

Todos estos procesos van a evitar que se produzcan procesos inflamatorios que generen o potencien el desarrollo de enfermedades intestinales asociadas a inflamación , como EII y CCR (Aureli et al. 2011).

Además, los probióticos son capaces de producir compuestos derivados de su metabolismo, como los SCFAs a partir de fermentación de prebióticos, y aumentar los niveles de otros compuestos beneficiosos como el ácido linoleico conjugado o derivados de polifenoles. Todos estos nutracéuticos van a inducir un efecto apoptótico en células tumorales. Algunos de estos microorganismos beneficiosos también tienen la capacidad de generar sustancias antioxidantes que van a inhibir la peroxidación y la producción de radicales libres en el colon (Uccello et al. 2012).

Existen varios ejemplos en ensayos clínicos de estos efectos beneficiosos. En EII hay una clara relación entre microbiota y enfermedad, por lo que se ha sugerido que los probióticos pueden tener un papel en su prevención y tratamiento. En EC, el uso de *Saccharomyces*

boulardii combinado con mesalazina ha conseguido que hubiese menos recaídas de la enfermedad (6,25%), frente al grupo de pacientes que se le administró solo mesalazina (37,5% de recaídas) (Guslandi et al. 2000).

En CU, un preparado probiótico llamado VSL#3, que contiene 8 cepas probióticas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus thermophilus*, consiguió una mejor tasa de remisión de los efectos que en los grupos control que recibieron tratamientos clásicos. El mismo preparado probiótico se probó también con pacientes que sufrieron anastomosis anal. Los pacientes tratados con VSL#3 tuvieron una remisión de la reservoritis recurrente de más de un año de duración, y solo un 15% tubo recaídas, mientras que el grupo placebo tuvo una recaídas en el 40% (Ciorba 2012).

El uso de *S. boulardiii* y *Lactobacillus* en un modelo animal de CCR ha mostrado efectos antitumorogénicas y con potencial efecto inmunomodulador, produciendo una regulación de quinasas e inactivación del crecimiento celular por inactivación de los receptores EGFR (X. Chen et al. 2009). Otro estudio muestra una correlación entre la reducción del crecimiento tumoral, la displasia y la inflamación, tras la administración oral del probiótico *L. acidophilus* en un modelo animal de CCR. Aquí se observó una reducción de los ácidos biliares en el intestino y un menor número de adenomas en el grupo tratado con probióticos (Urbanska et al. 2009).

En humanos, los estudios con leche fermentada que contiene *L. casei* muestran una restauración de células *natural killer*, que desempeñan un papel importante en la vigilancia y en la inmunidad tumoral (Nanno et al. 2009). Formulaciones con *L. rhamnosus GG, B. lactis Bb12* e inulina han promovido efectos inmunomoduladores, como la activación de células secretoras de IL-10, vinculadas a la inducción de apoptosis (Roller et al. 2007). En estudios con pacientes en quimioterapia, la adición de *L. rhamnosus GG* junto con el 5-FU ha mostrado una reducción de los efectos secundarios asociados a la quimioterapia. Los pacientes del grupo experimental mostraron una menor atención hospitalaria, menos dolor y menor diarrea que los pacientes control (Österlund et al. 2007).

En conclusión, los probióticos parecen tener un efecto claro frente a las enfermedades intestinales debido a sus efectos en el intestino (inmunomodulador, producción SCFAs, mantenimiento de la barrera intestinal, etc.). Sin embargo, los estudios realizados hasta ahora con cepas probióticas son poco concluyentes por la dificultad de mostrar un efecto directo

en enfermedades tan complejas con tan sólo una o pocas cepas probióticas. Aun así, hay resultados prometedores que hacen de los probióticos un método potencialmente importante en la ayuda de paliar los efectos o tratar las enfermedades intestinales.

1.3.3. Fitoquímicos

Dentro de este gran grupo nos vamos a centrar en los flavonoides, que son el grupo más extenso de los polifenoles, con más de 4000 moléculas identificadas. Los flavonoides son metabolitos secundarios de 15 carbonos con estructura C6-C3-C6 producidos en plantas. Poseen 3 anillos aromáticos con diferentes grupos hidroxilo. Las diferencias estructurales entre flavonoides son debidas al nivel de oxidación y al patrón de sustitución de los carbonos de sus anillos. Los flavonoides ingeridos desde la dieta son absorbidos en el tracto gastrointestinal, ejerciendo sus funciones biológicas actuando como antioxidantes, antibacterianos, antiinflamatorios o antitumorales (Kumar & Pandey 2007; L. Marín et al. 2015).

Dentro de los flavonoides se encuentra la familia de las antocianidinas, que son los componentes principales de los pigmentos rojos, azules y morados de flores de frutos del bosque (moras, frambuesas, grosellas, arándanos). Este color va depender del pH, siendo rojo en condiciones ácidas y azul en básicas.

Las principales antocianidinas en la dieta son cinco: cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina y malvidina. Estas antocianidinas se encuentran en la planta principalmente en forma glicosilada, denominándose entonces antocianinas, con gran estabilidad química. Se conocen más de 500 antocianinas, dependiendo del grado de hidroxilación, metoxilación y unión de diferentes azúcares (Tsao 2010).

Las antocianidinas tienen alta capacidad antiinflamatoria, viéndose en numerosos estudios que se produce una actividad de inhibición del NF-κB mediante la activación de la vía MAPK, por inhibición de la actividad ciclooxigenasa o por reducción de la producción de interleuquinas proinflamatorias como TNF-α o IL-6 (Xie et al. 2011; Kelley et al. 2018).

Varios estudios *in vivo* han corroborado estos efectos antinflamatorios. Por ejemplo, la administración de arándanos reduce los efectos de la colitis inducida por DSS en modelos de rata. La administración de fresas permite la reducción de células polimorfonucleares en

el tejido inflamado y también una reducción de la inflamación intestinal (Paturi et al. 2012; Salaritabar et al. 2017)

Las antocianidinas también muestran efecto antitumoral mediante varios mecanismos de acción. Así, el efecto antioxidante debido a su estructura aromática les permite eliminar especies reactivas de oxígeno, evitando oxidación celular y mutaciones en el ADN que conducirían a tumorogénesis (Kong et al. 2003). Además, estos flavonoides inducen la activación del elemento de respuesta antioxidante (ARE), que es un promotor de genes que codifican enzimas antioxidantes , lo que va a producir la expresión de enzimas detoxificantes de fase II por las células epiteliales del colon (Shih et al. 2007).

Las antocianidinas inhiben el crecimiento celular, ya que actúan sobre proteínas reguladoras como P53, p21 y p27. Este efecto parece ser producido por el bloqueo de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Hou 2003).

Estos nutracéuticos inducen apoptosis tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. En la vía intrínseca, el tratamiento con antocianinas provoca un aumento del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c y la modulación de las proteínas antiapoptóticas dependientes de caspasas. Mientras, por la vía extrínseca, estos polifenoles modulan la expresión de FAS y FASL (ligando de FAS) en células tumorales, induciendo apoptosis (Reddivari et al. 2007). Además, poseen efectos antiangiogénicos, mediante la inhibición de los factores de crecimiento endotelial (VEGF) y de sus receptores (Li et al. 2008).

Existen diversos estudios del efecto de las antocianidinas en CCR. En ratas *Δapc* se ha observado una reducción del 74% de tumores en el ciego cuando se les administraba antocianidinas de cereza (Kang et al. 2003). En el mismo modelo animal se añadió a la dieta cianidina-3-glucósido al 0.3%, disminuyendo un 45% el número de adenomas (Cooke et al. 2006). En otro modelo de cáncer de colon en ratas Fisher 344 inducido por AOM, cuando se alimentaban con frambuesas negras liofilizadas al 2,5, 5 y 10% del total de la dieta, los animales mostraron una reducción significativa de adenomas y adenocarcinomas, 42, 45 y 71% respectivamente (Harris et al. 2001).

1.3.4. Ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos insaturados son ácidos carboxílicos de cadena larga, con uno o varios enlaces en su cadena. La posición de la insaturación se va a designar mediante la nomenclatura omega (3, 6, 9…), dependiendo de donde se encuentra la insaturación tras comenzar a contar por el extremo carboxilo (Gunstone 1994).

Los ω-3 son considerados ácidos grasos poliinsaturados antiinflamatorios, siendo su representante más común en la dieta el ácido α-linolénico. Estos ácidos grasos ω-3 producen eicosanoides, que están relacionados en la síntesis de epóxidos endocanabinoides, capaces de reducen la producción de IL-6 (proinflamatoria) y de aumentar la biosíntesis de IL-10 (antiinflamatoria). También modulan la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos, regulan positivamente los receptores de membrana (evitando la permeabilidad intestinal), y la reducción de las transcripción del gen de la enzima óxido nítrico sintasa, involucrada en procesos de inflamación (Marion-Letellier et al. 2015).En cambio, los ω-6, como el ácido linoleico, tienen propiedades proinflamatorias.

Ambos ácidos grasos son precursores de eicosanoides, que están implicados en la modulación negativa o positiva de procesos de inflamación (Calder 2015; Calder 2008). El ácido linoleico es precursor del ácido araquidónico, y éste de eicosanoides proinflamatorios como prostaglandinas o leucotrienos que están asociadas a inflamación a nivel cerebral y de las mucosas, incluyendo el reclutamiento de leucocitos. Es decir, están implicadas en las etapas iniciales del desarrollo de la inflamación (Freire & Van Dyke 2013).

Los ácidos grasos ω-6 bloquean la inhibición de factores de transcripción como NF-κB, con lo que éste se transloca al núcleo y activa la expresión de genes proinflamatorios tipo citoquinas (IL-1β o TNFα), metaloproteasas, o quimiocinas. Sin embargo, los ácidos grasos ω-3 activan la expresión del receptor gamma de la proliferación de peroxisomas que inhibe el factor NF-κB (Scaioli et al. 2017).

La alimentación con ω-3 en ratas inmunodeprimidas a las que se había inducido colitis mediante DSS, consiguió una reducción de los parámetros patológicos, una reducción de las citoquinas proinflamatorias y de otros parámetros relacionados con la inflamación (Whiting et al. 2005).

De todas formas, hacen falta más estudios con un buen planteamiento para demostrar estos efectos en pacientes, dada la variabilidad existente de estos ácidos grasos en la dieta (Feagan et al. 2008)

Efectos antiinflamatorios similares se han descrito con los ácidos grasos monoinsaturados, como los presentes en el aceite de oliva, que contiene un 70-80% de ácido oleico. El ácido oleico tiene muchas funciones similares a los ácidos grasos ω-3, ayudando a mantener la función de la respuesta inmune. Además, posee funciones antibacterianas, reduce los procesos de arterioesclerosis y reprime el factor NF- κB, reduciendo la inflamación generalizada. También se ha visto que el consumo continuado de estos ácidos grasos reduce los niveles de expresión de oncogenes y regula rutas como COX-2 o Bcl-2, induciendo a las células tumorales a apoptosis (Sales-Campos et al. 2013).

Un alimento con baja relación ω-6/ω-3 (por tanto, mayor contenido de ω-3) y alto contenido en ácido oleico es el jamón ibérico de bellota. Su bajo contenido en omega-6 se logra porque los cerdos ibéricos se alimentan exclusivamente de bellotas y hierba durante los meses previos a su sacrificio. Las bellotas son semillas con baja relación omega-6/3 y alto contenido de ácido oleico (63%), y estos ácidos grasos saludables se almacenan en el tejido muscular del cerdo ibérico durante estos meses de alimentación libre (Cantos et al. 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis son el estudio y la prevención de las enfermedades intestinales de carácter inflamatorio, en concreto CU y CCR, con alimentos funcionales mediante la adición de nutracéuticos.

Para realizar este estudio se plantearon 4 objetivos:

1. Estudio de alimentos cárnicos funcionales enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados para la prevención de CU en un modelo animal.

2. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con antocianinas para la prevención de CCR en un modelo animal.

3. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con prebióticos derivados de lactulosa para la prevención de CCR en un modelo animal.

4. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR inducido químicamente y otro de origen genético.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Modelos animales

3.1.1. Modelo animal para CU

Se utilizaron 30 ratas macho Fischer 344 (Charles River, Francia) de unas 5 semanas de edad. Las ratas fueron instaladas en el Bioterio (animalario de la Universidad de Oviedo) tras su autorización (Nº ES330440003591) y la aprobación de los experimentos por el comité de ética del Principado de Asturias (código de autorización PROAE 23/2016). La experimentación animal tuvo una duración de 4 semanas.

Las ratas se individualizaron en jaulas y se repartieron en tres grupos al azar de 10 animales cada uno, administrándoseles pienso universal (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Harlan diet) durante una semana para su adaptación a las nuevas instalaciones.

Posteriormente a cada grupo se le administró sus dietas: pienso universal, jamón celta como control (cerdos alimentados con una dieta normal de granja) y jamón ibérico de bellota alto contenido oleico (cerdos que realizan la montanera, con alimentación exclusiva de bellotas y hierba). Los alimentos se dieron pesados (20 g diarios) y se sustituyeron diariamente en las jaulas. Tras una semana con cada alimentación, a 8 de los 10 animales de cada grupo se les realizó la inducción de CU mediante el uso de DSS (40.000 g/mol, Alpha Aesar) al 3% en agua de bebida durante 7 días. A los otros dos animales se les administró agua de consumo normal como controles intragrupo.

Tras el tratamiento, cada grupo se mantuvo una semana con su alimentación específica y se procedió al sacrificio de todos los animales mediante la técnica de neumotórax previa anestesia oral con oxígeno e Isoflurano (Ecuphar) al 3%, extrayendo los tejidos, muestras y órganos de interés.

3.1.2. Modelo animal de CCR inducido químicamente

En este modelo se realizaron 3 experimentos independientes con 20, 30 y 50 ratas macho Fischer 344 (Charles River, Francia) de entre 4 y 5 semanas de edad. Las ratas fueron instaladas en el Bioterio de la Universidad de Oviedo con la autorización (Nº ES330440003591) y las aprobaciones del comité de ética del Principado de Asturias (7IMV-2013, PROAE 16/2015 y PROAE 23/2016).

Las ratas de dos experimentos (experimentos 1 y 3) se separaron en jaulas y se les administró durante una semana pienso universal (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Harlan diet) para permitir su adaptación a las instalaciones. Los animales se repartieron aleatoriamente en grupos de 10 animales y comenzaron las dietas a ensayar. Estos alimentos se les sustituyeron diariamente en las jaulas con porciones controladas de 20 g de cárnicos y 10 de pienso, y en el caso de GOS-Lu, éste se añadió en la bebida *ad libitum.* A los grupos control se les administró pienso *ad libitum*:

a) Experimento 1 con 30 ratas divididas en 3 grupos: pienso control, cárnico procesado control (salchichas) y cárnico procesado funcional con antocianinas como nutracéutico (salchichas con frutos rojos).
b) Experimento 2 con 20 ratas divididas en 2 grupos: pienso control y el prebiótico GOS-Lu administrado en agua de bebida.
c) Experimento 3 con 50 ratas divididas en 5 grupos: pienso control, 2 grupos de dos alimentos cárnicos controles (jamón cocido y chorizo) y 2 grupos de dos alimentos cárnicos funcionales con los fructooligosacáridos como prebiótico elegido (jamón cocido y chorizo, ambos con inulina)

Tras una semana con su alimentación se procedió a inducir CCR a 8 de las ratas de cada grupo, salvo a las del experimento 3, en el que fueron tratados 7 animales de cada grupo, mediante el cancerígeno AOM (Sigma-Aldrich) disuelto en suero salino (0,9% NaCl) a una concentración de 2 mg/mL. La solución de AOM se inyectó de forma intraperitoneal a una concentración de 10 mg/kg de peso, y este tratamiento se realizó dos veces con una separación de una semana (semanas 2 y 3). A las ratas control de cada grupo se les administró una inyección intraperitoneal de 1 mL de suero salino.

En las semanas 4 y en la 15 se administró el compuesto DSS (40.000 g/Mol, Alpha Aesar) durante 7 días. El DSS es capaz de inducir CU (lo cual promueve el desarrollo de CCR). Las concentraciones utilizadas fueron del 3% y 2% respectivamente en el agua de consumo. A las ratas control de cada grupo no se les realizó esta administración de DSS.

Los animales fueron sacrificados tras 20 semanas desde la primera administración de AOM mediante neumotórax, previa anestesia con isoflurano (Ecuphar) al 3%.

3.1.3. Modelo animal de CCR genético

Se realizó un experimento con 40 ratas macho de la cepa KAD, con genotipo F344/NSlc-Apc$^{1588/kyo}$ (Japan SLC, Inc). Las ratas se instalaron en el Bioterio de la Universidad de Oviedo con la autorización (Nº ES330440003591) y la aprobación del comité de ética del Principado de Asturias (PROAE 15/2017).

Las ratas se separaron en jaulas individualizadas y se les alimentó durante una semana con pienso universal (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Harlan diet) para su adaptación a las instalaciones de la universidad. Tras ese periodo se separaron aleatoriamente en 4 grupos y se les empezó a dar los alimentos a ensayar, con dosis pesadas (20 g de cárnico y 10 g de pienso, con el grupo control alimentado con pienso *ad libitum*), que se sustituyeron diariamente. Los grupos estuvieron formados por: pienso control, cárnico control (chorizo), cárnico funcional con inulina (chorizo con inulina), cárnico funcional con inulina más dos cepas con potencial efecto probiótico (chorizo con inulina más dos cepas probióticas).

Tras una semana con esta alimentación específica se potenció el efecto de la mutación a 8 de los 10 animales de cada grupo con dos dosis de AOM (Sigma-Aldrich) disuelto en suero salino (0,9% NaCl) a una concentración de 2 mg/mL. La solución de AOM se inyectó de forma intraperitoneal a una concentración de 10 mg/kg de peso, realizándose 2 veces separadas por una semana (semana 2 y 3). A las ratas control de cada grupo se les administró una inyección intraperitoneal de 1 mL de suero salino.

A las 8 ratas tratadas con las dos dosis de AOM, se les administró una dosis de DSS (40.000 g/Mol, Alpha Aesar) al 3%, durante 7 días para inducir CU y potenciar el efecto del desarrollo de CCR (semana 4).

Los animales fueron sacrificados tras 20 semanas desde la primera administración de AOM mediante neumotórax, previa anestesia con isoflurano (Ecuphar) al 3%.

3.2. Tipos de alimentación

Se van a describir los tipos de alimentos normales o funcionales utilizados en los 5 experimentos animales realizados durante esta tesis.

Pienso control: Como pienso control se utilizó la marca Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet (Harlan, España), caracterizado por minimizar la presencia de fitoestrógenos, reducción de concentraciones de clorofila y ausencia de proteína animal, lo cual minimiza la presencia de nitrosaminas.

La composición del pienso es: harina de trigo, trigo molido, maíz molido, harina de gluten de maíz, carbonato de calcio, aceite de soja, fosfato de calcio, sal yodada, L-lisina, acetato de vitamina E, DL-metionina, óxido de magnesio, cloruro de colina, óxido de manganeso, sulfato ferroso, complejo de sodio bisulfito de menadiona (fuente de vitamina K), óxido de zinc, sulfato de cobre, niacina, pantotenato de calcio, yodato de calcio, piridoxina clorhidrato, riboflavina, mononitrato de tiamina, acetato de vitamina A, vitamina B_{12}, ácido fólico, carbonato de cobalto, biotina y vitamina D_3.

El pienso tiene una potencia energética de 2,9 kcal/g y está constituido por: carbohidratos 48%, fibra insoluble 18%, proteínas 14%, cenizas 4,7%, fibra 4,1% y grasas 4%. En cuanto a estos ácidos grasos, están presentes el ácido linoleico 2%, ácido oleico 0.7%, ácido palmítico 0,5%, ácido esteárico 0.1% y ácido linolénico 0,1%. Por lo tanto, está constituido por un 2,1% de ácidos poliinsaturados, 0,7% de ácidos monoinsaturados y un 0.6% de ácidos saturados.

Jamón control y Jamón ibérico de bellota: Para el jamón control, se utilizó uno de cerdos celtas estabulados y alimentados con piensos realizados con maíz, cebada, soja, trigo, suero de leche, aceite de palma y sales inorgánicas. Mientras que para el Jamón ibérico de bellota se utilizaron patas de cerdo ibérico alimentado durante 2 años por bellotas y hierba durante las montaneras en dehesas, con una densidad de 3 Ha por cerdo.

Estos jamones también difieren en el salado y tipo de sal (más potenciado en el jamón control para una rápida salida al mercado) y en su curación, siendo muy superior en el jamón ibérico de bellota, en el que se mantiene más de 36 meses en una curación natural. Además, el jamón control contiene aditivos para su conservación como el nitrito de sodio (E-250) y el nitrato de potasio (E-252), mientras que el jamón ibérico de bellota no contiene dichos aditivos.

Dentro de las características físico-químicas, el jamón ibérico contiene menos humedad y menos concentración de cloruros debido a su curación más natural y prolongada [Tabla 1]. Posee más contenido en grasas totales, en especial monoinsaturadas debido al mayor

porcentaje de ácido oleico (C18:1), y destaca la menor presencia de ácidos grasos ω-6, en concreto un descenso en la concentración de ácido linoleico (C18:2n6), por lo que la relación ω-6/ω-3 es mucho más positiva (menor) en este jamón [Tabla 2].

	HUMEDAD %	PROTEINA %	GRASA %	FIBRA %	CLORUROS %	CENIZAS %	NITRATOS ppm	NITRITOS ppm
JAMÓN DE BELLOTA	38,3	31,1	21,4	0	4,50	5	15,04	0,47
JAMÓN CONTROL	45,1	30,9	17,3	0	5,70	6	188,67	0,54

Tabla 1: Composición nutricional de los dos jamones utilizados.

ACIDOS GRASOS		JAMÓN DE BELLOTA %	JAMÓN CONTROL %
C14:0	Miristico	1,37	1,28
C16:0	Palmítico	20,81	21,52
C16:1	Palmitoleico	3,25	2,05
C17:0	Margárico	0,22	0,44
C17:1	Heptadecanoico	0,26	0,35
C18:0	Esteárico	7,96	11,76
C18:1	Oleico	51,92	39,53
C18:2n6	Linoleico	10,26	19,59
C18:3n3	α-linolénico	0,75	0,87
C20:0	Araquídico	0,12	0,19
C20:1n9	Eicosenoico	1,16	0,86
C20:4n6	Araquidónico	1,30	1,03
C20:5n3	Eicosapentaenoico	0,08	0,08
C22:4n6	Adrénico	0,18	0,22
C22:5n3	Docosapentaenoico	0,17	0,11
C22:6n3	Docosahexaenoico	0,18	0,12
		100%	100%
SATURADOS		30,49	35,19
MONOINSATURADOS		56,59	42,78
POLIINSATURADOS		14,09	22,89
ω-3		1,18	1,19
ω-6		11,74	20,84
ω-6/ω-3		9,97	17,56

Tabla 2: Composición de ácidos grasos en los dos jamones utilizados

Cada animal de los grupos jamón fue alimentado con 20 g diarios de virutas de jamón troceadas.

GOS-Lu: este prebiótico fue sintetizado usando una preparación de lactulosa comercial (670 g lactulosa/L; Dulphalac, Holanda) y la enzima β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (16 U/mL; Sigma-Aldrich) (López-Sanz et al. 2015). La reacción enzimática se realizó a pH 5,4 gracias a la adición de 3 mL de KOH 2 M y 800 mL de Dulphalac, y se calentó a 50 ºC en agitación a 300 rpm durante 24 h. Finalmente la reacción enzimática fue parada mediante un calentamiento a 110 ºC durante 10 min.

La mezcla final contiene un 66% (w/w) de carbohidratos finales, que fueron determinados tanto cualitativamente como cuantitativamente mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) (Cardelle-Cobas et al. 2009; Hernández-Hernández et al. 2012).

La composición de carbohidratos está formada por una mezcla en la que principalmente está involucrado el enlace glucosídico β(1-6) y está constituida por lactulosa 24,7%, fructosa 19,5%, galactosa 12,4%, glucosa 1,2%, disacáridos GOS-Lu 13,6%, trisacáridos GOS-Lu 22,6%, tetrasacáridos GOS-Lu 5,1% y pentasacáridos GOS-Lu 1%.

A las ratas se les administró un 10% de GOS-Lu disuelto en el agua de bebida.

Salchicha control y salchicha con antocianinas: Las salchichas fueron elaboradas exclusivamente con caña de lomo de cerdo, NaCl, ajo deshidratado y pimienta negra (por cada kg de carne se añadieron 25 g de NaCl, 15 g de ajo y 3 g de pimienta).

La caña de lomo de cerdo utilizada contiene un 23-30% de proteínas, 7-8% de lípidos, 65-70% de humedad y un 0,09-0,1% de cenizas; por lo que las salchichas tienen un bajo contenido graso. El ajo deshidratado contiene un 6,75% de humedad, 8,5% de cenizas y un 1,3% de compuestos extraíbles en éter; mientras que la pimienta negra contiene un 15% de humedad, un 7% de cenizas y 2% de aceites esenciales.

Las salchichas con antocianinas tenían la misma composición, pero se les añadió un 10% de una mezcla de frutos rojos compuesta por fresa y mora en polvo liofilizada al 50%. La mezcla de frutos rojos utilizada contiene un 1,1% de antocianinas (59% de cianidín-3-glucósido y 41% de pelargonidín-3-glucósido), por lo tanto, las salchichas funcionales contienen 1,1 g de antocianinas por kilo (0,11%).

Cada animal se alimentó con 20 g diarios de dichas salchichas y 10 g de pienso.

Jamón cocido control y jamón funcional con inulina: Se elaboró un jamón cocido a partir de piernas de jamón de cerdo a las que se añadió agua, sal, dextrosa y especias. En este caso no se introdujeron los aditivos habituales en estos alimentos como estabilizador (difosfatos y trifosfato), aroma, gelificante, carragenato, antioxidante (ascorbato sódico), potenciador del sabor (glutamato monosódico) y conservador (nitrito sódico).

Para este jamón cocido se realizó un deshuesado de la pata del jamón con una posterior inyección de una salmuera en la que se introduce agua, dextrosa y especias. La concentración final de sal en el jamón fue de un 2%. Tras la inyección se realizó un masaje en bombo, la cocción, el enfriamiento y el envasado.

A los jamones funcionales se les añadió 10% inulina, que fue mezclada con la salmuera e inyectada en el producto cárnico.

Cada animal de los grupos "jamón" recibió 20 g diarios de jamón y 10 g de pienso.

Chorizo normal y chorizo funcional con inulina: Los chorizos se fabricaron con cinta de lomo, pimentón dulce 2,21%, sal 2,05% y ajo 1,23%. El ahumado se realizó mediante fricción para evitar la presencia de benzopirenos. Además, no se añadieron conservantes.

El chorizo funcional se elaboró sustituyendo grasa animal por inulina al 15,83%, lo que permitió hacer un alimento cárnico con una reducción del 75% de grasas (de 22 g a 5,42 g por cada 100 g). El contenido calórico pasó de 307 kcal/100 g a 284 kcal/100 g (una reducción del 7,49%) y un menor contenido en colesterol, de 87,64 mg/100 g a 72,19 mg/100 g (una reducción del 15,44%).

Cada animal se alimentó con 20 g diarios de cada chorizo y 10 g de pienso

Inulina: La inulina utilizada para la fabricación de los alimentos funcionales fue Orafti HP (Beneo, Bélgica), que se extrae a partir de la raíz de la achicoria y está constituida por cadenas de más de 23 fructosas (DP≥23), pudiendo mezclarse a bajas temperaturas y actuar como sustituto de grasas.

Probióticos: Los potenciales probióticos que se utilizaron fueron:

a) *Parasutterella excrementihominis* cepa tipo 21040, con identificador taxonómico 487175 (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, DSMZ).

b) *Phascolarctobacterium succinatutens* cepa tipo 16074, con identificador taxonómico 626940 (Colección Japonesa de Microorganismos y Cultivos Celulares, JCM).

Para el crecimiento de las dos cepas se usaron los medios Anaerobe basal Broth (Oxoid) (para el caso de *P. excrementihominis*) y Tryptic Soy Broth (Merck) modificado con un 5% de sangre de caballo desfibrinada (Thermo Scientific) (para *P. succinatutens*). Estos medios de cultivo fueron preparados según las especificaciones de la casa comercial y autoclavados durante 20 min.

Al tratarse de bacterias anaerobias estrictas, las condiciones de cultivo se realizaron en jarras de anaerobiosis Anaeropack de 7 litros (Mitsubishi Gas Chemical CO), utilizando dos sobres de generación de atmósfera anaerobia AnaeroGen 3,5 L (Thermo Scientific) y cultivo en tubos individuales de 15 ml (Cellstar, Thermo Scientific), uno por cada cepa y rata, a 37 ºC durante 3 días (densidad final de 10^8 UFC/mL).

Para la administración de las cepas probióticas a los animales, se centrifugaron los tubos de cultivo a 3500 *g* durante 10 min, retirando el medio de cultivo, y resuspendiendo el sedimento de las dos cepas bacterianas en 300 µL de PBS, obteniendo una mezcla de las dos cepas a 10^8 UFC/mL de cada especie, listas para inocular.

Las ratas fueron anestesiadas con Isoflurano (Ecuphar) al 3% y se les administró la mezcla probiótica en PBS mediante una cánula orofaríngea unida a una jeringuilla de 1 mL, permitiendo así la administración de la dosis directamente en el estómago. La adición de estos probióticos, en el grupo "probiótico" del modelo animal de CCR genético, se realizó una vez a la semana durante los primeros 45 días de experimentación y una vez cada 15 días desde el día 45 hasta el final del experimento.

3.3. Medidas físicas

Las ratas fueron pesadas periódicamente, siendo una vez cada semana en el modelo de UC y regularmente en el caso de los modelos de CCR, con al menos una medición en cada tratamiento de AOM y DSS y antes del sacrificio. Se observó diariamente el comportamiento y los síntomas típicos de la enfermedad en cada animal, anotando los procesos de diarrea, sangrado o falta de apetito.

3.4. Muestras de sangre y de tejidos

Al final de cada experimento las ratas fueron anestesiadas con Isoflurano (Ecuphar) al 3% y sacrificadas mediante neumotórax. Se recogieron 2 mL de sangre a partir del tejido cardiaco mediante tubos de 2 mL preparados con el anticoagulante K3-EDTA (Aquisel) y ésta fue centrifugada a 1.500 g durante 15 min, recogiendo el sobrenadante (plasma sanguíneo), para su almacén a -20 ºC hasta su posterior uso. Se realizaron medidas serológicas con el equipo Reflotron plus (Roche), usando tiras reactivas del equipo para cada medida con 30 µL de plasma sanguíneo.

Tras el sacrificio se recogió también el intestino delgado, que fue lavado con PBS para poder contabilizar visualmente las placas de Peyer hiperplásicas existentes en dicha mucosa intestinal.

Los ciegos de cada animal fueron pesados e inmediatamente congelados a -20 ºC para el posterior uso de su contenido en el análisis de SCFAs y en estudios de metagenómica.

Finalmente se extrajeron los intestinos gruesos de cada animal, abriéndolos longitudinalmente y lavándolos con PBS hasta que la mucosa del colon quedase totalmente limpia de restos fecales, tejido adiposo y sangre.

En el caso del estudio de CU, cada colon se dividió en 3 partes: los 2 últimos cm distales fueron conservados en formaldehido (Merck) al 4% para su posterior análisis histológico. El resto del colon fue dividido en dos secciones longitudinales idénticas para usarlas en los estudios de permeabilidad (test de Azul de Evans) y en el ensayo de mieloperoxidasa.

En los estudios de CCR, cada colon fue conservado en formaldehido (Merck) al 4%, para el análisis histológico y para el estudio meticuloso de los tumores macroscópicos, contando y midiendo mediante el uso de un calibre todos los tumores mayores de 1 mm en la superficie de la mucosa. La superficie de cada tumor fue clasificada como pedunculada (forma de disco conectado por un pedúnculo a la mucosa), plano irregular, plano circular y esférico, para poder calcular el área tumoral total de la mucosa.

3.5. Estudios histológicos

Se realizaron diferentes estudios histológicos en los modelos de CU.

Longitud del colon: Mediante una regla calibrada se midió la longitud de cada colon, calculando el porcentaje de reducción por la CU al comparar la longitud de los colones de animales con CU con los 2 controles sanos de cada grupo.

Evaluación macroscópica de la CU: Tras la apertura del colon y su limpieza con PBS, un evaluador externo categorizó cada colon atendiendo a la clasificación estándar (Jeong et al. 2015), en la que las categorías son:

a) 1, sin ulceración e hiperemia local
b) 2, ulceración sin hiperemia
c) 3, ulceración e inflamación en un solo sitio
d) 4, dos o más sitios de ulceración e inflamación
e) 5, ulceración más grande de 2 cm.

Cambios reparativos en la mucosa, alteraciones en el epitelio y densidad de células inflamatorias en el colon: Tras fijar 24 h en formaldehido (Merck) al 4% los 2 cm distales de cada colon, estos se deshidrataron en baños con incremento en la concentración de etanol y se embebieron en bloques de parafina. Las secciones fueron cortadas en fragmentos de 5 µM de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

El diagnóstico microscópico fue realizado por el laboratorio de anatomía patológica del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) utilizando un microscopio Olympus BX-53 conectado a una cámara digital DP73 (Olympus) y el procesamiento de las imágenes se realizó con el programa informático *CellSens.*

Posteriormente los patólogos clasificaron cualitativamente el estadio de cada colon atendiendo a:

a) Cambios reparativos en la mucosa: 0, sin cambios reparativos; 1, cambios reparativos leves (menos del 50% de la superficie de las ulceraciones se vuelve a reepitelizar); 2, cambios reparativos moderados (más del 50% de las ulceraciones se vuelven a reepitelizar); 3, cambios reparativos severos (reepitelización total de las ulceraciones).
b) Alteraciones en el epitelio: 0, sin alteraciones; 1, pérdida focal de células caliciformes; 2, pérdida extensa de células caliciformes; 3, pérdida de criptas menor

que en el 50% de la superficie de la mucosa; 4, pérdida de criptas en más del 50% de la superficie de la mucosa y / o regeneración polipoide.

c) Densidad de células inflamatorias: 0, sin inflamación; 1, inflamación leve; 2, inflamación moderada; 3, inflamación severa.

En los modelos de CCR, tras el recuento de los tumores, se procesaron los cólones con el mismo método realizado en CU. Los patólogos en este caso diferenciaron los pólipos en:

a) Displasia de bajo grado (displasia leve, displasia moderada), que se caracteriza por la presencia de hipercromasia, pleomorfismo, incremento de la relación núcleo/citoplasma y con aumento de la actividad proliferativa, que afecta a los dos tercios inferiores del espesor del epitelio.
b) Displasia de alto grado (displasia severa, carcinoma "*in situ*"), que afecta a todo el espesor del epitelio.
c) Adenocarcinoma: tumoración epitelial maligna con severa atipia citológica, núcleos grandes y pleomórficos con membrana nuclear irregular y uno o varios nucléolos, en ocasiones prominentes. Se disponen a modo de glándulas (bien diferenciado), nidos y masas de aspecto cribiforme (moderadamente diferenciado) o grupos sólidos (pobremente diferenciado). Puede ser intramucoso (cuando se localiza en lámina propia) o bien infiltrante si llega a capa submucosa. Se considera adenocarcinoma de bajo grado los que están bien y moderadamente diferenciados y adenocarcinoma de alto grado el poco diferenciado.

3.6. Ensayo de la actividad de mieloperoxidasa

Para este ensayo de actividad proinflamatoria se utilizaron una sección longitudinal de 0,5 cm de ancho de cada colon, la cual se pesó y se cuantificó la actividad de este enzima mediante un protocolo ya descrito (Kim et al. 2012). Para obtener el resultado se utilizó un lector de placas Glomax (Promega) con una absorbancia a DO_{450nm} y se calcularon las unidades de actividad de mieloperoxidasa, que es definida como la cantidad necesaria (MPO/mg tejido) para degradar 1 µmol de H_2O_2 en 1 min a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta que 1 µmol de H_2O_2 produce un cambio de $1{,}13*10^{-2}$ nm/min, las unidades de MPO se pueden calcular como el cambio en la absorbancia $[\Delta A(t_2-t_1)]/ \Delta min * (1{,}13*10^{-2})$.

3.7. Ensayo de permeabilidad de la mucosa

Para el ensayo de permeabilidad o azul de Evans se utilizó una sección longitudinal de 0,5 cm de ancho de cada colon usando el método descrito por (Kim et al. 2012) con modificaciones. Cada intestino se introdujo en un baño con una solución de azul de Evans (Alfa Aesar) disuelta en PBS al 1,5% durante 30 min, posteriormente se lavaron 3 veces en una solución de acetilcisteína (Sigma-Aldrich) a 6 mmol/L y se secaron los fragmentos de intestinos a 37 ºC durante 24 h. Luego se pesaron en seco y se destiñeron con 1 mL de formamida a 50 ºC durante 24 h, para finalmente medir la solución desteñida en un lector de placas Glomax (Promega) con una absorbancia de $DO_{655nm.}$ Los datos se compararon con una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de azul de Evans y se representaron en µg/mL.

3.8. Capacidad antioxidante en plasma sanguíneo

La medida total de la capacidad antioxidante se realizó mediante el kit comercial *Frap Assay Kit* (Bioquochem SL) que mide la capacidad del plasma de reducir el hierro a la forma ferrosa. Para su utilización se usó 10 µL de plasma sanguíneo y se comparó con una curva estándar realizada con diferentes concentraciones de Trolox (análogo de vitamina E) y las medidas fueron realizadas con un lector de placas Glomax (Promega) a una absorbancia de $DO_{593nm.}$

3.9. Análisis de citoquinas en plasma sanguíneo

Se realizaron diferentes kits Elisa para citoquinas proinflamatorias o antiinflamatorias, en concreto, para IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17a, TGF-β1 y TNF-α (Abnova Ref. KA0273, KA0278, KA0274, KA1001, KA0279, KA0280). Se utilizó plasma sanguíneo y se siguieron las instrucciones del fabricante, usando un lector de placas Glomax (Promega) a una absorbancia de DO_{450nm} para las lecturas finales.

3.10. Cuantificación de SCFAs en heces por cromatografía de gases masas

Para la extracción de SCFAs se utilizaron 400 mg de heces procedentes del ciego de cada animal que habían sido almacenadas a -80 ºC y se utilizó un método ya descrito (García-Villalba et al. 2012) con modificaciones. Los 400 mg de heces fueron resuspendidos en

1.716,8 µL de agua mili-Q en viales de vidrio de 5 mL y homogenizados mediante vórtex. A la mezcla se añadieron estándares deuterados de SCFAs como controles internos, en concreto acetato, propionato, butirato y valerato deuterados (Cambridge Isotope Laboratories), cada uno a una concentración final de 0,4 mM. Posteriormente se añadieron 400 µL de H_2SO_4, 800 mg de NaCl y 1 mL de acetato de etilo. Toda la mezcla se agitó a 300 rpm con una temperatura de 25 ºC durante 1 h. El extracto se centrifugó a 1.900 g durante 5 min y se recogieron 500 µL, para finalizar con otra segunda extracción, tras añadir un nuevo mL de acetato de etilo a las muestras previamente extraídas.

El equipo de cromatografía de gases masas (GC-MS) fue un Agilent 7890A (Agilent Technologies), equipado con un *Inert XL MSD* con detector de triple eje, siendo la adquisición realizada mediante el programa informático Chemstation (Agilent Technologies). Se utilizó una columna capilar cromatográfica DB-FFAP (Agilent Technologies) con unas medidas de 30 m, 0,25 mm de diámetro interno y un espesor de 0,25 µM. El gas de carga utilizado fue helio a 1 mL/min. La inyección de las muestras se realizó en modo *splitless*, utilizando un volumen de 1 µL y una temperatura del inyector de 200 ºC. Se usó un revestimiento de vidrio con un tapón de lana de vidrio en el extremo inferior de la línea para evitar la contaminación de la columna de GC-MS con material fecal no volátil, y se insertó una muestra de blanco entre muestras experimentales para verificar la inexistencia de contaminantes que persisten en la columna entre las diferentes muestras.

La temperatura de la columna fue inicialmente de 50 ºC (1 min), luego se aumentó a 150 ºC/min, y finalmente se bajó de 230 ºC a 15 ºC/min (tiempo total de 20 min). La temperatura de la fuente de iones, cuadrupolo e interfaz fue de 230 ºC, 150 ºC y 220 ºC, respectivamente. Los iones escaneados fueron 45 y 76 m/z para el ácido propiónico deuterado, 45 y 74 m/z para el ácido propiónico, 43 y 73 m/z para el ácido isobutírico, 63 y 77 m/z para el ácido butírico deuterado, 60 y 73 m/z para el ácido butírico, 60 y 87 m/z para el ácido isovalérico, 63 y 77 m/z para el ácido isovalérico deuterado, 60 y 73 m/z para el ácido valérico y 60, 73 y 87 m/z para el ácido hexanoico. La identificación de los SCFA se basó en el tiempo de retención de los estándares y de la asistencia de la biblioteca Wiley 7.

3.11. Cuantificación de ácidos grasos por CG-MS en muestras cárnicas y de plasma sanguíneo

Para la extracción de estos lípidos a partir de muestras de plasma sanguíneo de los animales de experimentación y de muestras cárnicas (a partir de musculo femoral de cerdo en el caso del jamón utilizado en el experimento de CU) se utilizó un método ya descrito (Segura & Lopez-Bote 2014). Los extractos de ácidos grasos fueron metilados en presencia de H_2SO_4 y analizados mediante GC-MS. Previamente se identificaron esteres metílicos de los ácidos grasos en CG-MS mediante el método (Olivares et al. 2009). El equipo de GC-MS utilizado fue un HP-6890 (Hewlett Packard), equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar con unas medidas de 30 m, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de polietilenglicol (HP-Innowax).

La temperatura del programa fue de 170 ºC a 245ºC y tanto el inyector como el detector se mantuvo a una temperatura de 250 ºC, además, como gas de carga se utilizó helio a un flujo de 2 mL/min. Para la identificación de cada ácido graso se utilizaron estándares puros (Sigma-Aldrich) y la concentración final de cada ácido graso de calculó como el porcentaje respecto al total de ácidos grasos.

3.12. Extracción de ADN genómico y metagenómica de la subunidad del ARN ribosomal 16S

Para la extracción de ADN genómico (ADNg), a partir de 200 mg de heces de ciego de cada animal conservados a -80ºC, se usó el kit comercial E.Z.N.A. DNA stool kit (Omega Bio-Tek) dando lugar a 150 µL finales de ADNg. Las muestras puras de ADNg se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf) y se diluyeron hasta conseguir una concentración de 6 ng/µL por muestra. Estas muestras diluidas se utilizaron para amplificar por PCR 7 regiones hipervariables del ARN ribosomal 16S siguiendo el protocolo del 16™ Metagenomics kit (Thermo Fischer Scientific).

Los productos amplificados se utilizaron para crear una librería usando el Ion Plus Fragment Library Kit (Applied Biosystems Library Builder), las muestras se marcaron para su reconocimiento con el kit Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-96 (Applied Biosystems). Para la preparación de los moldes se usó el sistema ION OneTouch™ 2 y el kit ION PGM™ Hi-Q™ OT2 (Applied Biosystems).

Para la secuenciación metagenómica se utilizó el kit ION PGM™ HI-Q™ y el sistema ION PGM™ (Applied Biosystems) usando los chips ION 314™ v2, ION 316V v2 o el ION 318 v2 (Applied Biosystems) con varias muestras marcadas por chip.

3.13. Análisis filogenético de la secuenciación

La secuenciación se realizó como se ha descrito en el apartado anterior con un mínimo de 100.000 lecturas por muestra de cada chip secuenciado. Los resultados se descargaron mediante el programa informático ION Reporter 5.6 (Thermo Fischer Scientific) y se generaron tablas de cálculo con la información individual de cada animal y de las cohortes que participaban en cada ensayo. Los resultados de cada nivel taxonómico se expresaron como el porcentaje que representan sobre el total de las secuencias mostradas.

3.14. Cultivo celular

3.14.1. Líneas celulares

Se realizaron ensayos de SCFAs frente a líneas celulares de CCR humano HCT116, HT29 y T84 (ATCC, EEUU). Las características de cada línea son:

	HCT116	**HT29**	**T84**
Tejido	Colon	Colon	Colon
Morfología	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Histología	Carcinoma	Carcinoma	Carcinoma
Origen tumoral	Primario	Primario	Metástasis derivada de pulmón
Genes mutados	KRAS, PIK3CA	APC, BRAF, PIK3CA, SMAD4, TP53	APC, KRAS, PIK3CA, TP53

Tabla 3: Características de las 3 líneas celulares ensayadas.

Las 3 líneas celulares se mantuvieron a 37 ºC y 5% de CO_2 en medio cultivo DMEM/F12 1:1 (Sigma Aldrich), suplementado con 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich), 10% de

suero fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich) y los antibióticos penicilina (100 IU/mL) (Sigma Aldrich) y estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma Aldrich).

Como células control se usó la línea celular de fibroblastos de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*), BHK-21[C-13] (ATCC, EEUU). Esta línea celular se mantuvo a 37 ºC y 5% de CO_2 en medio de cultivo *Glasgow Minimum* (Sigma Aldrich) suplementado con 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich), 5% de solución de caldo de triptosa fosfato (Sigma Aldrich), 10% de SFB (Sigma Aldrich) y los antibióticos penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma Aldrich).

Las 4 líneas celulares se incubaron en las condiciones descritas anteriormente hasta llegar a un 80% de confluencia, y posteriormente se tripsinizaron para despegar e individualizar las células mediante la solución de tripsina-EDTA 1x (Sigma-Aldrich) durante 7 min a 37 ºC y 5% de CO_2. Una vez tripsinizadas, se bloqueó el proceso con 9 ml de medio cultivo correspondiente y se contabilizaron manualmente mediante el uso de un hematocitómetro para los diferentes estudios realizados.

3.14.2. Estudios de proliferación celular

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron en placas de 96 pocillos (SPL Life Sciences) en las que se crecieron 2.500 células por pocillo para la línea celular control BHK-21[C-13], 5.000 células por pocillo de HCT116, 7.500 células de HT29 y 10.000 células de T84. Estas diferencias se deben a las diferencias en la tasa de crecimiento que hay entre células. El volumen final que se añadió a cada pocillo fue de 100 µL, que se incubaron durante 24 h a 37 ºC y 5% de CO_2, con el objeto de que las células se pudieran adherir a la base de los pocillos. Trascurrido este periodo se añadieron 10 µL de la concentración 10x de SCFAs (butirato y propionato de sodio, Alfa Aesar), a probar en cada línea celular y se dejó actuar durante 48 h. Como control se añadió agua molecular en las líneas celulares. Todas las concentraciones se probaron por triplicado.

La viabilidad celular se analizó mediante el uso de la tinción vital rojo neutro (RN, 3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazinehydrocloride, Sigma-Aldrich). Esta tinción va a ser incorporada por las células viables, fijándose en los lisosomas, mientras que en las células muertas este proceso no sucede.

Trascurrido el tiempo de incubación de los SCFAs a analizar, se añadió el compuesto diluido en el medio celular a una concentración de 40 µg/ml, siguiendo un protocolo ya descrito (Repetto et al. 2008), con una incubación de 2 h a 37 ºC y 5% de CO_2, y una posterior lectura de absorbancia a DO_{560nm} en el lector de placas Glomax (Promega), tras los sucesivos pasos de lavados y revelado.

3.14.3. Evaluación de la muerte y ciclo celular

Para evaluar la muerte y ciclo celular se añadieron entre 100.000 y 200.000 de células de las 3 líneas celulares en placas de 12 pocillos (Costar) con 2 ml de medio de cultivo durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se añadieron por triplicado 100 µL de la concentración 10x deseada de la mezcla de dos SCFAs a analizar, y de agua molecular como blanco.

Tras 48 h de incubación, las células se separaron usando 0,5 ml de tripsina-EDTA 1x (Sigma-Aldrich) en cada pocillo durante 7 min. Las células se lavaron dos veces con PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 y 1,8 mM KH_2PO_4) y se obtuvieron por centrifugación a 500 g durante 10 min.

Para evaluar la muerte celular, cada sedimento celular obtenido se incubó 10 min con 400 µL de una mezcla compuesta de 40 µL de Binding Buffer Anexin V 10x (InmunoStep), 4 µL de anexina V FITC (InmunoStep), 2 µL de ioduro de propidio 0,5 µg/ml (Sigma-Aldrich) y 354 µL de agua.

Finalizada la incubación, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo *Celular Cytomics F500* (Beckman Coulter) usando los detectores FL1 (525nm) frente a FL3 (620 nm) con un láser de excitación de 488 nm hasta contabilizar 10.000 eventos celulares. Se considera que la población de células positiva para el marcaje con anexina V y negativa para el ioduro de propidio se encuentran en apoptosis temprana, positiva para ambas en apoptosis tardía o necrosis y negativa en ambas para células vivas. Los datos fueron analizados mediante el programa informático *RXP Analysis* (Beckman Coulter).

En cuanto al ciclo celular, cada sedimento celular obtenido se incubó 5 min con 125 µL de tripsina, seguido de una segunda incubación de 10 min con 150 µL de inhibidor de tripsina y una última incubación de 10 min con 150 µL de ioduro de propidio 40 µM. Finalizada la incubación, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo *Celular Cytomics F500*

(Beckman Coulter) usando el detector FL3 (620 nm), con un láser de excitación de 488 nm, hasta contabilizar 10.000 eventos celulares. Los datos fueron analizados mediante el programa informático *ModFit LT* (Verity software House).

3.15. Análisis estadísticos y representación de datos

Los datos de cada grupo experimental fueron representados con la media aritmética ± el error de la media estándar.

Cada grupo se analizó mediante las pruebas de D`Agostino-Pearson y de Shapiro-Wilk para identificar si seguían una distribución de tipo Gaussiana (normalidad muestral). Cuando se realizaron comparaciones estadísticas entre dos grupos se utilizaron pruebas paramétricas en el caso de presentar normalidad muestral, en concreto, el t-test no pareada si se asumía igualdad de varianzas, y el t-test con corrección de Welch cuando no había igualdad de varianzas. Si las muestras no presentaban una distribución normal se utilizaba la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Para realizar los estudios estadísticos de más de 2 grupos se utilizó la prueba de Tukey de comparación múltiple cuando las muestras presentaban normalidad, y la prueba de Dunn de comparación múltiple cundo no existía normalidad.

Finalmente, para estudiar datos cualitativos se usaron las pruebas de χ^2.

Las representaciones gráficas fueron realizadas mediante el programa informático GraphPad Prism versión 7 (GraphPad software). En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativos cuando el p-valor era menor de 0,05 (*: $p<0,05$; **: $p<0,005$; ***: $p<0,0005$; ****: $p<0,0001$).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de alimentos cárnicos funcionales enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados para la prevención de CU en un modelo animal.

En este estudio se utilizaron 30 ratas macho Fischer 344, divididas en 3 grupos de alimentación. 10 ratas se alimentaron con pienso, 10 ratas con jamón control (jamón celta) y 10 ratas con jamón ibérico de bellota.

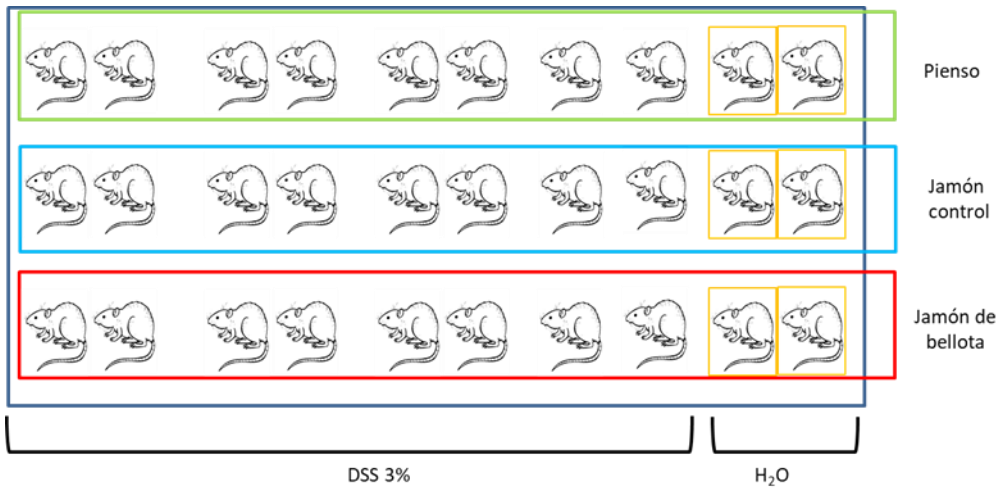

Figura 11: Esquema de la composición de los grupos experimentales. 8 ratas de cada uno de los 3 grupos se les indujo CU mediante la administración de DSS al 3% y las otras 2 ratas de cada grupo se les administró agua de consumo sirviendo como control absoluto.

Tras una semana de alimentación, a 8 animales de cada grupo se les indujo CU mediante la administración durante una semana de DSS al 3% en agua de consumo. 2 ratas de cada grupo se les administró agua sin DSS como control absoluto. Las ratas se les dejó una semana de recuperación tras la administración del DSS y se procedió al sacrificio.

4.1.1. Comparación nutricional entre el jamón control y el jamón ibérico de bellota

Los dos tipos de jamón se analizaron con respecto a los porcentajes de humedad, proteína total, grasa total, cloruros totales y cenizas totales. La principal diferencia aquí se asoció con el contenido de grasa total, que fue ligeramente mayor en jamón de bellota (21,4%) que en el jamón control (17,3%) [Tabla 1], mientras que, en el caso del pienso, el contenido de grasa fue mucho menor (4%) [Tabla 1]. Con respecto a la composición específica en ácidos grasos en el jamón de bellota, control y pienso, las principales diferencias entre jamón de bellota y

jamón de control dependen del contenido de ácido oleico, el contenido de este ácido graso monoinsaturado es mucho más alto en el jamón de bellota (51,92%) que en el jamón control (39,53%) y más del doble que en el pienso (20,58%) [Tabla 2]. Además, los niveles de ácidos grasos ω-6, considerados compuestos proinflamatorios, son el doble en el jamón control (20,84%) que en el jamón de bellota (11,74%) y casi 6 veces mayor en el pienso (58,82%). Esta diferencia de contenido ω-6 es responsable de una relación ω-6/ ω-3 mucho más baja en el jamón de bellota (9,97) que en el jamón control (17,56), porque el contenido de ω-3 es muy similar entre ambos jamones [Tabla 2]. También se analizaron ambos tipos de jamón por su contenido en nitratos y nitritos, habiendo una gran diferencia con respecto a los nitratos, cuya concentración en jamón de bellota fue 12,5 veces menor (15,04 ppm) que en el jamón control (188,67 ppm) [Tabla 1], debido a que el nitrato ni el nitrito se agregan como conservantes alimentarios en la fabricación del jamón de bellota.

4.1.2. Efecto de las dietas en los pesos de los animales y en el índice de actividad de la enfermedad

En las tres cohortes, el peso corporal de los animales se vio afectado por el tratamiento con DSS [Figura 12]. En la cohorte de pienso, 5 de los animales con CU no recuperaron la ganancia de peso corporal después de finalizar el tratamiento con DSS [Figura 12A]. Estos 5 animales fueron en realidad aquellos que más tarde, después del sacrificio, mostraron un mayor índice de actividad de la enfermedad en la mucosa del colon (grados 3 y 4) [Figura 12E].

En la cohorte de jamón control, 3 animales murieron al comienzo de la administración de DSS, y otros 3 animales murieron al final de este tratamiento [Figura 12B]. Estas 6 muertes se debieron a hemorragias en el colon durante el inicio de la CU. Solo 2 ratas en la cohorte de jamón control sobrevivieron hasta el sacrificio (ratas JC1 y JC5, con unos grados de índice de actividad de la enfermedad de 0 y 1), además de las 2 ratas controles absolutos (JC9 y JC10). Por lo tanto, durante el resto del estudio, y especialmente cuando se comparan muestras biológicas, la mayoría de los análisis estadísticos se llevaron a cabo entre la cohorte de jamón de bellota y la cohorte de pienso, ya que no fue apropiado introducir datos de solo 2 animales supervivientes de la cohorte de jamón control.

En la cohorte de jamón de bellota, el peso corporal se ralentizó ligeramente durante el tratamiento con DSS, pero este parámetro se recuperó después de que terminó la administración de DSS. Esta recuperación ocurrió en los 8 animales [Figura 12C].

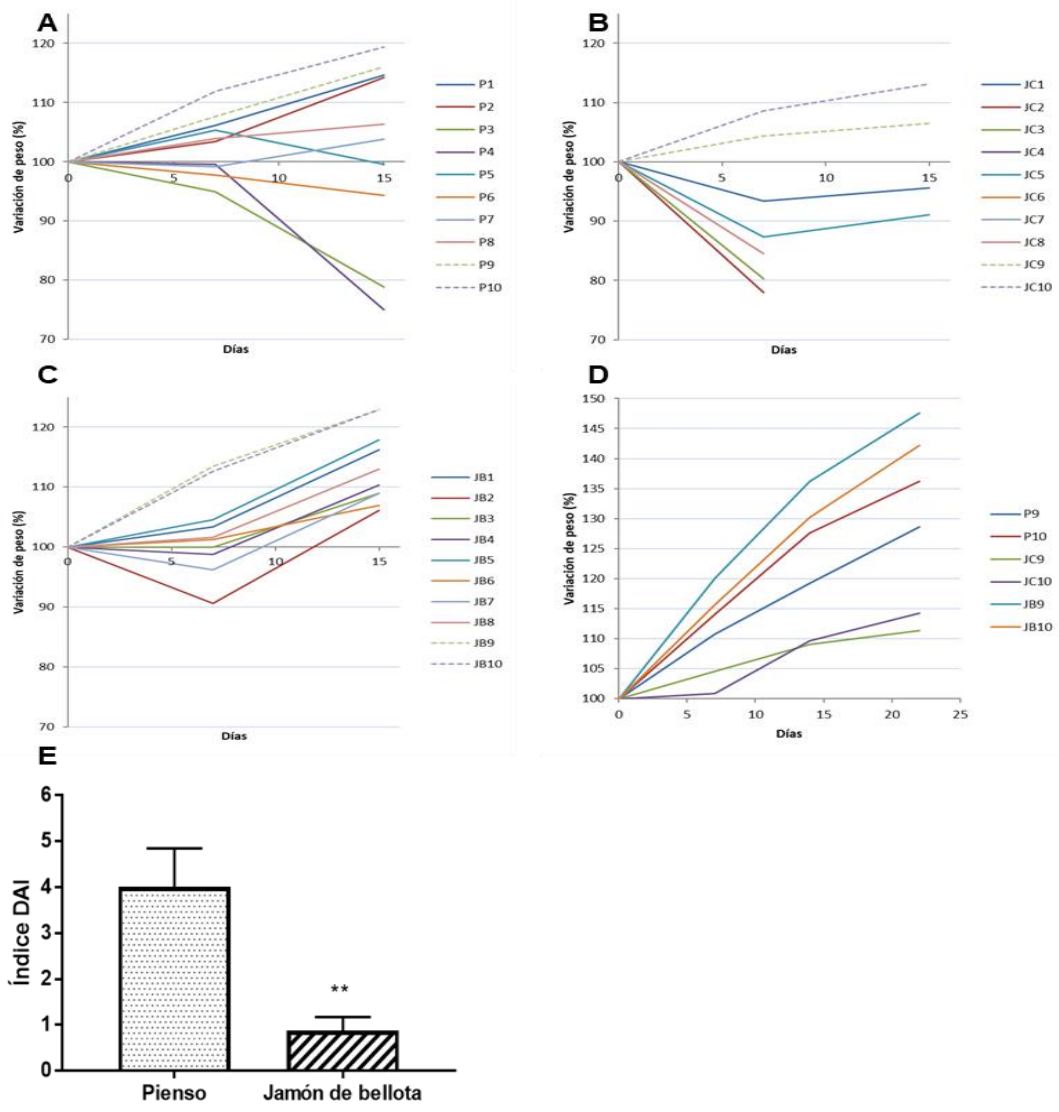

Figura 12: Efecto de la alimentación sobre el peso corporal y el índice de actividad de la enfermedad (DAI). A, porcentaje de reducción de peso corporal en la cohorte pienso; B, en la cohorte de jamón control; C, en la cohorte de jamón de bellota; y D, en las ratas de control absoluto (sin administración de DSS). Los datos se tomaron todas las semanas a lo largo del experimento de CU. El tratamiento de DSS tuvo lugar entre los días 7 y 14 del experimento. Las ratas se sacrificaron 1 semana después del final de la administración de DSS (día 21). E, índice de actividad de la enfermedad (DAI) para las cohortes de pienso (4 ± 0,84) y de jamón de bellota (0,87 ± 0,29). DAI es la suma de dos parámetros: pérdida de peso corporal (0, más del 5% de ganancia de peso corporal; 1, menos del 5% de ganancia de peso corporal y menos del 5% de pérdida de peso corporal; 2, del 5 al 10% de pérdida de peso corporal; 3, de 10 a 20% de pérdida de peso corporal; 4, más del 20% de pérdida de peso corporal) y consistencia de las heces (0, heces normales; 1, heces blandas; 2, diarrea acuosa; 3, diarrea viscosa con poca sangre; 4, diarrea acuosa severa con sangre).

Finalmente, las ratas de control absoluto mostraron en todos los casos (pienso, jamón control y jamón de bellota) una ganancia de peso corporal continua y normal a lo largo de las semanas experimentales, y un índice de actividad de la enfermedad CU de 0 [Figura 12D].

4.1.3. Efecto del jamón de bellota en parámetros histológicos

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la cohorte de jamón de bellota y la cohorte de pienso en los casos de la evaluación macroscópica de la CU

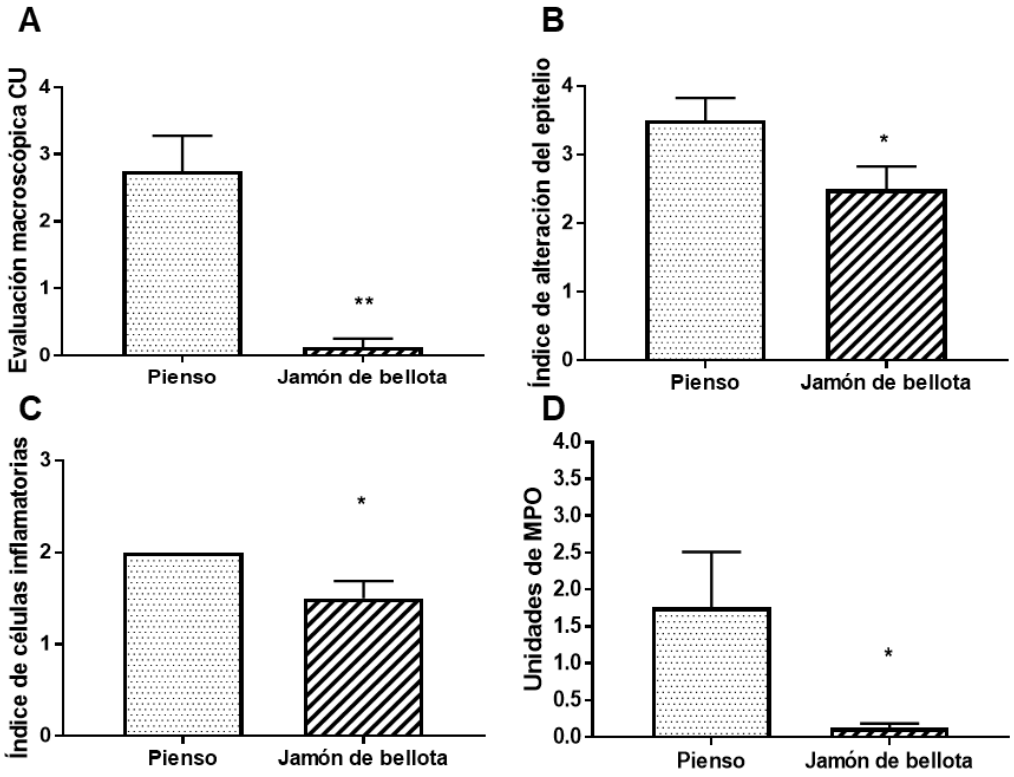

Figura 13: Efecto del jamón de bellota en las mediciones histológicas de colon. A, evaluación del daño macroscópico en la CU: 1, sin ulceración e hiperemia local; 2, ulceración sin hiperemia; 3, ulceración e inflamación en un solo sitio; 4, dos o más sitios de ulceración e inflamación. B, índice de la alteración del epitelio del colon: 0, sin alteración; 1, pérdida focal de células caliciformes; 2, pérdida extensa de células caliciformes; 3, pérdida de criptas menor que en el 50% de la superficie de la mucosa; 4, pérdida de criptas en más del 50% de la superficie de la mucosa y / o regeneración polipoidea. C, densidad celular inflamatoria en la mucosa del colon: 0, sin inflamación; 1, inflamación leve; 2, inflamación moderada; 3, inflamación severa. D, ensayo de mieloperoxidasa (MPO).

(puntuación del daño de 0,12 en la cohorte de jamón de bellota y 2,75 en la cohorte de pienso) [Figura 13A], en el caso de alteración del epitelio de colon (puntuación de 2,50 en la cohorte de jamón de bellota y 3,50 en la cohorte de pienso) [Figura 13B], y en el caso de la densidad

celular inflamatoria en la mucosa del colon (puntuación de 1,50 en la cohorte de jamón de bellota y 2,50 en la cohorte de pienso) [Figura 13C].

Respecto al ensayo de mieloperoxidasa (MPO), los niveles medios de mieloperoxidasa en la mucosa del colon de ratas alimentadas con jamón de bellota fueron mucho menores (0,13) que en la cohorte de pienso (1,76), y esta diferencia fue estadísticamente significativa [Figura 13D].

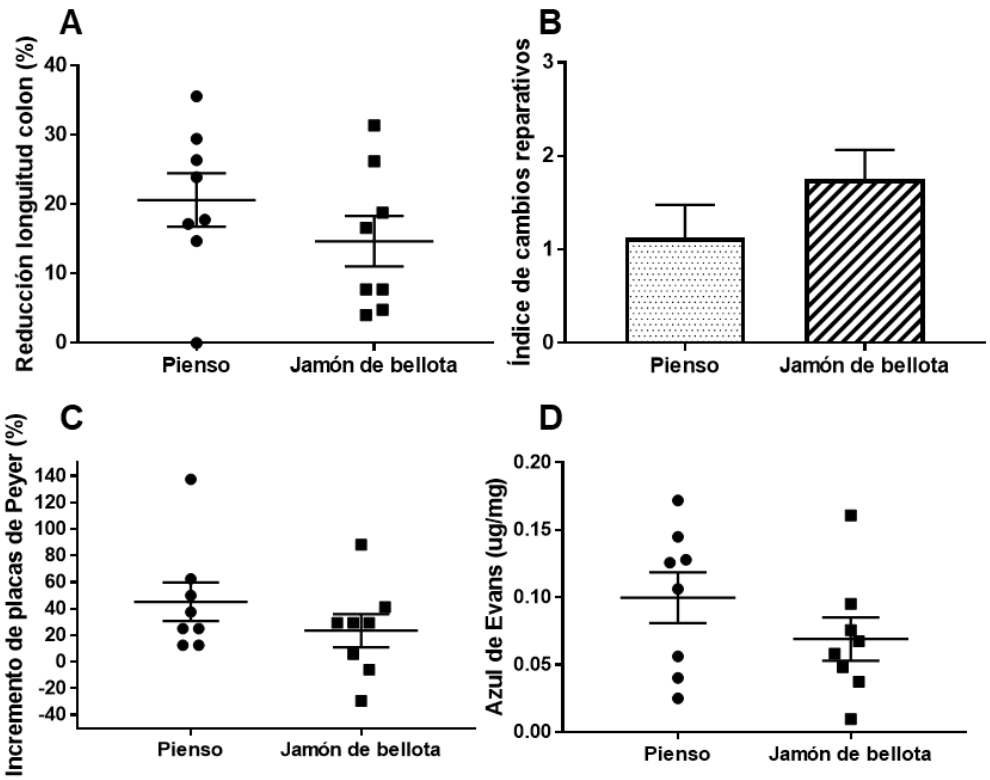

Figura 14: Efecto del jamón de bellota sobre los parámetros del colon y del intestino delgado. Los círculos y cuadrados indican el valor correspondiente para cada rata. A, porcentaje de reducción de la longitud del colon, en comparación con el valor medio para animales de control absoluto en cada cohorte. B, presencia de cambios reparativos en la mucosa del colon: 0, sin cambios reparativos; 1, cambios reparativos leves (menos del 50% de las ulceraciones de la superficie se vuelven a reepitelizar); 2, cambios reparativos moderados (más del 50% de las ulceraciones se vuelven a reepitelizar); 3, cambios reparativos severos (reepitelización de ulceraciones totales). C, porcentaje de incremento en el número de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado, en comparación con el valor medio de los controles absolutos en cada cohorte. D, ensayo de permeabilidad de Azul de Evans que indica alteraciones en la permeabilidad del colon (más elevado en condiciones de CU).

Otros tres parámetros asociados a los estudios histológicos de colon no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el jamón de bellota y las cohortes de alimento. Estos parámetros fueron la reducción de la longitud del colon, parámetro asociado a la severidad del estado de CU, donde el valor medio en el jamón de bellota fue menor (14,67%) que en

el caso del valor medio para la cohorte de pienso (20,62%) [Figura 14A]. La presencia de cambios reparativos en la mucosa del colon, un parámetro que indica recuperación tisular después de la ulceración de la mucosa del colon, en la cohorte de jamón de bellota el valor de media de reepitelización (1,75) fue mayor que en la cohorte de pienso (1,12) [Figura 14B]. Respecto al número de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado, en la cohorte de jamón de bellota (aumento del 23,53%) el valor medio de las placas de Peyer hiperplásicas fue menor que en la cohorte de pienso (aumento del 45,31%) [Figura 14C]. Y finalmente, también se llevó a cabo el ensayo de permeabilidad intestinal de azul de Evans, que no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la cohorte de jamón de bellota (0,06 μg / ml) y la cohorte de pienso (0,10 μg / ml). [Figura 14D].

4.1.4. Efecto del jamón de bellota sobre los niveles plasmáticos de citoquinas y la capacidad antioxidante

La cohorte de ratas alimentadas con jamón de bellota mostró una capacidad antioxidante total (FRAP) mucho mayor en el plasma sanguíneo (453,82 μM Trolox equivalente) que las ratas de la cohorte alimentadas con pienso (315,41 μM Trolox equivalente), y esta diferencia fue estadísticamente significativa [Figura 15A].

Con respecto a los dos tipos de citoquinas donde se observaron diferencias principales entre ratas de las cohortes de pienso y de las de jamón de bellota, IL-17, IFN-γ y TGF-β, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas solo en los casos de la IL-17 proinflamatoria (valor medio de 3,62 pg / ml en la cohorte de jamón de bellota y 15,92 pg / ml de valor medio en la cohorte de pienso) [Figura 15B] e IFN-γ (173,81 pg / ml de valor medio en la cohorte de jamón de bellota y 221,96 pg / ml de media valor en la cohorte de pienso) [Figura 15C].

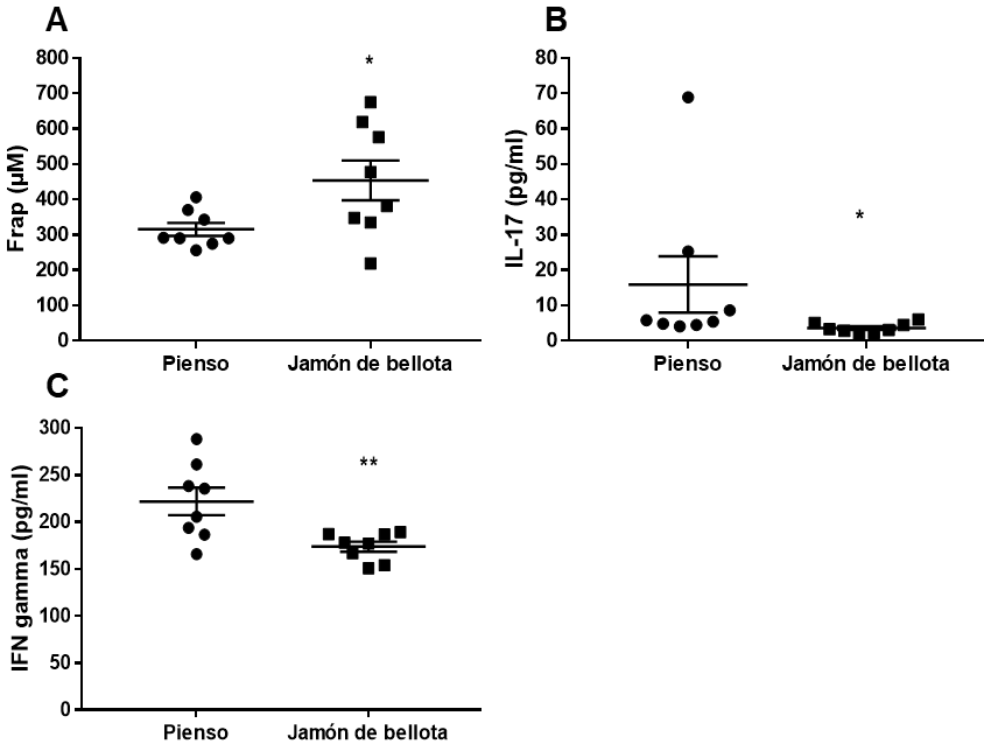

Figura 15: Efecto de la capacidad antioxidante total y los niveles de citoquinas en plasma sanguíneo. A, capacidad antioxidante total (FRAP). B, niveles plasmáticos medios de la citoquina IL-17 proinflamatoria. C, niveles plasmáticos medios de interferón-γ (IFN-γ).

4.1.5. Efecto del jamón de bellota sobre la concentración de SCFAs en heces de ciego intestinal

Se midieron diversos SCFAs por GC-MS en las heces del ciego recogidas durante los sacrificios. Estos SCFAs fueron los ácidos propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico y hexanoico, que son compuestos con gran importancia en la homeostasis del colon y en el estado de salud. En estas cuantificaciones, se usaron estándares deuterados para las mediciones (ver sección de materiales y métodos). Se observaron concentraciones estadísticamente significativas más altas en la cohorte de jamón de bellota en los casos de ácido isobutírico (valores medios de 2,06 mM frente a 1,62 mM en la cohorte del pienso) [Figura 16A], ácido isovalérico (0,0098 mM en jamón de bellota y 0,0023 mM en la cohorte de pienso) [Figura 16B], y ácido valérico (0,14 mM en la cohorte de jamón de bellota y 0,063 mM en la cohorte de pienso) [Figura 16C]. El valor medio para la concentración de ácido propiónico en los ciegos de animales de la cohorte de jamón de bellota (0,8546 mM) fue mayor que en la cohorte de pienso (0,7851 mM), pero esta diferencia no fue

estadísticamente significativa [Figura 16D]. Finalmente, el valor medio del ácido butírico fue mayor en la cohorte de pienso (0,98 mM) que en la cohorte de jamón de bellota (0,32 mM) [Figura 16E].

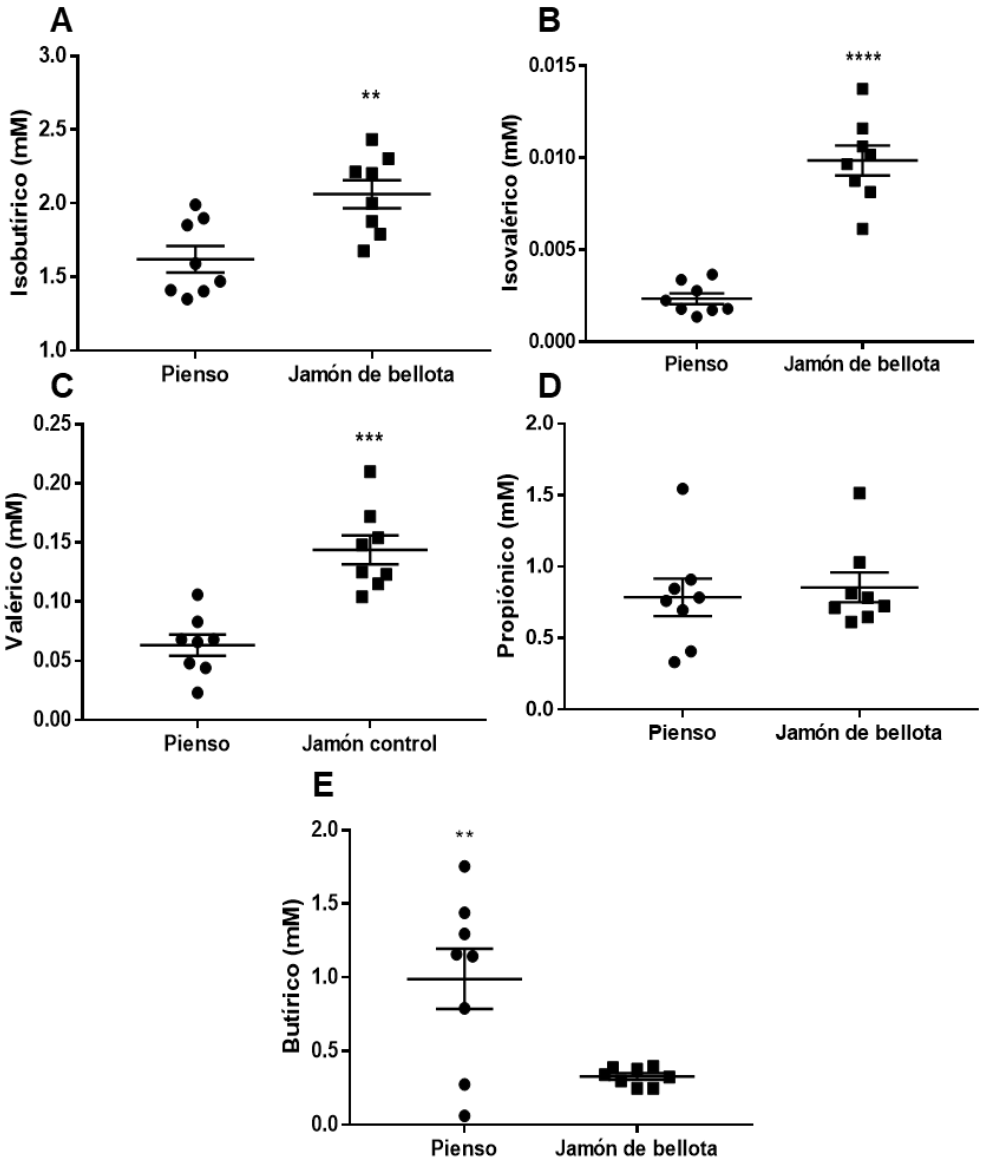

Figura 16: Efecto del jamón de bellota en la concentración de SCFA en heces de ciego. A, concentración (mM) de ácido isobutírico en heces del ciego. B, concentración (mM) de ácido isovalérico en heces del ciego. C, concentración (mM) de ácido valérico en heces del ciego. D, concentración (mM) de ácido propiónico en las heces del ciego. E, concentración (mM) de ácido butírico en las heces del ciego.

4.1.6. Efecto del jamón de bellota en la concentración de ácidos grasos en plasma sanguíneo

La Tabla 4 muestra los porcentajes para cada ácido graso en plasma sanguíneo de ratas de la cohorte de jamón de bellota y ratas de la cohorte de pienso. De acuerdo con el tipo de alimento en cada caso, los animales de la cohorte de jamón de bellota mostraron niveles plasmáticos más altos del ácido graso monoinsaturado ácido oleico (31,61%). Este valor fue el doble que el contenido de ácido oleico en las ratas de la cohorte de pienso (16,21%), y la diferencia fue estadísticamente significativa [Figura 17A].

ÁCIDOS GRASOS		NIVELES PLASMÁTICOS EN LA COHORTE DE RATAS DE JAMÓN DE BELLOTA %	NIVELES PLASMÁTICOS EN LA COHORTE DE RATAS DE PIENSO %
C14:0	Miristico	0,67	0,881
C16:0	Palmítico	21,99	25,598
C16:1n7	Palmitoleico	1,51	3,420
C17:0	Margárico	0,59	0,775
C18:0	Esteárico	13,40	11,693
C18:1	Oleico	31,61	16,215
C18:1n-7	11-Octadecanoico	5,15	3,928
C18:2n6	Linoleico	10,56	20,052
C18:3n3	α-linolénico	0,73	1,131
C20:0	Araquidico	0,19	0,12
C20:1n9	Eicosenoico	1,02	0,812
C20:4n6	Araquidónico	10,03	12,274
C22:4n6	Adrénico	1,20	1,320
C22:5n3	Docosapentaenoico	0,45	0,512
C22:6n3	Docosahexaenoico	1,10	1,389
		100%	100%
ω-3		2,28	3,032
ω-6		21,79	33,646
ω-6/ω-3		24,07	36,678

Tabla 4: Niveles medios de ácidos grasos en el plasma sanguíneo de las cohortes de ratas pertenecientes al jamón de bellota y de pienso. Se muestran los porcentajes para cada ácido graso. Los datos incluyen ácidos grasos saturados (como ácido mirístico o ácido palmítico), monoinsaturados (como ácido oleico o ácido palmitoleico), ω-6 (como ácido linoleico o ácido araquidónico) y ω-3 (como α-linolénico o DHA). La relación ω-6 / ω-3 es un parámetro muy importante con respecto a los problemas de salud del animal, esta relación se muestra en la parte inferior de la tabla para los dos tipos de plasma sanguíneo.

Por el contrario, el contenido plasmático del ácido linoleico (ácido graso ω-6) fue mucho mayor en animales de la cohorte de pienso (20,05%) que en la cohorte de jamón de bellota (10,56%) [Tabla 4], y esta diferencia fue estadísticamente significativa [Figura 17D]. Como este es el principal ácido graso ω-6 presente en dichos plasmas sanguíneos, esta diferencia provocó un mayor contenido total de ω-6 en el plasma de los animales de la cohorte de pienso (33,64%) frente a los de la cohorte de jamón de bellota (21,79%). También causó que la proporción de ω-6 / ω-3 en animales de la cohorte de pienso fuera mucho mayor (36,67) que en la cohorte de jamón de bellota (24,07) [Tabla 4]. Ambas diferencias, el contenido total de ω-6 y la relación ω-6 / ω-3 fueron estadísticamente significativas [Figura 17B y C].

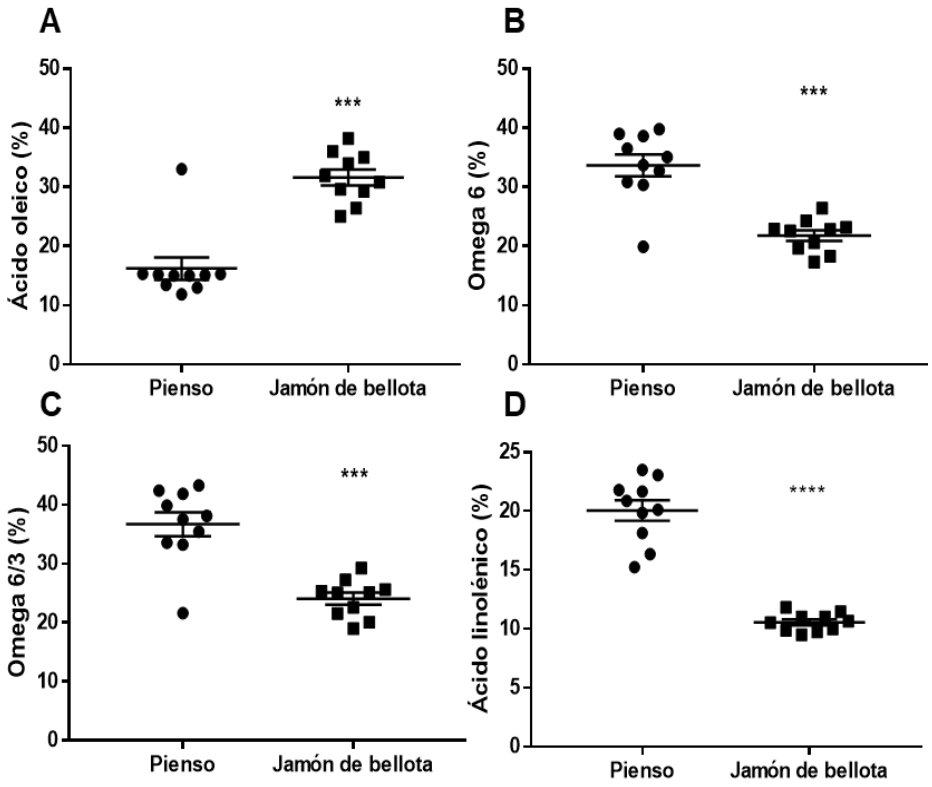

Figura 17: Efecto del jamón de bellota en los niveles plasmáticos de ácidos grasos de cadena corta. A, niveles plasmáticos de ácido oleico en ambas cohortes de ratas. B, niveles plasmáticos de ácidos grasos omega-6 en ambas cohortes de ratas. C, proporción plasmática de omega-6 / omega-3 en ambas cohortes de ratas. D, niveles plasmáticos de ácido linolénico en ambas cohortes de ratas.

4.1.7. Efecto del jamón de bellota sobre la composición de la microbiota intestinal

La principal diferencia a nivel de filo entre las tres cohortes secuenciadas, es que en las ratas utilizadas de control absoluto (aquellas que carecen del tratamiento de DSS) ambas dietas

de jamón mostraron un aumento similar en *Bacteroidetes* (44% en ambas cohortes de jamón frente a 13% en la cohorte de pienso) y *Proteobacteria* (21% en ambas cohortes de jamón frente a menos del 1% en la cohorte de pienso) y una disminución similar en *Firmicutes* (34% en ambas cohortes de jamón frente al 84% en la cohorte de pienso) [Figura 18], con respecto a la cohorte de ratas alimentadas con pienso. La distribución de estos filos en las ratas tratadas con DSS disminuyó a lo largo de los números mostrados anteriormente para los animales de control absoluto, con la excepción de la rata P4 (y en menor medida, la rata P3) de la cohorte de pienso, que mostró una profundidad disbiosis [Figura 18].

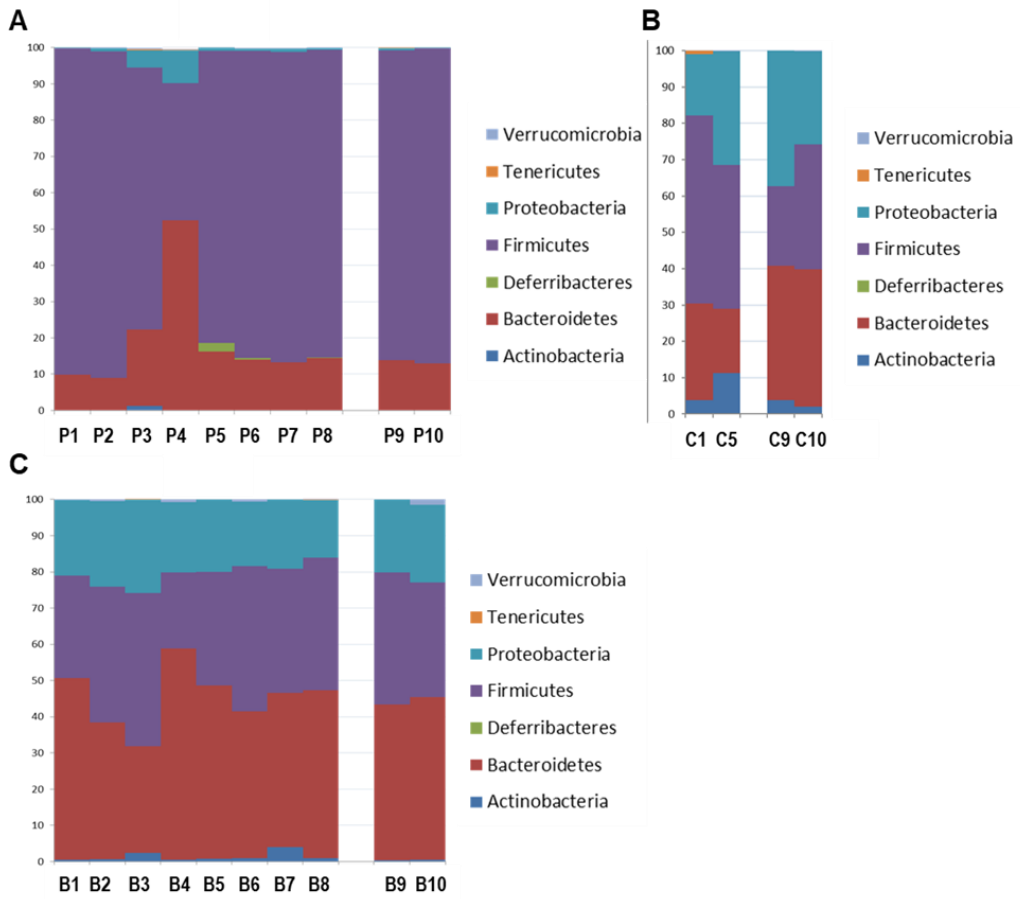

Figura 18: Composición de la microbiota intestinal (Filo). Composición a nivel de Filos (*Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Deferribacteres*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*) para todos los animales supervivientes en este estudio. A, animales de la cohorte de pienso; B, animales de la cohorte de jamón control; C, animales de la cohorte de jamón de bellota. P: pienso, C: jamón control; B: jamón de bellota.

La composición de la microbiota a nivel de familia, en general, la composición de familias en ambos tipos de cohortes de jamón fue muy similar, y bastante diferente de los animales de la cohorte de pienso [Figura 19]. Los animales de la cohorte de jamón de bellota

mostraron una proporción relativamente mayor de *Coriobacteriaceae* (*Actinobacteria*), *Bacteroidaceae* y *Rikenellaceae* (*Bacteroidetes*), *Desulfovibrionaceae* y *Sutterellaceae* (*Proteobacteria*), *Staphylococcaceae*, *Eubacteriaceae* y *Erysipelotrichaceae* (*Firmicutes*). Estos animales mostraron una menor proporción de *Prevotellaceae* (*Bacteroidetes*), *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Lactobacillaceae* (*Firmicutes*) en comparación con los animales de la cohorte de pienso [Figuras 19 y 20]. La principal excepción a este nivel entre ambas cohortes de jamón es la presencia de un 11% de *Enterococcaceae* solo en los dos animales que sobrevivieron al tratamiento de DSS en el caso de la cohorte de jamón control [Figuras 19 y 20].

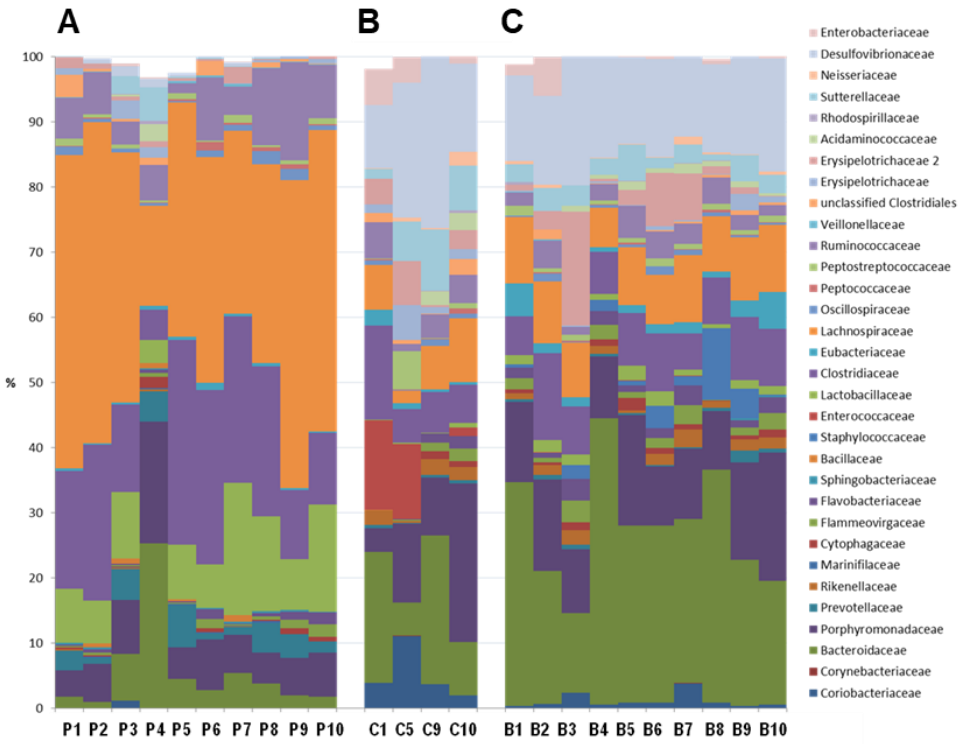

Figura 19: Composición de la microbiota intestinal (Familias). Composición a nivel de familias para todos los animales supervivientes en este estudio. A, animales de la cohorte de pienso; B animales de la cohorte de jamón control; C, animales de la cohorte de jamón de bellota. P: pienso, C: jamón control; B: jamón de bellota.

Los animales tratados con DSS de cada cohorte mostraron una distribución familiar similar a la de sus compañeros que no se les indujo CU. La excepción, nuevamente, fue para los animales P3 y P4 de la cohorte de pienso [Figura 19]. También es de interés la presencia significativa (13% del total) de la familia *Enterococcaceae* en los dos animales supervivientes (después del tratamiento con DSS) de la cohorte de jamón control. La proporción de esta familia en uno de los animales control de la misma cohorte es de alrededor

del 1%, y en todos los otros animales del experimento, esta familia está mínimamente presente o está totalmente ausente.

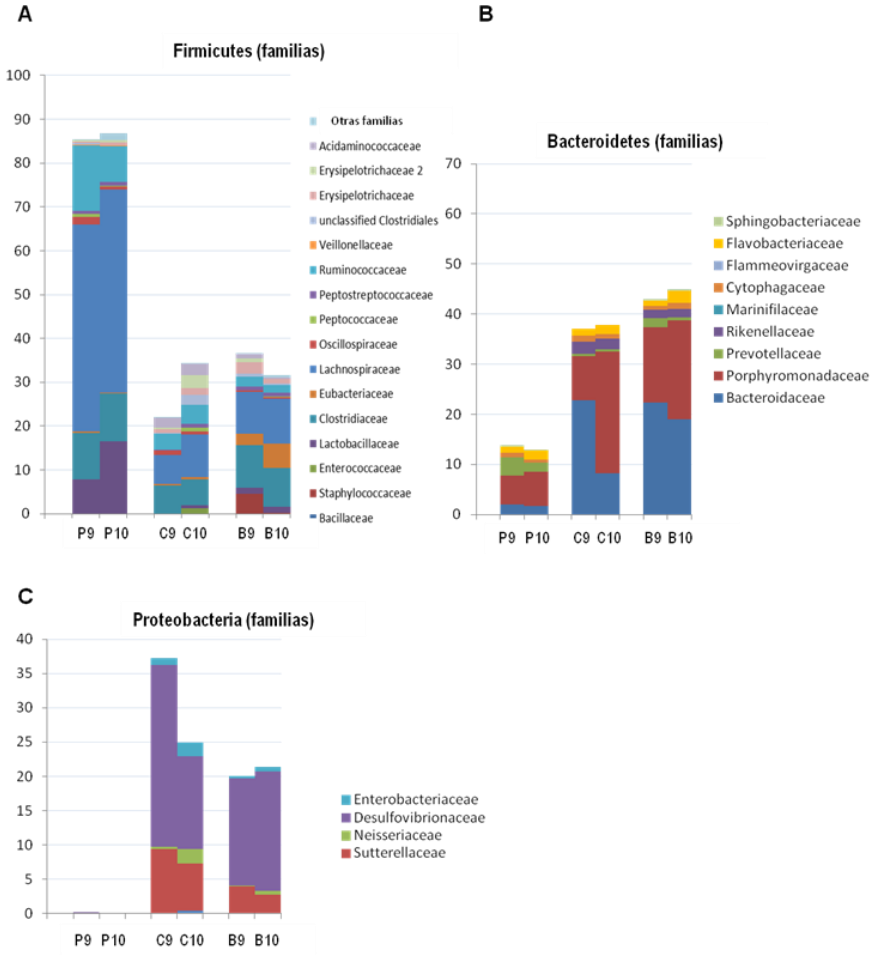

Figura 20: Composición de la microbiota intestinal (filo). Los animales de control absoluto (aquellos que no recibieron el tratamiento de DSS), mostraron diferencias importantes de microbiota, debido a las diferentes composiciones de dieta. Los animales de la cohorte de alimentación contenían principalmente *Firmicutes* (85%) y *Bacteroidetes* (14%). Sin embargo, ambos tipos de animales de cohortes de jamón mostraron un claro aumento en las poblaciones de *Bacteroidetes* (35%) y en *Proteobacteria* (25%), con claras reducciones en las poblaciones de *Firmicutes*. Además, el filo *Actinobacteria* solo apareció en ambas cohortes de jamón. F: pienso, C: jamón control; A: jamón de bellota.

4.2. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con antocianinas para la prevención de CCR en un modelo animal.

En este estudio se emplearon 30 ratas macho Fischer 344 divididas en 3 grupos de alimentación: pienso, salchichas control y salchichas funcionales con antocianinas (10% de una combinación de mora y fresa). Tras una semana del comienzo de la alimentación, a 8 ratas de cada grupo se les indujo CCR mediante dos dosis intraperitoneales de AOM a 10 mg/kg separadas por una semana.

Para potenciar el efecto del AOM se les administró DSS al 3% una semana posterior a la segunda dosis de AOM y en la semana 15 se les administró una segunda dosis de DSS al 2%.

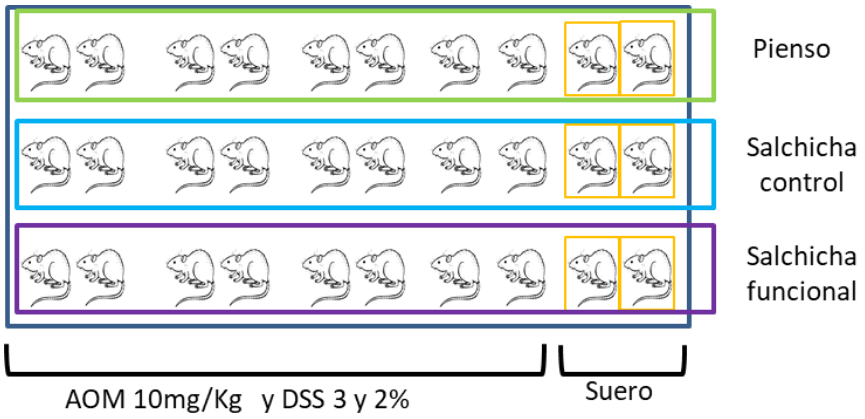

Figura 21: Esquema de la composición de los grupos experimentales. 8 ratas de cada uno de los 3 grupos de les indujo CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 2 periodos de DSS al 3% y 2%. Las otras 2 ratas de cada grupo no se les administró el tratamiento sirviendo como control absoluto.

El DSS produce CU que va a promover con una inflamación crónica el desarrollo del CCR. 2 ratas de cada grupo fueron utilizadas como control absoluto, por lo que no se les administró el AOM ni el DSS. La duración total del experimento fue de 20 semanas tras la primera dosis de AOM que se consideró como la primera semana experimental.

4.2.1. Efecto de las salchichas funcionales sobre el peso corporal

Los animales de las tres cohortes mantuvieron un aumento de peso constante a lo largo de las 20 semanas experimentales (La primera dosis de AOM para la inducción de CCR tuvo lugar en la semana 3). Sin embargo, en la figura 22A es evidente que durante las dos semanas de tratamiento con DSS (semanas 4 y 15), los animales de la cohorte de pienso sufrieron una ralentización en el aumento de peso. La rata número 3 de la cohorte de pienso murió durante el segundo tratamiento de DSS como consecuencia de una hemorragia rectal intensa causada por la inducción de CU transitoria, que fue un paso proinflamatorio necesario para aumentar el desarrollo del CCR y obtener mejores resultados.

Cuando los animales fueron sacrificados, el valor promedio del peso para la cohorte de pienso fue de 311,2 ± 39,6 g, para la cohorte de salchichas control fue 341,0 ± 25,6 g y para la cohorte de salchichas funcionales fue de 354,7 ± 15,1 g.

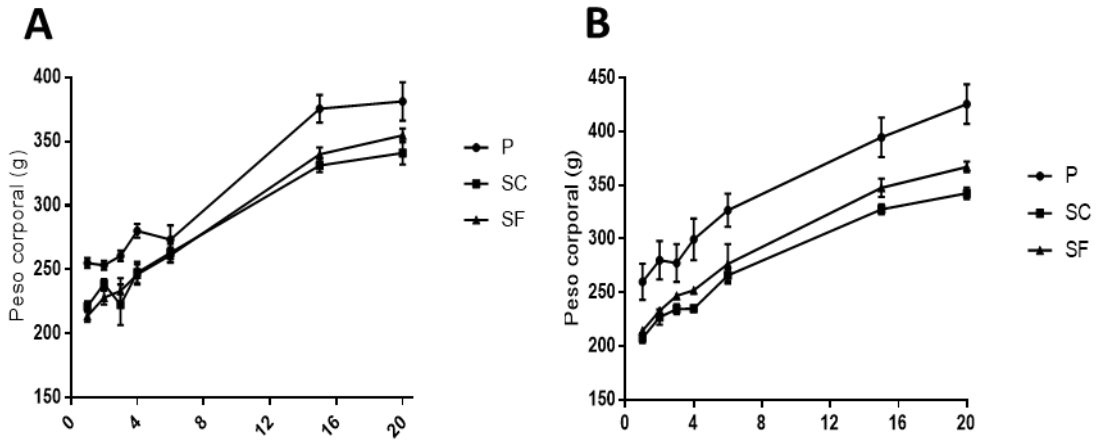

Figura 22: A, Evolución del peso corporal durante todo el experimento para las ocho ratas tratadas para inducirles CCR en las tres cohortes. El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 3, 4, 7, 15 y 20; B, Evolución del peso corporal a lo largo de todo el experimento para los dos controles absolutos (sin inducción de CCR) en las tres cohortes. El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 3, 4, 7, 15 y 20. P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales.

En la figura 22B se muestra la gráfica relativa a los animales utilizados como control absoluto (ratas 9 y 10 de cada cohorte), el aumento de peso corporal fue más constante durante todo el experimento, ya que estos animales no se les administró AOM ni DSS. Cuando estos animales fueron sacrificados, el valor medio para la cohorte de pienso fue de 425,5 ± 26,1 g, en la cohorte de salchichas control el peso fue de 342,5 ± 7,7 g y para la cohorte de salchichas funcionales fue de 367,0 ± 7,0 g.

4.2.2. Efecto de las salchichas funcionales sobre el número de placas de Peyer hiperplásicas

Tras el sacrificio se cuantificaron el número de placas de Peyer hiperplásicas presentes en la superficie del intestino delgado. Las placas de Peyer son parte del sistema inmune presentes en la mucosa del intestino delgado y contienen grandes cantidades de linfocitos. Estos nódulos linfoides pueden volverse hiperplásicos como respuesta a un daño o infección y, por lo tanto, son fácilmente visibles en el intestino delgado como protuberancias redondeadas y blanquecinas sobre la mucosa [Figura 23B].

En este estudio, los animales control de las 3 cohortes de alimentación tuvieron un valor medio de 5,83± 0,16, este valor se incrementó en los animales a los que se les indujo CCR debido a los daños de esta enfermedad. El valor promedio en la cohorte de salchichas control fue de 11,8 ± 0,6 placas, mientras que en la cohorte de pienso fue de 8,7 ± 0,4. Este descenso en el numero fue estadísticamente significativo (p-valor de 0,0032).

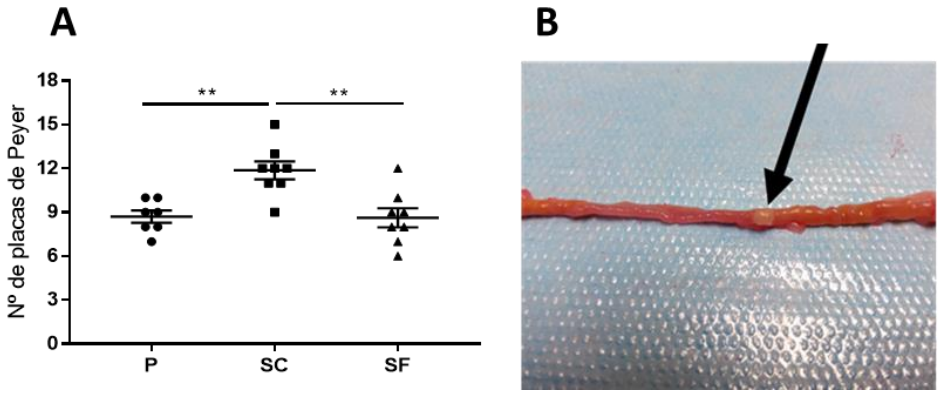

Figura 23: A, Número medio de placas de Peyer hiperplásicas en cada cohorte de alimentación (8 ratas de cada grupo que se les indujo CCR) con diferencias significativas entre ellos; B, Imagen que muestra una placa de Peyer hiperplásica sobre la superficie del intestino delgado, aparece como una protuberancia redondeada y blanquecina de unos 2-3 mm de diámetro (flecha negra). P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales.

En la cohorte con alimentación de salchichas funcionales el valor medio de las placas de Peyer fue de 8,6 ± 0,6, siendo este descenso respecto a la cohorte de salchichas control estadísticamente significativo (p-valor de 0,0018) [Figura 23A].

4.2.3. Efecto de las salchichas funcionales sobre la capacidad antioxidante en plasma sanguíneo

A partir del plasma sanguíneo extraído en el sacrificio, se cuantificó los niveles antioxidantes presentes en el.

Las ratas alimentadas con salchichas funcionales presentaron niveles de antioxidantes más elevados, 376,8 ± 38,3 µM, mientras que las salchichas control presentaron valores de 309 ± 37,9 µM, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Si se observaron diferencias significativas en la cohorte alimentada con pienso (valores de 254,2 ± 15,7 µM) cuando se comparaba con la cohorte alimentada con salchichas funcionales (p-valor de 0,048) [Figura 24].

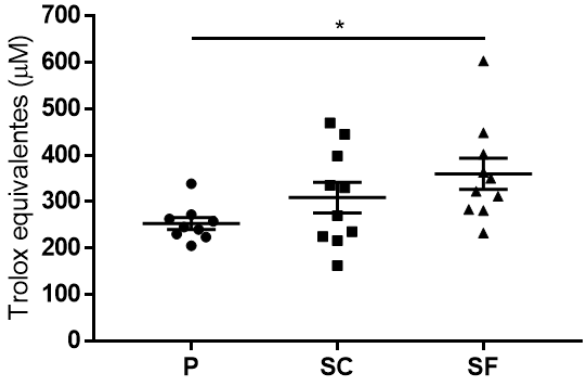

Figura 24: Valor medio de la capacidad antioxidante total en sangre de las 8 ratas con CCR de cada cohorte de alimentación medido en equivalentes Trolox (µM). P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales.

4.2.4. Efecto de las salchichas funcionales sobre el peso del ciego

Se pesaron los ciegos de cada animal tras el sacrificio, observándose diferencias significativas (p-valor de 0,0001) entre los valores medios de la cohorte de pienso (6,1 ± 0,4 g) y los valores medios de las cohortes de salchicha control (3,67 ± 0,1 g) y la de salchicha funcional (3,85 ± 0,2 g) [Figura 25].

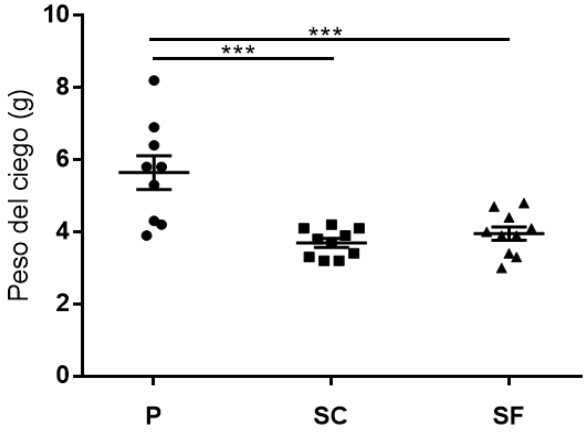

Figura 25: Valor medio en gramos del peso del ciego para las 3 cohortes de alimentación, siendo incluidos las 8 ratas de cada grupo a las que se las indujo CCR. P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales.

4.2.5. Efecto de las salchichas funcionales sobre el número de tumores y el área intestinal afectada

Tras el sacrificio se analizó la mucosa colónica para determinar el número de pólipos presente en cada animal a los que se les indujo CCR (8 animales de cada cohorte). En este ensayo se contabilizaron los pólipos macroscópicos que variaron en un tamaño entre 1 y 11 mm de diámetro.

El número de medio de pólipos disminuyó un 46,4% en la cohorte de salchichas funcionales (31,8 ± 3,3) respecto a la cohorte de pienso (58,5 ± 9,5), siendo una diferencia estadísticamente significativa (p-valor de 0,0241). Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó la cohorte de salchicha funcional con la de salchicha control (44,5 ± 6,2) [Figura 26A].

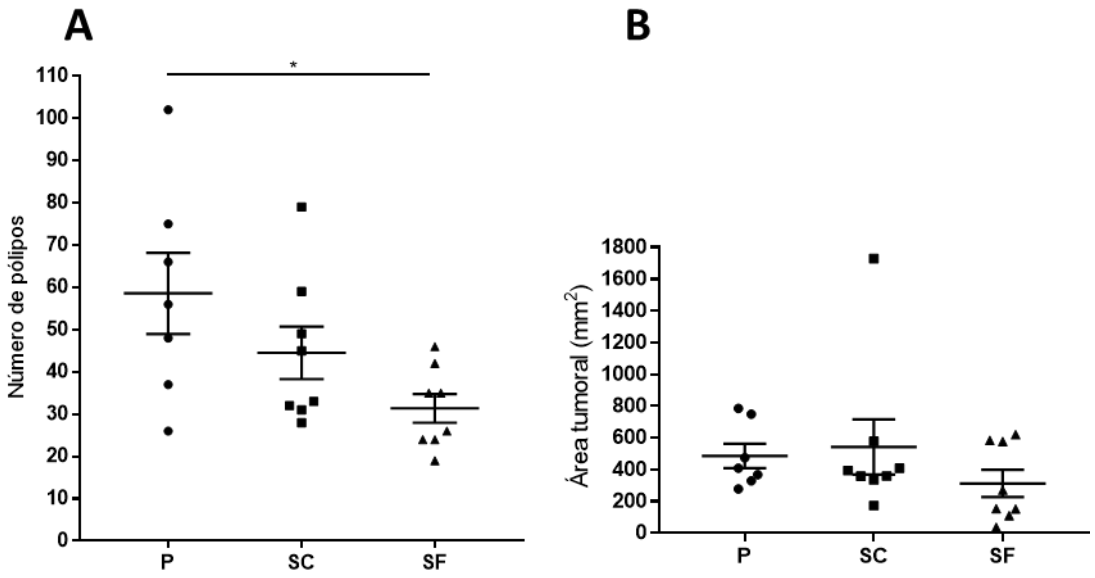

Figura 26: A, Valor medio de los pólipos del intestino grueso en las 8 ratas que se les indujeron CCR en cada cohorte de alimentación. Las ratas utilizadas como control absoluto (ratas 9 y 10 de cada cohorte) no mostraron ningún tipo de lesión en la mucosa colónica; B, Valor medio del área del intestino grueso afectada por tumores. Para cada animal se calculó el área individual de cada pólipo sumándose todos y generando la media de cada cohorte. P: cohorte de pienso, SC: cohorte de salchichas control, SF: cohorte de salchichas funcionales.

Por otro lado, se midió cada pólipo calculando el área que ocupaba del intestino grueso de cada animal. Al final se calculó la media de cada cohorte de alimentación, mostrando en la cohorte de salchichas funcionales (313,1 ± 85,3 mm^2) una reducción del 35,4% del área afectado respecto a la cohorte de pienso (484,8 ± 76,6 mm^2) y del 42,2% respecto a la cohorte

de salchicha control (541,8 ± 174,1 mm^2). Sin embargo, estas reducciones no fueron estadísticamente significativas [Figura 26B].

4.2.6. Efecto de las salchichas funcionales sobre la composición de la microbiota intestinal

La secuenciación metagenómica de la microbiota intestinal mostró diferencias a nivel de la composición de los filos cuando se compara la cohorte de pienso con las de salchicha control y salchicha funcional [Tabla 5].

La principal diferencia entre estas cohortes es la casi ausencia del filo *Proteobacteria* en la cohorte de pienso (0,3%), mientras que este filo es el segundo más común en la cohorte de salchicha control (15,8%) y el tercero más común en la cohorte de salchicha funcional (10,4%) [Tabla 5].

	Pienso (%)	Salchicha control (%)	Salchicha funcional (%)
Actinobacteria	0,06	1,22	1,08
Bacteroidetes	16,42	12,44	12,11
Firmicutes	83,00	69,61	75,18
Proteobacteria	0,32	15,84	10,49
Spirochaetes	0,00	0,01	0,02
Synergistetes	0,00	0,02	0,06
Tenericutes	0,18	0,00	0,01
Verrucomicrobia	0,01	0,85	0,87
Deferribacteretes	0,00	0,02	0,19

Tabla 5: Media del porcentaje de la composición de la microbiota intestinal a nivel de Filo en las 3 cohortes de alimentación estudiadas.

Además, se encontró una mayor biodiversidad en las dos cohortes de salchichas, como lo demuestra el número de filos (aunque en bajas proporciones) presente en su composición [Tabla 5].

Al analizar las proporciones de los filos en las 20 ratas de las cohortes de salchichas (control y funcional), se encuentra una distribución homogénea entre todas las ratas de cada cohorte [Figura 27], siendo *Firmicutes* el filo predominante (82,9 % en la cohorte de pienso) con un 69,6 % en la cohorte de salchicha control y un 75,1 % en la cohorte de salchicha funcional [Tabla 5].

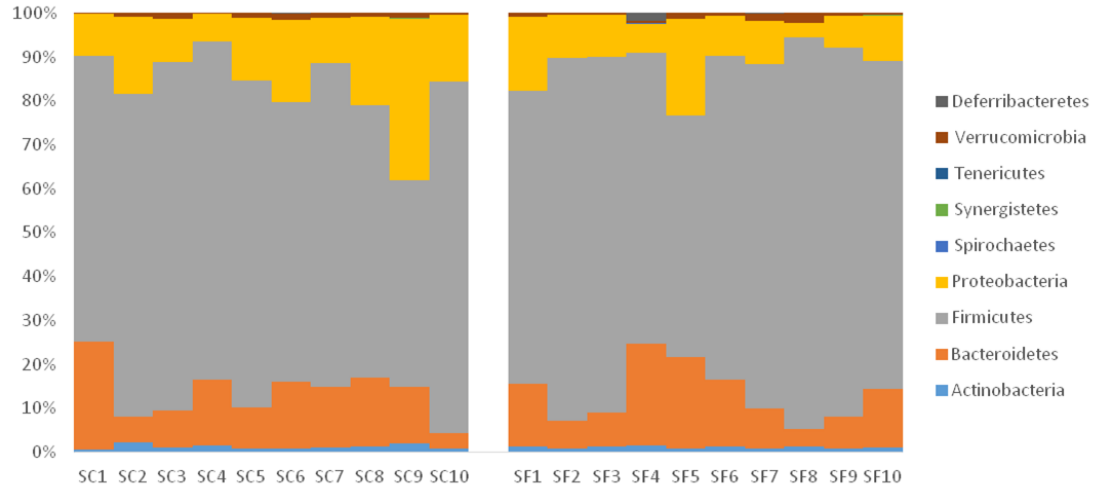

Figura 27: Composición de la microbiota intestinal, a nivel de filo, en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchichas control (SC1 a SC10), y en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchichas funcionales (SF1 a SF10). SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional.

En el caso de las ratas pertenecientes a la cohorte de salchicha control, el segundo filo más abundante es *Proteobacteria*, pero en el caso de la cohorte de salchicha funcional, el segundo filo más abundante es *Bacteroidetes* (12,1 %, mientras que en la cohorte de salchichas control es un 12,4%) [Figura 27].

A nivel de familias, las dos cohortes alimentadas con productos cárnicos mostraron composiciones similares [Figuras 28 y 29], pero con claros incrementos de distintas familias con respecto a la cohorte de pienso. Por ejemplo, *Lactobacillaceae* es más abundante en las cohortes de salchichas control y funcional (32,80 % y 33,23 % respectivamente, frente al 7,72 % en la cohorte de pienso), así como *Desulfovibrionaceae* (11,09 % y 7,96 % en las cohortes de salchichas, frente al 0,26 % en la cohorte de pienso), *Bacteroidaceae* (4,44 % y 3,51 % respectivamente, frente al 1,93 % en la cohorte de pienso), *Enterobacteriaceae* (4,65% y 2,38% respectivamente, frente al 0% en la cohorte de pienso), y *Coriobacteriaceae* (1.04% en ambos, frente al 0% en la cohorte de pienso) [Figura 28].

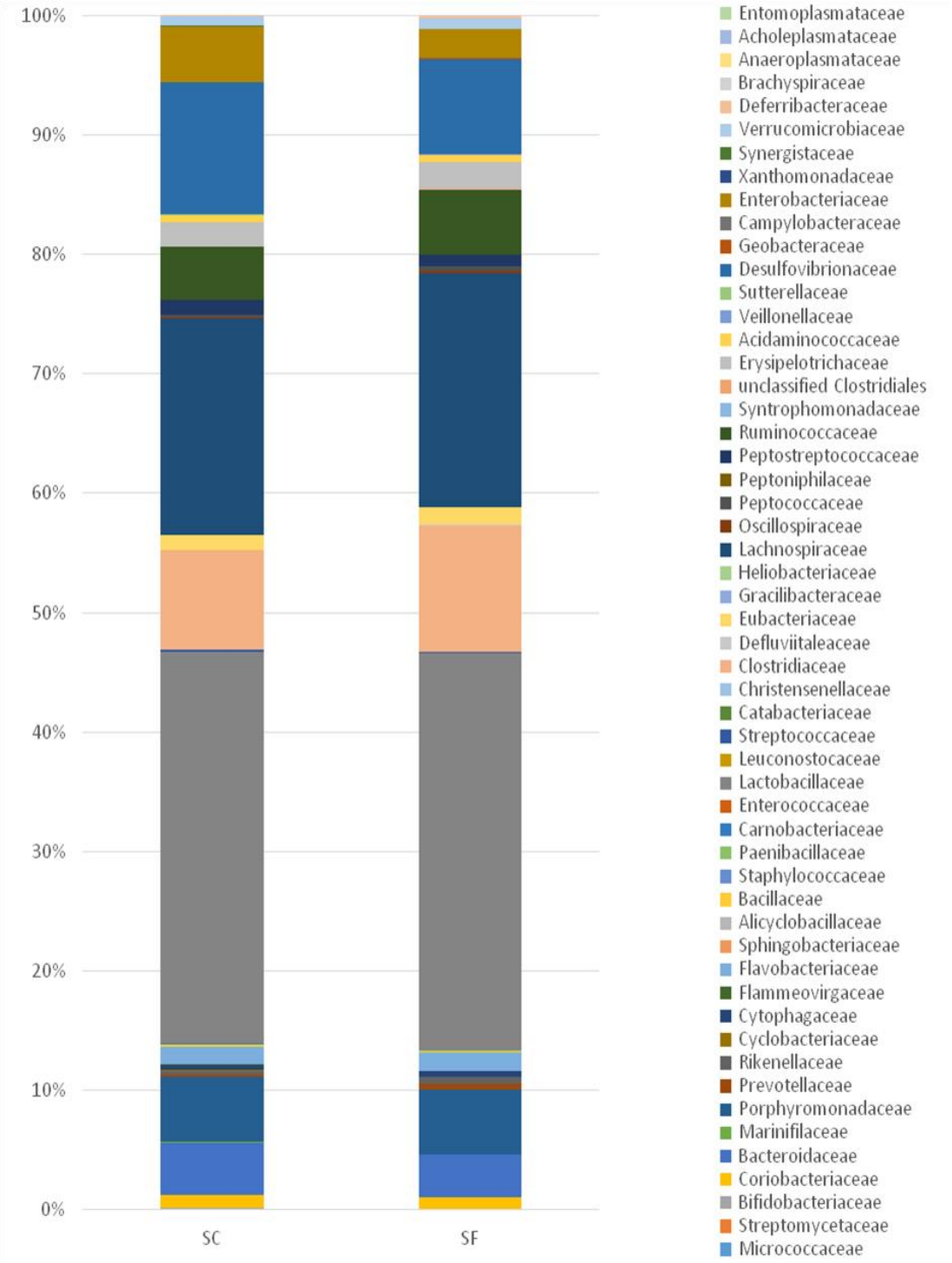

Figura 28: Diferencias en la composición media de la microbiota intestinal a nivel de familias para las ratas pertenecientes a ambas cohortes de salchichas. SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional.

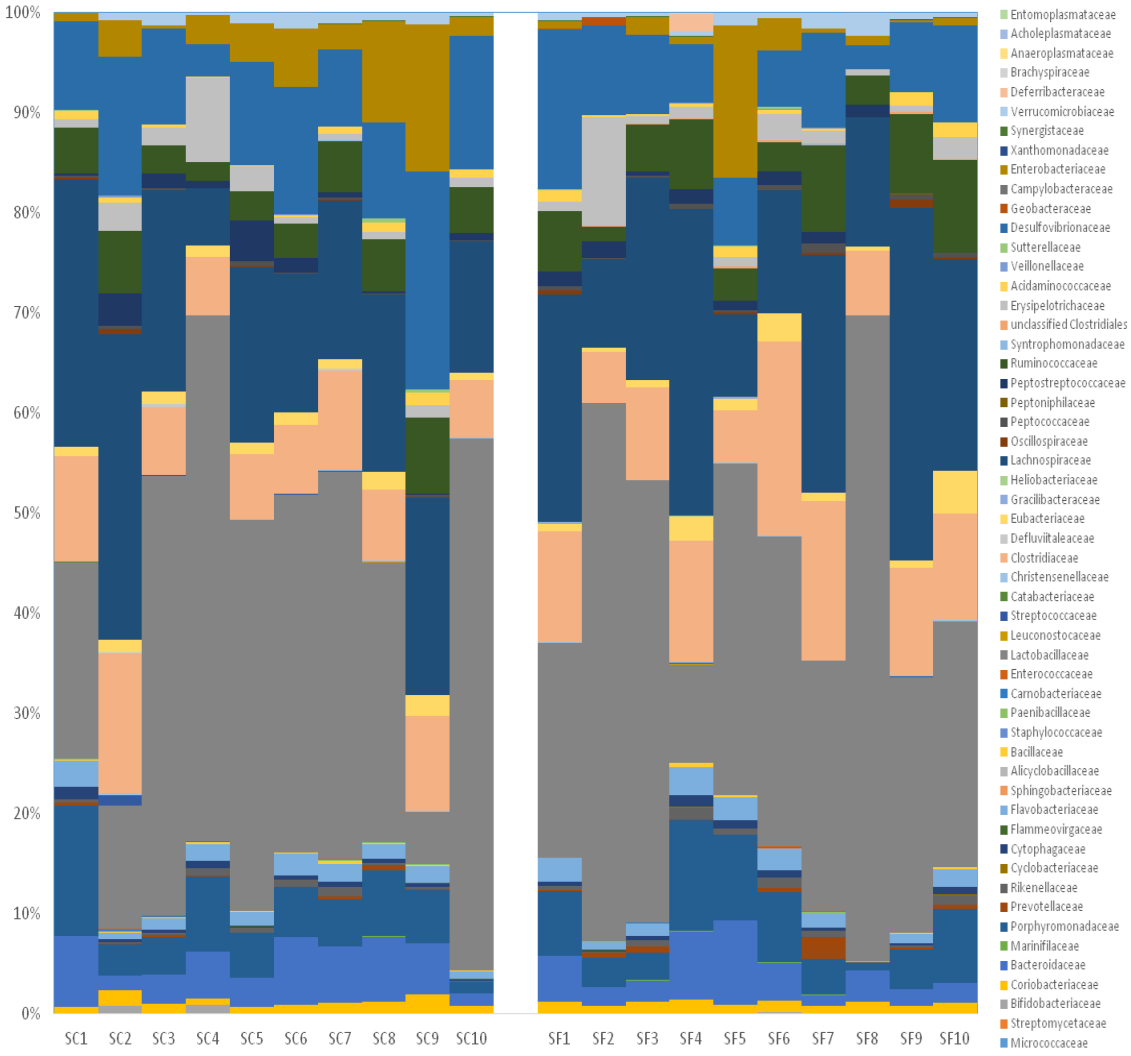

Figura 29: Composición de la microbiota intestinal a nivel de familias en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchicha control (SC1 a SC10) y en las ratas pertenecientes a la cohorte de salchicha funcional (SF1 a SF10). SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional.

En ambas cohortes de salchichas, las principales diferencias a nivel de familias se observan con respecto a tres [Figura 28 y 29]. *Clostridiaceae* es una familia más abundante en la cohorte de salchicha funcional (10,56 %) frente a la cohorte de salchicha control (8,28 %). *Desulfovibrionaceae* y *Enterobacteriaceae* están menos presentes en la cohorte de salchicha funcional (7,96 % y 2,38 % respectivamente) con respecto a la cohorte de salchicha control (11,09 % y 4,65 % respectivamente).

A nivel de género y especie, la única diferencia significativa se encontró en la familia *Desulfovibrionaceae* en particular en la especie *Bilophila wadsworthia*, que representa el 7,90 % en la cohorte de salchicha control, frente a solo un 4,94 % en las ratas de la cohorte

de salchicha funcional. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con un p-valor de 0,1 [Figura 30].

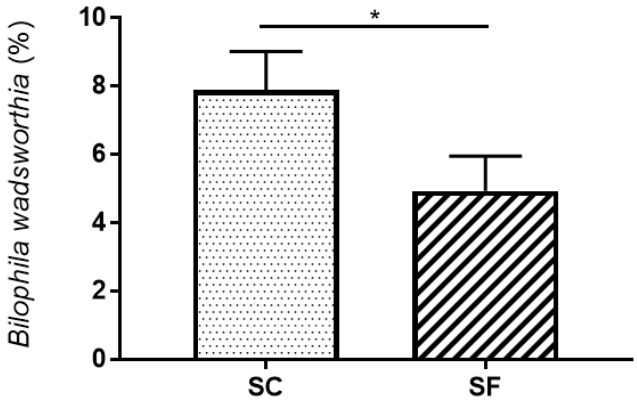

Figura 30: Diferencias en la composición de *Bilophila wadsworthia* para las ratas pertenecientes a la cohorte de salchicha control y la cohorte de salchicha funcional. SC: cohorte de salchicha control, SF: cohorte de salchicha funcional.

4.3. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con prebióticos derivados de lactulosa para la prevención de CCR en un modelo animal

En este experimento, se utilizaron 20 ratas macho Fischer 344 divididas en dos grupos de alimentación: un grupo de pienso como control y un grupo de GOS-Lu. Ambos grupos fueron alimentados con pienso *ad libitum* y en el grupo experimental se añadió un 10% (p/v) del prebiótico GOS-Lu disuelto en el agua de bebida.

Tras la primera semana de alimentación, a 8 de los 10 animales de cada grupo, se administró intraperitonealmente 2 dosis de AOM a 10 mg / kg, separados entre sí por una semana, para inducir CCR. Una semana posterior a la segunda dosis, se administra DSS al 3%, y en la semana se lleva a cabo la segunda administración de DSS al 2 % para inducir CU y promover una inflamación sistémica que promueva el desarrollo del CCR. A 2 ratas de cada grupo no se les realizó el tratamiento de inducción de CCR sirviendo como control absoluto del grupo. La duración total del experimento fue de 20 semanas empezando a contar tras la primera dosis de AOM

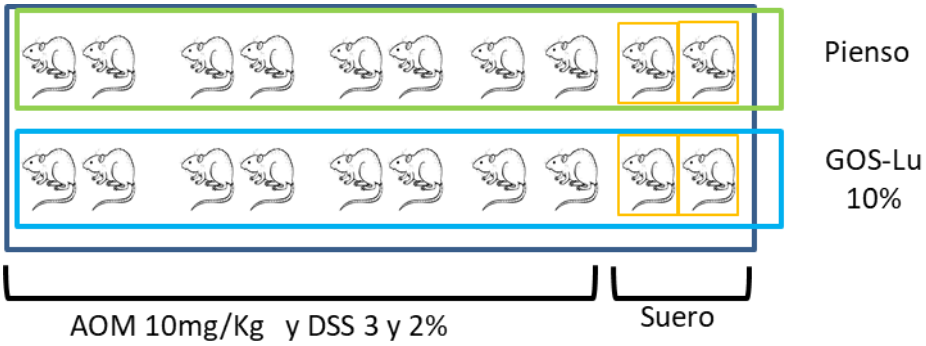

Figura 31: Esquema de la composición de los 2 grupos experimentales. 8 ratas de cada uno de los 2 grupos de les indujo CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 2 periodos de DSS al 3% y 2%. Las otras 2 ratas de cada grupo no se les administró el tratamiento sirviendo como control absoluto.

4.3.1. Efecto del GOS-Lu sobre el peso corporal

Todos los animales de las dos cohortes mantuvieron una ganancia de peso constante a lo largo de las 20 semanas del experimento [Figura 32].

La rata número 3 de la cohorte de pienso murió durante la segunda semana de administración del DSS como consecuencia de un intenso sangrado rectal causado por el episodio de CU, un paso proinflamatorio necesario para aumentar los números finales (y el volumen) de los tumores generados por AOM.

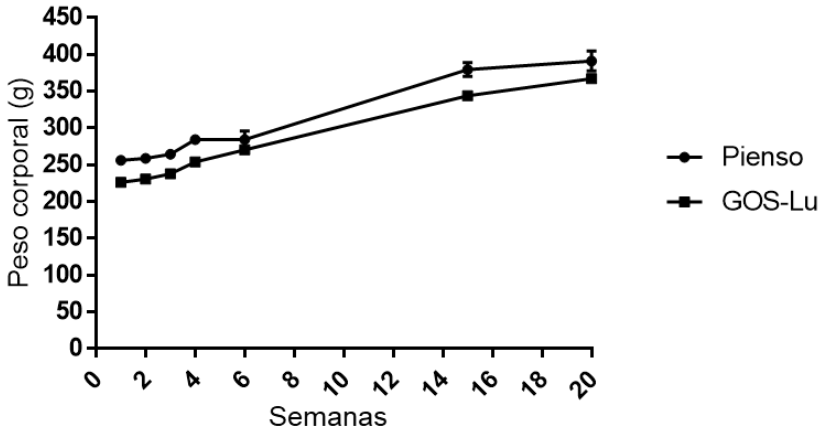

Figura 32: Evolución del peso corporal a lo largo de todo el experimento para las 8 ratas con inducción de CCR en las dos cohortes: pienso control (círculos) y GOS-Lu (cuadrados). El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 3, 4, 7, 15 y 20.

Tras el sacrificio el valor medio del peso en la cohorte de pienso fue de 391,1 ± 40,5 g, mientras que en la cohorte de GOS-Lu fue de 367,1 ± 17,3 g.

4.3.2. Efecto del GOS-Lu sobre el peso del ciego intestinal

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores medios del peso del ciego entre las cohortes de pienso y de GOS-Lu. El grupo de GOS-Lu mostró un valor de 7,63 ± 0,4 g de media mientras que el grupo de pienso su media fue de 5,64 ± 0,4 g, siendo el incremento del 35,28 % [Figura 33]. Esto se debe fundamentalmente a que la fermentación en estos animales da comienzo en este órgano, estimulando poblaciones bacterianas causada por la presencia de compuestos prebióticos.

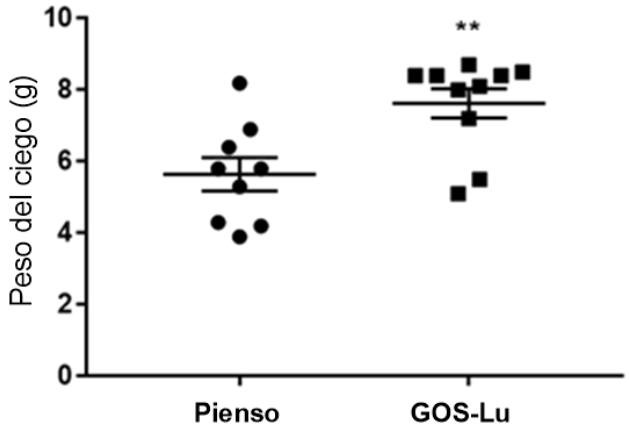

Figura 33: Valores medios del peso del ciego para cada una de las dos cohortes. El aumento de peso en la cohorte GOS-Lu fue estadísticamente significativo (p-valor de 0,001).

4.3.3. Efecto del GOS-Lu sobre el número de pólipos y la extensión colónica afectada

Tras el sacrificio se analizó la mucosa del colon de cada animal determinando el número de pólipos, en este estudio los pólipos tuvieron una variación de tamaño que fue desde 1 a 9,5 mm de diámetro. Se observó una reducción drástica en el número de pólipos de un 57,5 % que fue estadísticamente significativa (p-valor de 0,0022), teniendo la cohorte de pienso un número de 58,5 ± 9,5 pólipos y la cohorte de GOS-Lu 24,8 ± 1,5 pólipos [Figura 34A].

Posteriormente se calculó el área de cada pólipo presente en la mucosa del colon de los animales, sumando el total de cada uno y realizando la media de la extensión afectada en cada cohorte. Se observó una reducción significativa (p-valor de 0,0075) de un 50,4% de extensión afectada en la cohorte de GOS-Lu (240 ± 28,1 mm^2) con respecto a la cohorte de pienso (484,8 ± 76,6 mm^2) [Figura 34B].

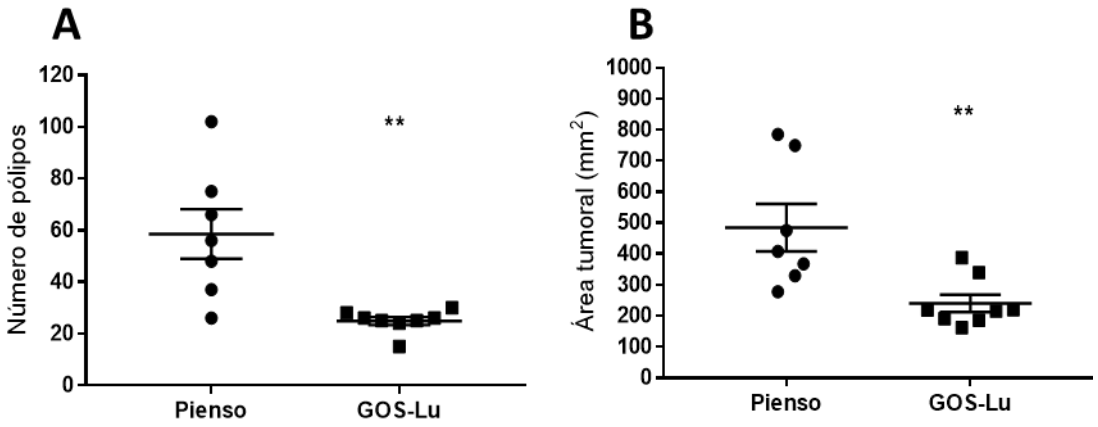

Figura 34: (A) Valor medio del número de pólipos en el colon de cada cohorte (ratas 1 a 8 en cada caso). (B) Valor medio del área de los pólipos de cada cohorte. Para cada animal, se calculó el área de cada pólipo individual, y luego se sumaron estos valores, representando la media de cada grupo en mm2.

4.3.4. Efecto del GOS-Lu sobre la concentración de SCFAs en heces del ciego intestinal

Se identificaron y cuantificaron 6 SCFAs a partir de contenido del ciego de cada animal: propionato, butirato, isobutirato, valerato, isovalerato y hexanoato.

Solo las concentraciones intestinales de propionato fueron estadísticamente significativas, con una producción un 56,9 % mayor en la cohorte GOS-Lu con respecto a la de pienso [Figura 35A]. Todos los demás SCFA analizados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque el butirato y el hexanoato mostraron niveles más bajos en la cohorte de GOS-Lu [Figura 35B y C].

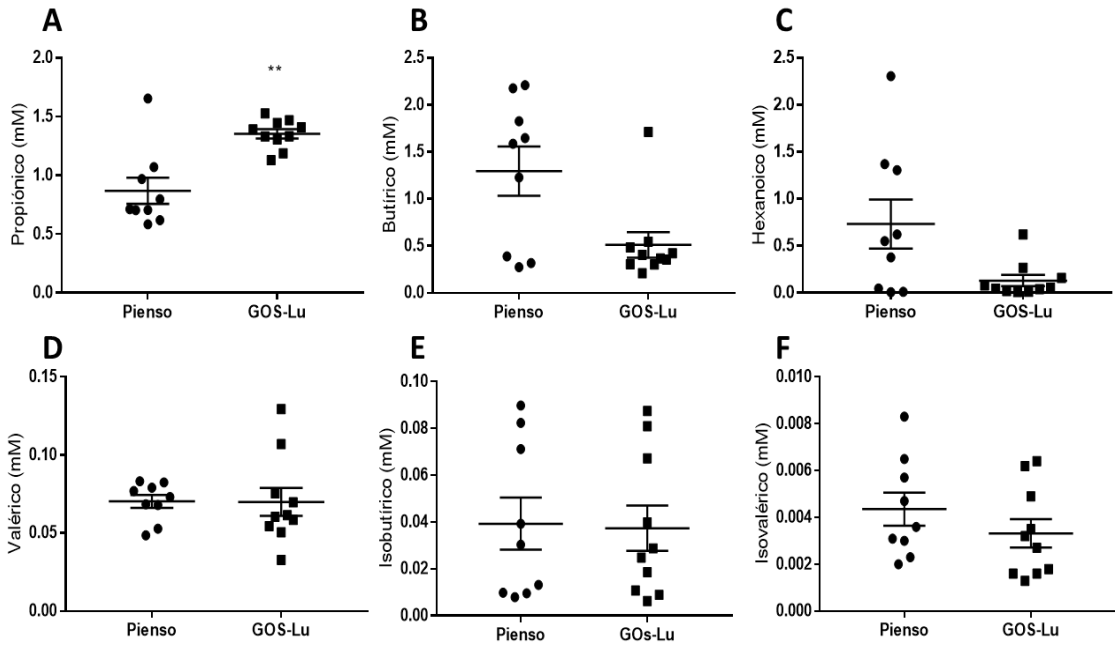

Figura 35: (A) Concentraciones de propionato cecal en las cohortes de pienso (0,86 ± 0,1) y GOS-Lu (1,35 ± 0,03). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (p-valor de 0,003). (B) Concentraciones de butirato cecal en las cohortes de pienso (1,29 ± 0,2) y GOS-Lu (0,51 ± 0,1). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (C) Concentraciones de hexanoato cecal en las cohortes de pienso (0,73 ± 0,2) y GOS-Lu (0,13 ± 0,06). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (D) Concentraciones de valerato cecal en las cohortes de pienso (0,07 ± 0,004) y GOS-Lu (0,06 ± 0,008). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (E) Concentraciones de isobutirato cecal en las cohortes de pienso (0,04 ± 0,01) y GOS-Lu (0,03 ± 0,009). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (F) Concentraciones de isovalerato cecal en las cohortes de pienso (0,004 ± 0,0007) y GOS-Lu (0,003 ± 0,0006). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

4.3.5. Efecto del GOS-Lu sobre la composición de la microbiota intestinal

La secuenciación metagenómica intestinal de las dos cohortes mostró diferencias considerables en las composiciones de filos al comparar ambas cohortes [Tabla 6]. Las principales diferencias entre estas cohortes fue una proporción un 39,18 % mayor de *Bacteroidetes* en la cohorte GOS-Lu, una reducción del 19,35 % en las poblaciones de *Firmicutes* en la cohorte GOS-Lu, y la casi ausencia de *Proteobacterias* en las ratas de la cohorte de pienso (0,34%), mientras que las *Proteobacterias* son el tercer filo más común en la cohorte de GOS-Lu (9,49 %) [Tabla 6]. El filo predominante en ambas cohortes fue *Firmicutes* (69,14 % en la cohorte de pienso frente al 55,76 % en la cohorte de GOS-Lu) [Tabla 5]. En la cohorte de GOS-Lu también se produjo un aumento de la abundancia de *Actinobacteria* y una disminución de *Tenericutes* [Tabla 6].

Porcentaje de:	Pienso	GOS-Lu
*Actinobacteria**	1	2,58
*Bacteroidetes**	22,51	31,33
*Firmicutes**	69,14	55,76
Proteobacteria	0,34	9,49
*Synergistetes**	0,06	0,12
*Tenericutes**	0,31	0
Verrucomicrobia	0,53	0,68
Deferribacteres	0,07	0,03
Spirochaetes	0,01	0

Tabla 6: Composición de la microbiota intestinal a nivel de filo para las dos cohortes estudiadas, mostrando la media del porcentaje respecto al total. El * indica diferencias estadísticamente significativas (p-valores de 0,008 para *Actinobacteria*, 0,035 para *Bacteroidetes*, 0,042 para *Firmicutes*, 0,029 para *Synergistetes* y 0,002 para *Tenericutes*).

La relación Firmicutes / Bacteroidetes, descrita como un marcador asociado a obesidad, mostró que fue significativamente mayor en la cohorte de pienso 3,86 ± 0,75 que en la cohorte de GOS-Lu 1,95 ± 0.25 (p-valor de 0,03) [Figura 36].

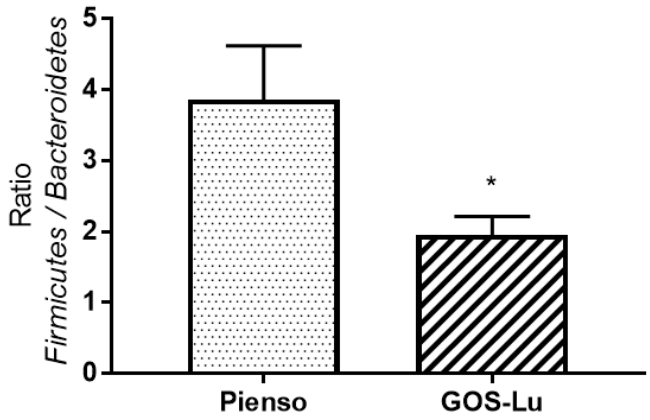

Figura 36: Representación gráfica de la relación *Firmicutes* / *Bacteroidetes* en ambas cohortes.

Como una descripción general de la composición de la microbiota intestinal, el índice de diversidad de Shannon se incrementó en la cohorte de GOS-Lu [Figura 37A]. Los índices de diversidad de Chao y Simpson también indican un aumento en la diversidad de la microbiota intestinal en la cohorte GOS-Lu [Figura 37B y C]. Al analizar las proporciones individuales a nivel de filo en estas 19 ratas, se encontró una distribución homogénea entre todas las ratas de cada cohorte.

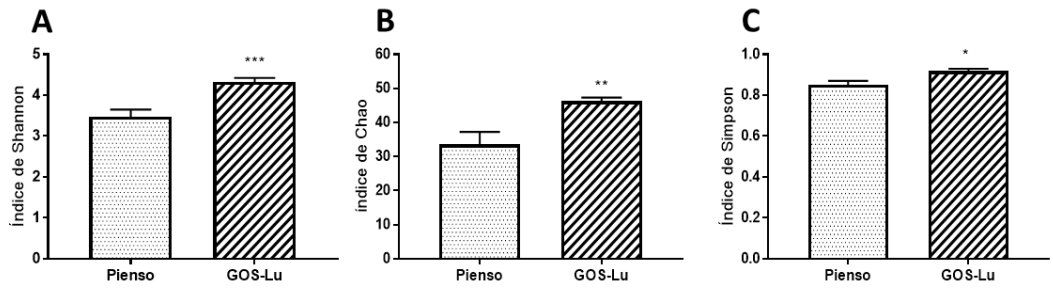

Figura 37: Índices de diversidad de la microbiota intestinal en cada cohorte. (A) El índice de Shannon es de 3,47 ± 0,17 para la cohorte de pienso y 4,32 ± 0,09 para la cohorte de GOS-Lu (diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor de 0,0004). (B) El índice de Chao es de 33,56 ± 3,66 para la cohorte de pienso y 46,2 ± 1,13 para la cohorte de GOS-Lu (diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor de 0,0086). (C) El índice de Simpson es de 0,8494 ± 0.02 para la cohorte de pienso y 0,9177 ± 0,01 para la cohorte de GOS-Lu (diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor de 0,0086).

La microbiota a nivel de familias muestra una diferencia de composición: en la cohorte de pienso, las familias más abundantes fueron *Lachnospiraceae* (33,47 %), *Porphyromonadaceae* (14,17 %), *Clostridiaceae* (10,56 %), *Lactobacillaceae* (9,96 %) y *Bacteroidaceae* (4,22 %) [Figura 38]. En el caso de la cohorte de GOS-Lu, las familias más abundantes fueron *Lachnospiraceae* (14,18 %), *Porphyromonadaceae* (13,78 %), *Lactobacillaceae* (13,06 %) *Clostridiaceae* (9,49 %) y *Bacteroidaceae* (9,40 %) [Figura 38].

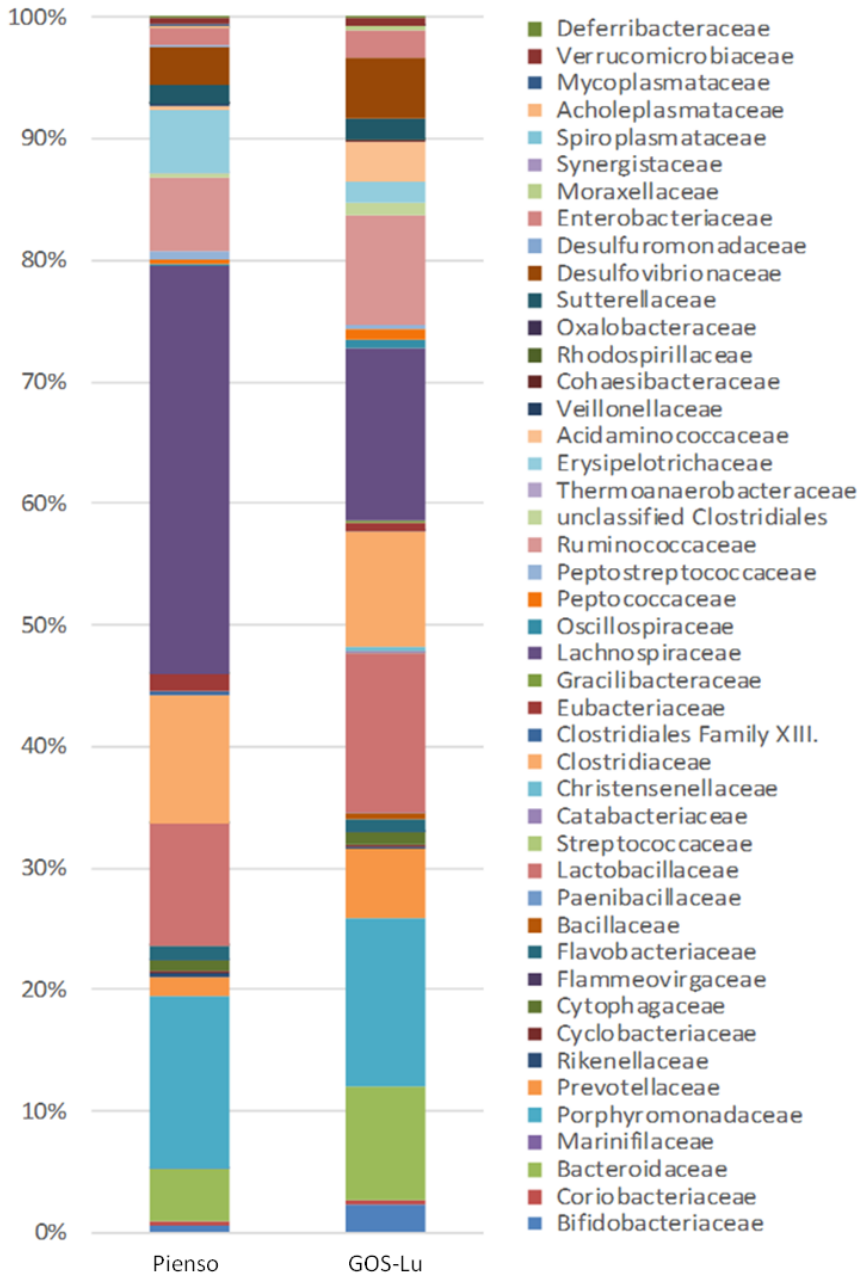

Figura 38: Diferencias en la composición media de la microbiota intestinal a nivel de familia para las 2 cohortes estudiadas.

La composición de la microbiota a nivel familiar fue relativamente homogénea entre los animales que formaron cada cohorte [Figura 39].

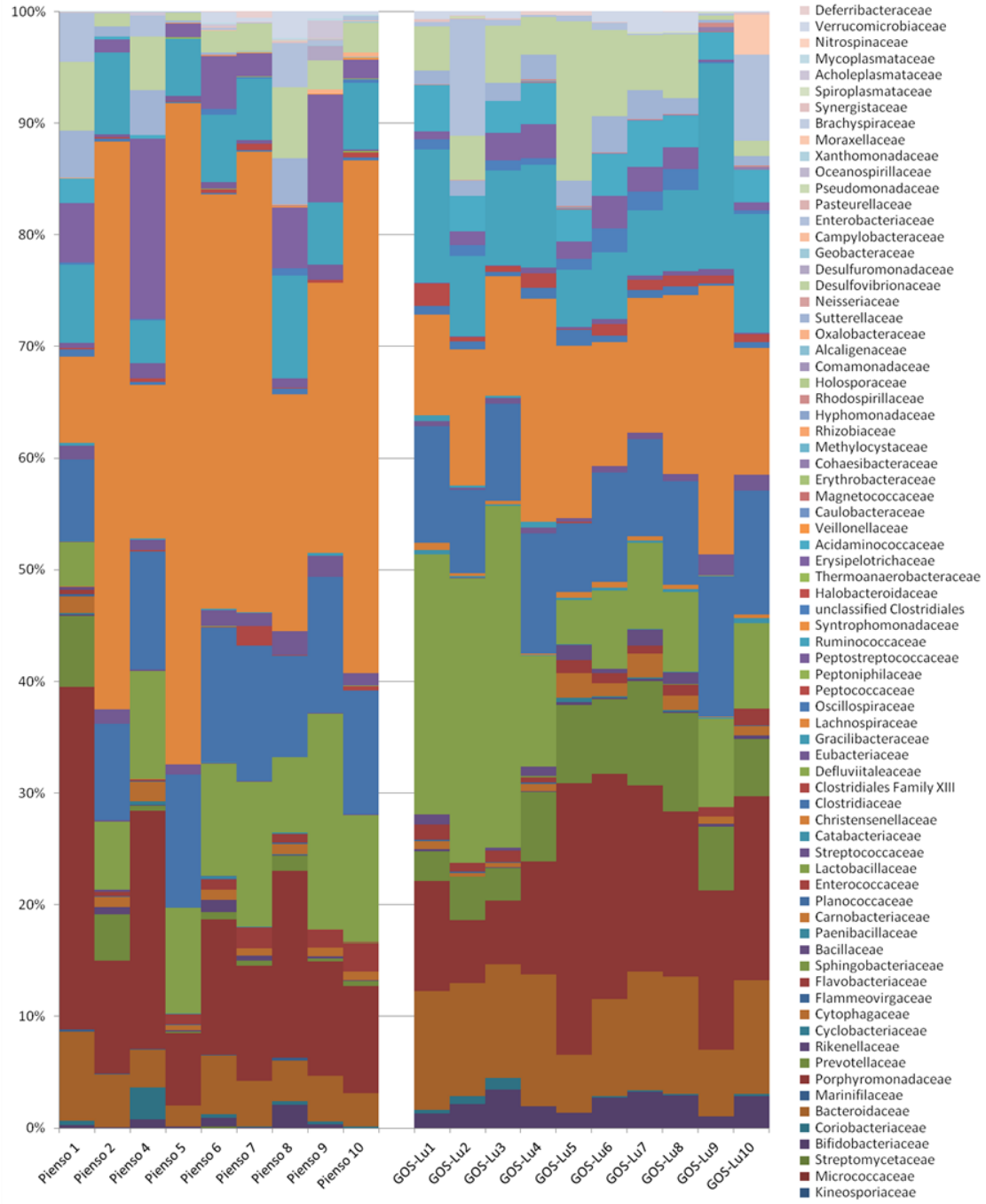

Figura 39: Composición de la microbiota intestinal a nivel de familia en las ratas pertenecientes a la cohorte de pienso (Pienso 1 a Pienso 10), y en las ratas pertenecientes a la cohorte de GOS-Lu (GOS-Lu 1 a GOS-Lu 10).

A nivel de familias se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de *Lachnospiraceae* (33,47 % ± 5,87 en la cohorte de pienso y 14,18 % ± 1,49 en la cohorte de GOS-Lu), *Bacteroidaceae* (4,22 % ± 0,57 en la cohorte de pienso y 9,40 % ± 0,68 en la cohorte de GOS-Lu), *Prevotellaceae* (1,58 % ± 0,72 y 5,84 ± 0,002 respectivamente), *Acidaminococcaceae* (0,32 % ± 0,24 y 3,27 % ± 0,18 respectivamente), *Bifidobacteriaceae*

(0,50 % ± 0,22 y 2,30 % ± 0,27 respectivamente), *Eubacteriaceae* (1,33 % ± 0,14 y 0,71 % ± 0,16 respectivamente), *Peptococcaceae* (0,27 % ± 0,05 y 0,86 % ± 0,16 respectivamente) y *Oscillospiraceae* (0,25 % ± 0,06 y 0,71 % ± 0,10 respectivamente) [Figura 40].

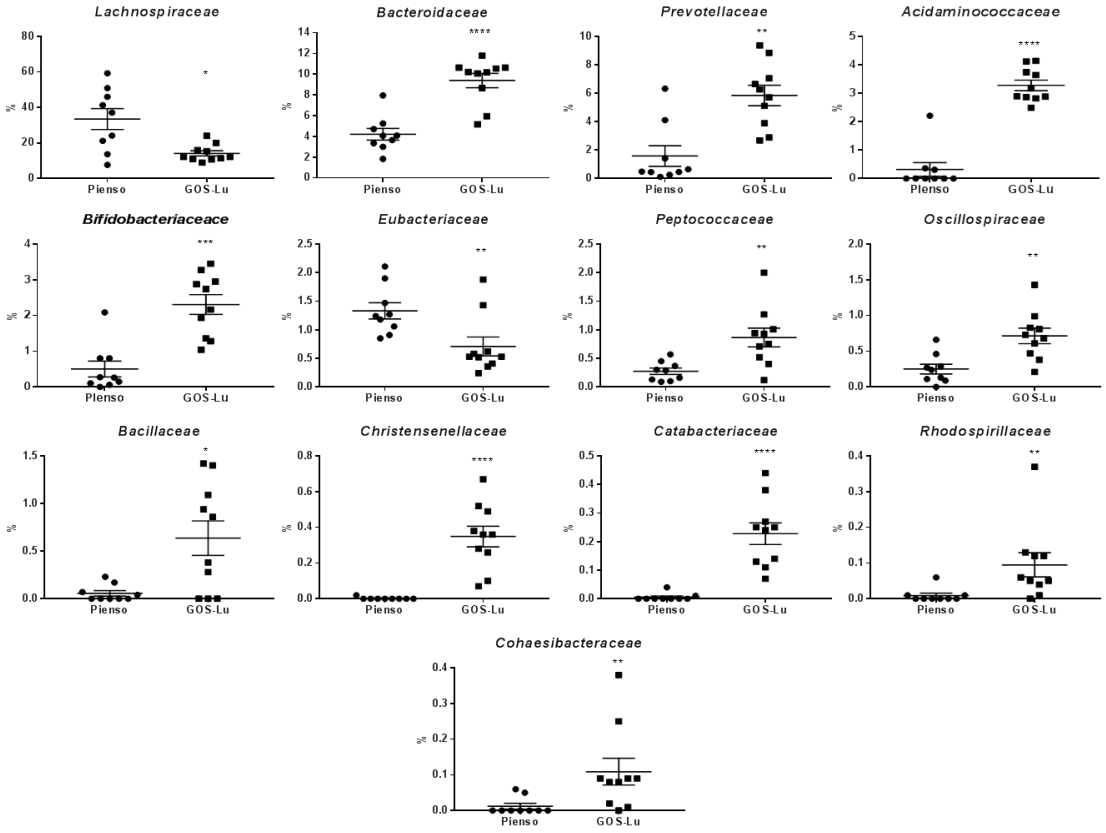

Figura 40: Familias que muestran diferencias estadísticamente significativas entre las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso y de GOS-Lu.

El aumento estadísticamente significativo observado en el filo *Actinobacteria* [Tabla 6] se debió principalmente a un incremento en la familia *Bifidobacteriaceae* (0,5 % en la cohorte de pienso frente a un 2,31 % en la cohorte de GOS-Lu) [Figuras 38 y 40]. La disminución observada en el filo *Tenericutes*, se debió principalmente a una reducción de la familia *Acholeplasmataceae* (0,23% en la cohorte de pienso frente al 0 % en la cohorte de GOS-Lu) [Figura 38].

Las familias *Bacteroidaceae* (4.22% en la cohorte de control, 9.4% en GOS-Lu) y *Prevotellaceae* (1,59 % en la cohorte de pienso frente al 5,84% en la cohorte de GOS-Lu) fueron las familias representativas del aumento del filo *Bacteroidetes* en la cohorte de GOS -Lu, en comparación con el grupo de pienso [Figuras 38 y 40].

La disminución del filo *Firmicutes* que tuvo lugar en la cohorte de GOS-Lu se debió principalmente a una reducción de la familia Lachnospiraceae (33,47 % en la cohorte de pienso frente al 14,18 % en la cohorte de GOS-Lu) y, en menor medida, a una reducción de la familia *Eubacteriaceae* (1,33 % en la cohorte de pienso frente al 0,71 % en la cohorte de GOS-Lu) [Figuras 38 y 40].

A pesar de la disminución del filo *Firmicutes* en la cohorte de GOS-Lu, varias familias mostraron un pequeño aumento significativo, tales como *Bacillaceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptococcaceae*, *Catabacteriaceae*, *Christensenellaceae*, *Clostridiales* no clasificados y *Acidaminococcaceae* [Figuras 38 y 40].

Géneros	Especies	Pienso (media)	GOS-Lu (media)	p-valor
Bifidobacterium		0,50	2,31	0,0002
	animalis	0,01	0,46	0,0003
Bacteroides		0,53	6,98	<0,0001
	eggerthii	0,03	2,72	<0,0001
	massiliensis	0,03	0,43	0,0001
	thetaiotaomicron	0,01	0,22	0,0008
	uniformis	0,16	1,40	0,001
	vulgatus	0,04	1,04	<0,0001
	xylanisolvens	0,00	0,27	0,0004
Parabacteroides		0,30	1,39	<0,0001
	distasonis	0,22	0,46	0,0134
	merdae	0,05	0,87	<0,0001
Paraprevotella		0,03	4,20	<0,0001
	clara	0,00	0,13	0,0007
Lactobacillus	***intestinalis***	0,24	0,06	0,041
Anaerostipes		0,01	0,40	<0,0001
Blautia		1,84	6,19	0,0071
	producta	0,60	1,13	0,0052
	wexlerae	0,00	0,69	0,0325
Dorea		0,10	0,61	0,0018
Lachnoclostridium	***clostridioforme***	0,04	0,80	0,0002
Faecalibacterium		0,73	1,88	0,0009
	prausnitzii	0,13	0,35	0,0028
Ruminococcus		0,27	1,26	0,0023
	gauvreauii	0,12	0,38	0,0296
Subdoligranulum		0,03	0,13	0,0024
Flavonifractor		0,06	0,95	<0,0001
	plautii	0,05	0,95	<0,0001
Eubacterium	***dolichum***	0,00	0,16	<0,0001
Turicibacter		0,52	0,00	<0,0001
Phascolarctobacterium		0,32	3,28	<0,0001
	succinatutens	0,25	2,70	<0,0001
Bilophila		1,66	4,35	0,0422
	wadsworthia	1,54	3,99	0,034
Desulfovibrio		1,42	0,53	0,0178
	C21_c20	0,18	0,00	0,0031

Tabla 7: Diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota intestinal a nivel de géneros y especies para las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso y de GOS-Lu.

En la Tabla 7 se muestran los géneros bacterianos y especies con diferencias significativas entre las cohortes de pienso y de GOS-Lu.

Las diferencias más significativas en cuanto a la abundancia relativa entre géneros y especies se asociaron con una mayor proporción de algunos géneros en la cohorte de GOS-Lu, como *Bifidobacterium, Bacteroides, Parabacteroides* y otros [Tabla 7]. Solo unos pocos géneros y especies mostraron una reducción significativa en sus proporciones en la cohorte de GOS-Lu, como *Lactobacillus intestinalis, Turicibacter spp*. y *Desulfovibrio spp*. [Tabla 7].

4.3.6. Correlaciones entre microbiota intestinal, producción de SCFAs y tumores

Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson para observar si existe relaciones entre los diferentes taxones bacterianos que componen la microbiota intestinal de cada cohorte con la producción de SCFAs, en especial butirato y propionato, y el número de pólipos o área tumoral total de la mucosa del colon.

Se encontraron correlaciones positivas entre los niveles de SCFAs y algún taxón bacteriano. En este sentido, la producción de ácido propiónico se correlacionó positivamente con varias familias pertenecientes a los filos *Bacteroidetes, Firmicutes* y *Proteobacteria*, especialmente en los casos de las familias *Bacteroidaceae* y *Acidaminococcaceae* [Figura 41A]. La producción de ácido butírico se correlacionó positivamente con el filo *Firmicutes*, especialmente con la familia *Lacnospiraceae* [Figura 41A]. Además, la abundancia de las familias *Bacteroidaceae* y *Acidaminococcaceae* se correlacionó negativamente con el número de pólipos y el área total del tumor, lo que puede indicar un papel protector de los miembros de estas familias frente al CCR [Figura 41B].

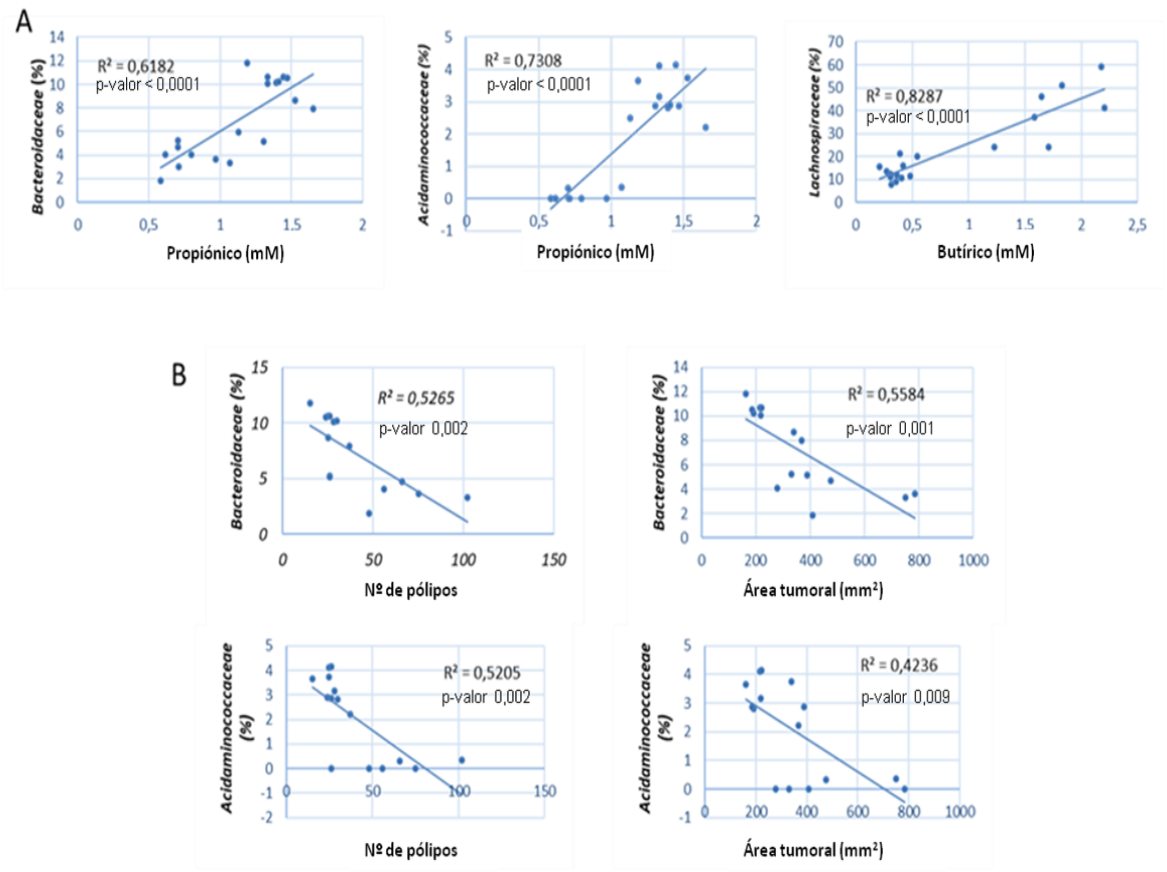

Figura 41: Correlaciones significativas entre (A) los taxones bacterianos y los niveles de producción de SCFAs, y (B) los taxones bacterianos con el número de pólipos o el área total del tumor.

4.3.7. Cultivo celular

4.3.7.1. Ensayos de viabilidad celular mediados por SCFAs

Se realizaron curvas de viabilidad celular en cuatro tipos de líneas celulares, tres de CCR (HCT116, HT29 y T84) y una de fibroblastos de riñón (BHK21, línea control). Los agentes utilizados fueron propionato y butirato.

El propionato mostró mayor actividad inhibidora en las células HCT116, con una reducción de la viabilidad del 90% a concentraciones de 16 mM [Figura 42A]. En la línea HT29, en cambio, la reducción de la viabilidad por parte de este SCFA fue menor, con reducciones cercanas al 80% a la misma concentración [Figura 42B]. Por el contrario, las células de la línea celular T84 mostraron mayor resistencia al tratamiento con propionato, obteniéndose una reducción del 90% de la viabilidad sólo a concentraciones de 150 mM [Figura 42C]. Los fibroblastos control mostraron mayor resistencia al tratamiento que las células HCT116 y

HT29, produciéndose una inhibición del crecimiento cercana al 50% con dosis de propionato de 16 mM [Figura 42D].

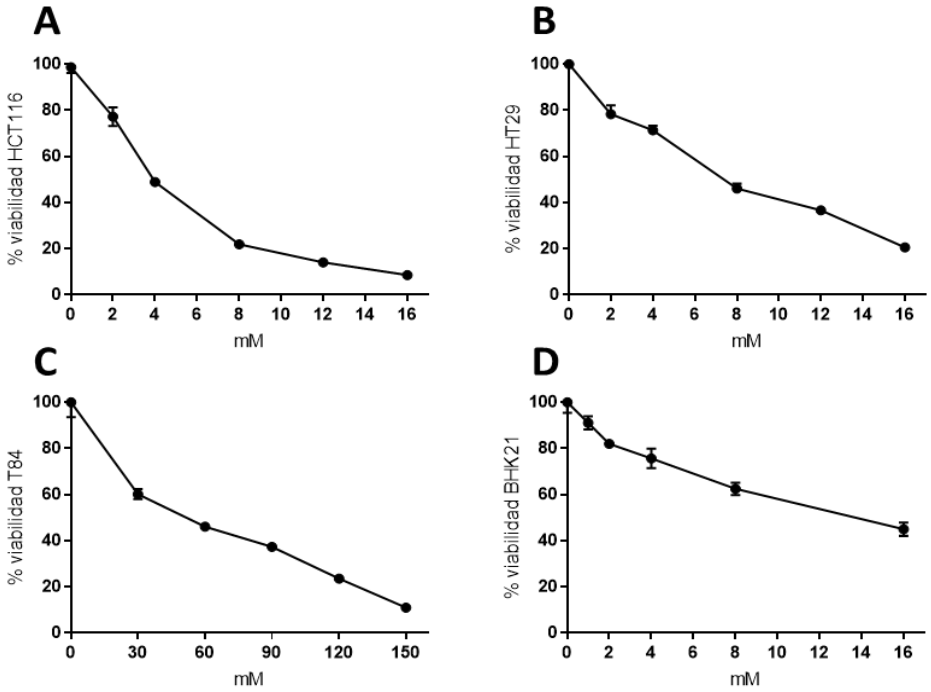

Figura 42: Curvas de viabilidad celular frente a propionato. (A) Viabilidad celular en la línea HCT116 frente a las concentraciones de propionato de 2, 4, 8, 12 y 16 mM. (B) Viabilidad celular en la línea HT29 frente a las concentraciones de propionato de 2, 4, 8, 12 y 16 mM. (C) Viabilidad celular en la línea T84 frente a las concentraciones de propionato de 30, 60, 90, 120 y 150 mM. (D) Viabilidad celular en la línea BHK21 frente a las concentraciones de propionato de 1, 2, 4, 8 y 16 mM.

Los ensayos con butirato mostraron una mayor actividad, observándose inhibiciones del 80% de la viabilidad en la línea HCT116 a concentraciones de 2 mM [Figura 43A]. En la línea HT29 se consiguieron reducciones del 80% de la viabilidad con concentraciones cercanas a 4 mM [Figura 43B]. En el caso de la línea T84, concentraciones de butirato de 4 mM generaron inhibiciones de la viabilidad del 70% [Figura 43C]. Por último, en los fibroblastos control, para llegar a una reducción de la viabilidad del 65% se necesitaron dosis de 16 mM de butirato.

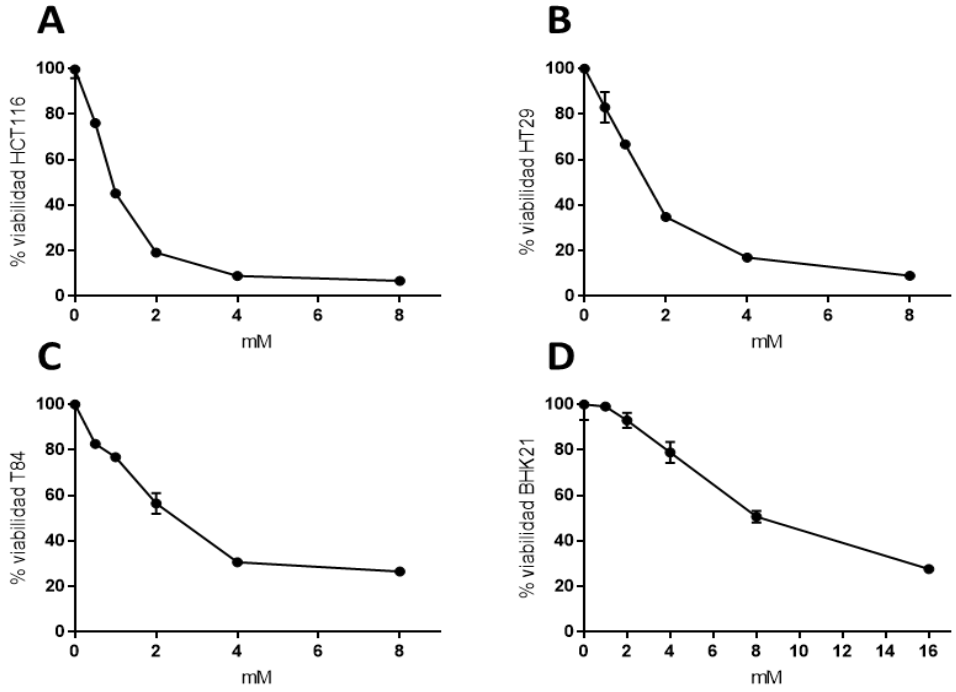

Figura 43: Curvas de viabilidad celular frente a butirato. (A) Viabilidad celular en la línea HCT116 frente a las concentraciones de butirato de 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM. (B) Viabilidad celular en la línea HT29 frente a las concentraciones de butirato de 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM. (C) Viabilidad celular en la línea T84 frente a las concentraciones de butirato de 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM. (D) Viabilidad celular en la línea BHK21 frente a las concentraciones de butirato de 1, 2, 4, 8 y 16 mM.

Si comparamos las concentraciones inhibitorias del 50% (CI_{50}) se observa que la línea celular más sensible al propionato es la HCT116, con CI_{50} de 4,06 mM, mientras que en la línea HT29 se requiere 1,8 veces más de concentración de propionato. En cambio, la línea celular T84 mostró resistencia al tratamiento, necesitando dosis de propionato 15 veces superior a las utilizadas en HCT116. Finalmente, el propionato en las células control BHK21 no mostró tanta actividad como en las líneas celulares HCT116 y HT29, requiriéndose concentraciones de 13,87 mM para alcanzar la CI_{50} (3,4 veces mayor que en HCT116 y 1,89 veces mayor que en HT29) [Tabla 8]

En el caso del butirato, se requirieron concentraciones más bajas para alcanzar la CI_{50}. Así, se necesitó 0,94 mM de butirato en la línea celular HCT116 para alcanzar este parámetro. En la línea HT29 se necesitaron concentraciones de 1,53 mM (1,62 veces mayor que en HCT116) y en la línea T84, que en este caso sí mostró sensibilidad al butirato, se alcanza la CI_{50} a concentraciones de 2,68 mM (2,85 veces mayor que en HCT116). En las células control BHK21 se necesitó en cambio una concentración más elevada que en el resto de

líneas celulares, necesitándose 8,15 mM de butirato para alcanzar la CI_{50} (8,6 veces mayor que en HCT116, 5,32 veces mayor que en HT29 y 3,04 veces mayor que en T84) [Tabla 8].

	HCT116		HT29		T84		BHK21	
	Media	Error estándar	Media	Error estándar	Media	Error estándar	Media	Error estándar
Propionato	4,06	0,12	7,31	0,43	61,64	2,42	13,87	1,43
Butirato	0,94	0,03	1,53	0,01	2,68	0,13	8,15	0,63

Tabla 8: Concentración inhibitoria 50% (CI50) de propionato y butirato en las cuatro líneas celulares estudiadas (HCT116, HT29, T84 y BHK21). Concentraciones expresadas en mM.

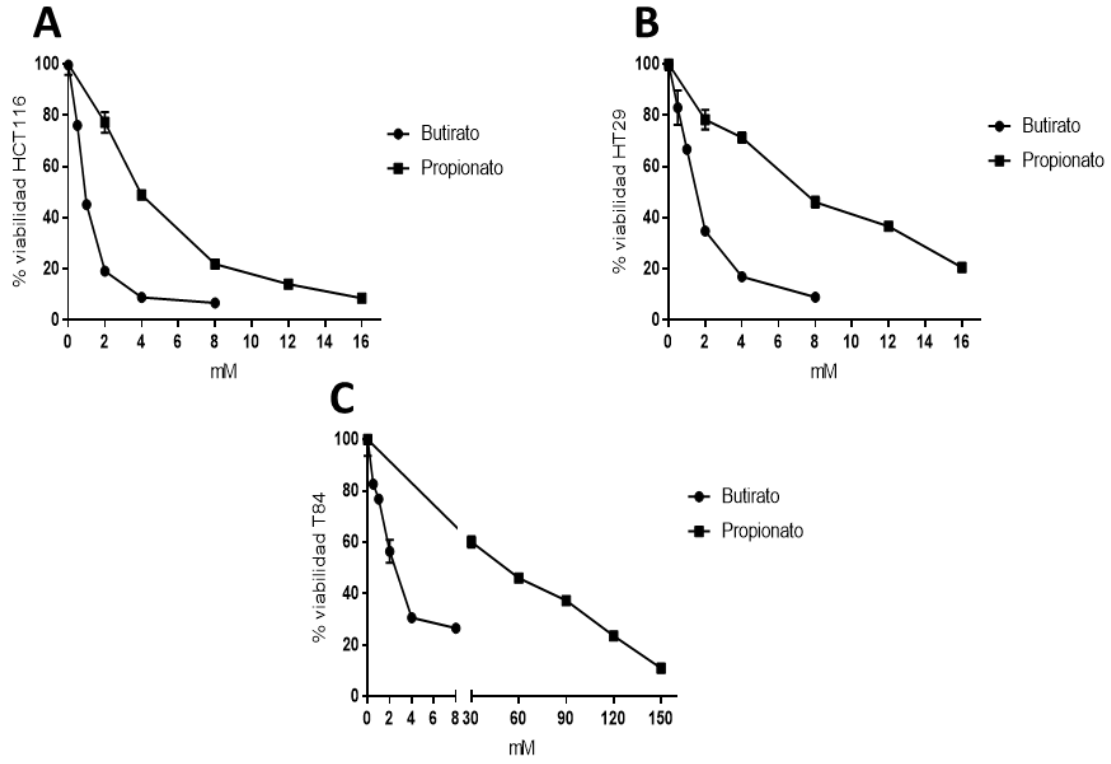

Figura 44: Comparativa de viabilidad celular realizada por la acción de propionato y butirato en las tres líneas celulares de CCR. (A) Comparación en la línea celular HCT116. (B) Comparación en la línea celular HT29. (C) Comparación en la línea celular T84.

En todas las líneas estudiadas se observó una mayor actividad antitumoral *in vitro* del butirato respecto al propionato. En la línea HCT116 [Figura 44A] el butirato necesitó concentraciones de 0,94 mM para llegar a la CI50, mientras que en el propionato se necesitaron concentraciones de 4,06 mM (4,3 veces mayor) [Tabla 8]. En la línea celular HT29 [Figura 44B] las concentraciones requeridas para llegar a alcanzar la CI50 son de 1,53 mM en el caso del butirato y de 7,31 mM en el del propionato (4,7 veces mayor) [Tabla 8].

Por último, en la línea celular T84 [Figura 44C] la concentración requerida de butirato fue de 2,68 mM frente a los 61,64 mM necesarios en el caso del propionato (23 veces mayor) para alcanzar el mismo parámetro de inhibición [Tabla 8].

4.3.7.2. Ensayos de apoptosis celular mediados por SCFAs

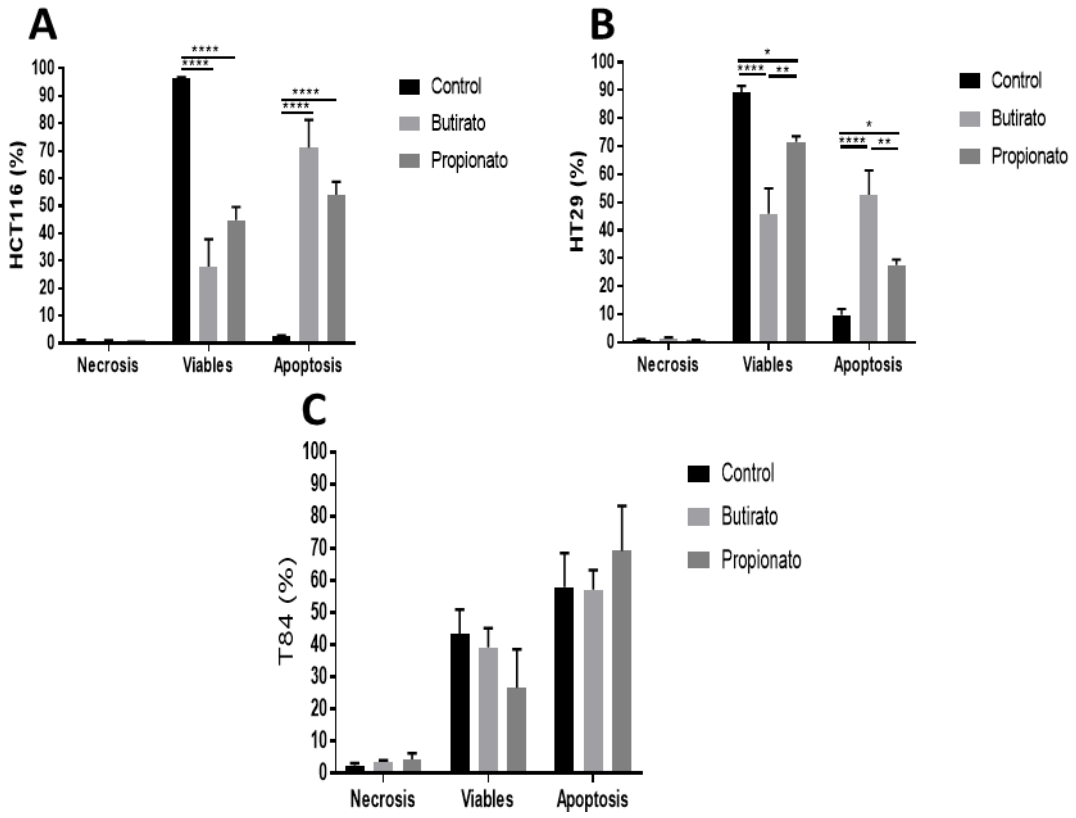

Figura 45: Ensayos de apoptosis mediados por butirato y propionato en las tres líneas celulares de CCR. En los gráficos se muestra el porcentaje de células que sufrieron necrosis, apoptosis o que siguen viables tras el tratamiento. (A) Estudio de apoptosis en la línea celular HCT116. (B) Estudio de apoptosis en la línea celular HT29. (C) Estudio de apoptosis en la línea celular T84. Las concentraciones utilizadas de butirato y propionato son las que producen la CI_{70} para cada línea celular.

Tanto el butirato como el propionato mostraron actividad apoptótica en las tres líneas celulares de CCR, siendo los procesos necróticos despreciables (inferiores al 1%). En la línea celular HCT116, tanto el butirato (71% apoptosis) como el propionato (54% de apoptosis) mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control (línea celular con H_2O, 2,62% de apoptosis) [Figura 45A]. En la línea celular HT29, el porcentaje de células apoptóticas inducido por butirato fue del 52%, y del 27 % en el caso del tratamiento con propionato, mostrándose unas diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con SCFA y las células control sin tratamiento (9,7% de apoptosis) [Figura

45B]. Por último, en la línea celular T84, no se observaron aumentos de la apoptosis estadísticamente significativos respecto al control sin tratar [Figura 45C].

4.3.7.3. Ensayos de ciclo celular mediados por SCFAs

Se realizaron estudios de ciclo celular para ver si se observaban cambios en la distribución del ciclo celular (G1, G2 y S) de las células de CCR al ser tratadas con los dos tipos de SCFAs, el propionato y el butirato.

En la línea celular HCT116 tratada con propionato o con butirato se observó un aumento de las células en fase S, respecto al control sin tratamiento (27,4%, 40,5% y 20,5%, respectivamente). En esta misma línea disminuyó la fase G1 tras estos tres tipos de tratamientos (20,1%, 11,6% y 44,5%, respectivamente) [Figura 46A], aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos debido a la dispersión entre muestras (triplicados).

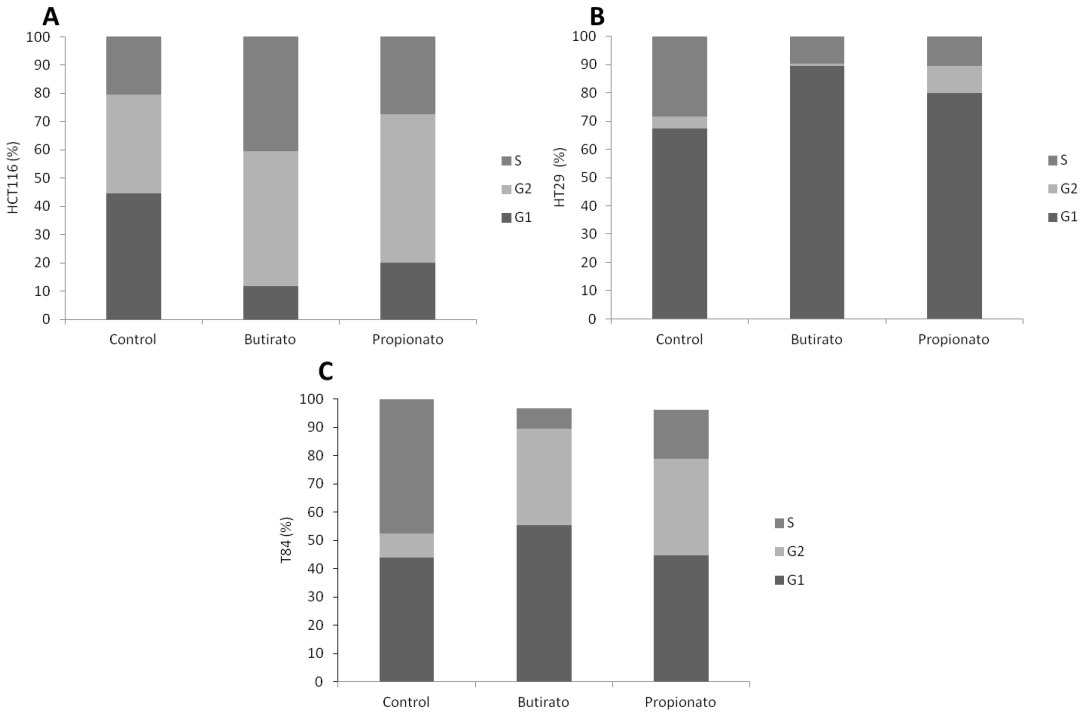

Figura 46: Ciclo celular de las tres líneas ensayadas de CCR cuando son tratadas con propionato y butirato. En el eje vertical se muestra el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo (G1, G2 y S). (A) Ciclo celular en la línea HCT116. (B) Ciclo celular en la línea HT29. (C) Ciclo celular en la línea T84.

En la línea HT29 se observó un aumento estadísticamente significativo de la fase G1 al ser tratadas con butirato, 89,4% (p-valor < 0,0001) o propionato, 79,8% (p-valor 0,0032)

respecto a las células sin tratar, 67,3%. También se observó una disminución estadísticamente significativa de la fase S, en la que se encontraban un 28,2 % de las células sin tratar, mientras que tras el tratamiento con butirato había un 9,5% (p-valor < 0,0001) y en el caso del propionato un 10,5% (p-valor 0,0001) [Figura 46B].

Por último, la línea celular T84 mostró un aumento estadísticamente significativo de la fase G2 cuando estas células fueron tratadas con butirato (34,2%, p-valor 0,007) o propionato (34,2%, p-valor 0.007) respecto a las células sin tratamiento (8,6%). Y al igual que en las células HT29, se observó un descenso estadísticamente significativo de la fase S: 7% (p-valor < 0,0001) en el caso del tratamiento con butirato y 3,3% (p-valor < 0,0001) en el caso del propionato. Las células sin tratamiento mostraron un 47,7% de la población en dicha fase S [Figura 46C].

4.4. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR inducido químicamente

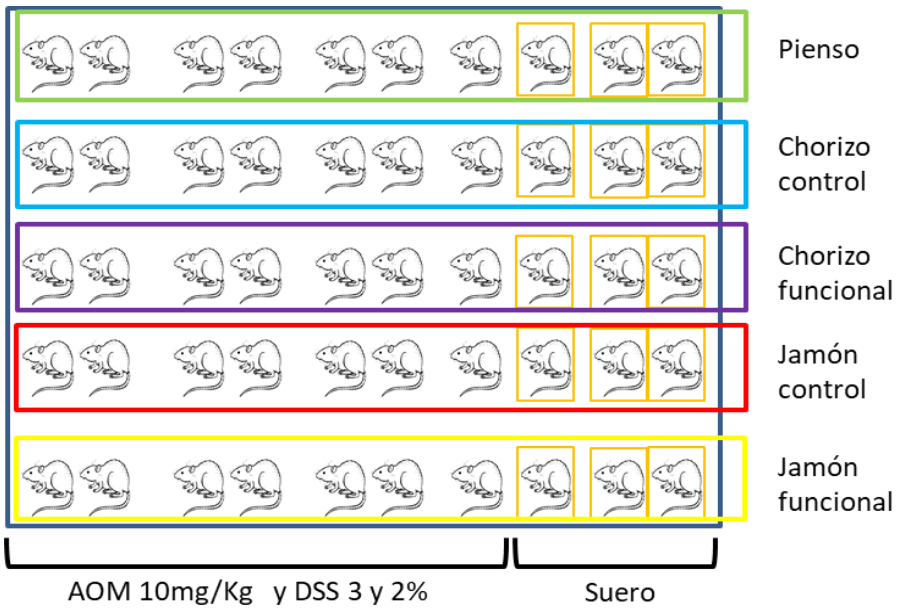

Figura 47: Esquema con la composición de los 5 grupos animales experimentales. A 7 de las ratas de cada uno de los 5 grupos se les indujo CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 2 periodos de tratamiento con DSS. A las otras 3 ratas de cada grupo no se les administró este tratamiento (controles absolutos).

Se utilizaron 50 ratas macho Fischer 344 separadas individualmente en 5 grupos de alimentación: pienso, chorizo control, chorizo funcional (15,8% de inulina), jamón cocido

control y jamón cocido funcional (10% de inulina). A cada animal en cada uno de los 4 grupos con alimentación cárnica se les proporcionaron diariamente 20 g del alimento cárnico correspondiente más 10 g de pienso.

Tras la primera semana de alimentación experimental, a 7 animales de cada grupo se les administró por vía intraperitoneal 2 dosis de AOM a 10 mg/ kg. Ambas dosis estuvieron separadas entre sí una semana. Con estas intervenciones se indujo el CCR. Una semana después de la segunda dosis de AOM administrada, a estos animales se les administró DSS al 3% en agua de bebida durante 7 días. En la semana 15 se llevó a cabo una segunda administración de DSS, al 2 %. El DSS induce CU y genera una inflamación sistémica que promueve el desarrollo del CCR. A las 3 ratas restantes (controles absolutos) de cada grupo no se les realizó el tratamiento de inducción de CCR. El experimento total tuvo una duración de 20 semanas.

Durante el ensayo se contabilizaron cuatro defunciones. Dos defunciones se produjeron en las ratas de la cohorte de pienso y de jamón control (rata número 10 de pienso y número 7 de jamón control), que fallecieron en la primera semana tras la llegada al animalario y antes de comenzar la experimentación. Otras dos ratas (chorizo funcional número 6 y jamón control número 6) murieron tras la primera semana de DSS al 3%, a causa de las hemorragias causadas por el estado inducido de CU.

Tras realizar estudios estadísticos para todos los resultados obtenidos, mediante pruebas de efectos intersujetos se concluyó que el tipo de matriz (chorizo o jamón) no ejercía efectos significativos. Por tanto, con el objetivo de ganar potencia estadística, se agruparon todos los animales en tres grupos: pienso, alimento cárnico control y alimento cárnico funcional.

4.4.1. Efecto del alimento funcional sobre los niveles plasmáticos de triacilglicéridos

Se analizaron los niveles de triacilglicéridos a partir del plasma sanguíneo, obtenido tras el sacrificio de cada de los animales empleados. La cohorte denominada cárnico funcional sufrió un descenso en sus niveles de triacilglicéridos (110 ± 5,7 mg/dL) en comparación con la cohorte de pienso (172,1 ± 22,1 mg/dL), siendo esta reducción estadísticamente significativa (p-valor de 0,007). Los niveles de esta cohorte también se redujeron con

respecto a la cohorte de cárnico control (147 ± 13,2 mg/dL), aunque en este caso no llego a tratarse de una diferencia estadísticamente significativa (p-valor de 0,063) [Figura 48].

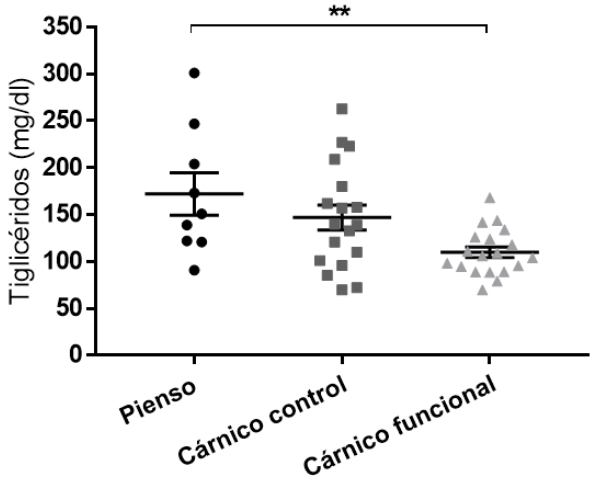

Figura 48: Niveles de triacilglicéridos en el plasma sanguíneo de los 3 grupos experimentales (círculos para pienso, cuadrados para cárnico control y triángulos para cárnico funcional). Las unidades están expresadas en mg/dL.

4.4.2. Efecto del alimento funcional sobre el peso del ciego

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre la cohorte de pienso (6,3 ± 0,4 g) y la cohorte de cárnico funcional (12,4 ± 0,5 g) (p-valor de 0,002) [Figura 49].

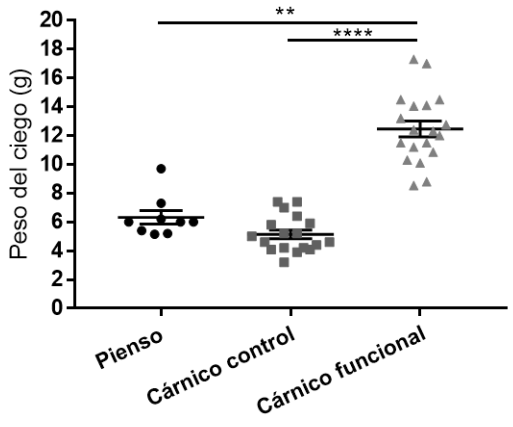

Figura 49: Valores medios del peso del ciego en las tres cohortes del experimento. Las unidades están expresadas en gramos (g).

El aumento de peso del ciego en la cohorte de cárnico funcional también fue estadísticamente significativo respecto a la cohorte de cárnico control (5,1 ± 0,2 g, p-valor < 0,0001) [Figura 49].

4.4.3. Efecto del alimento funcional sobre el número placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado

Tras el sacrificio de los animales se contabilizaron las Placas de Peyer hiperplásicas sobre la mucosa del intestino delgado. Se muestran aquí los valores medios de las mismas en las ratas a las que se les indujo CCR en las tres cohortes utilizadas.

El valor medio en el caso de la cohorte de pienso fue de 14,1 ± 1,6 placas. Este valor aumentó en los animales de la cohorte cárnico control, que mostraron valores medios de 17,4 ± 1,1 placas [Figura 50]. El menor valor medio para este parámetro se obtuvo en la cohorte de cárnico funcional, con 9,8 ± 0,9 placas. Este descenso fue estadísticamente significativo respecto a la media de la cohorte de cárnico control (p-valor < 0,0001) [Figura 50].

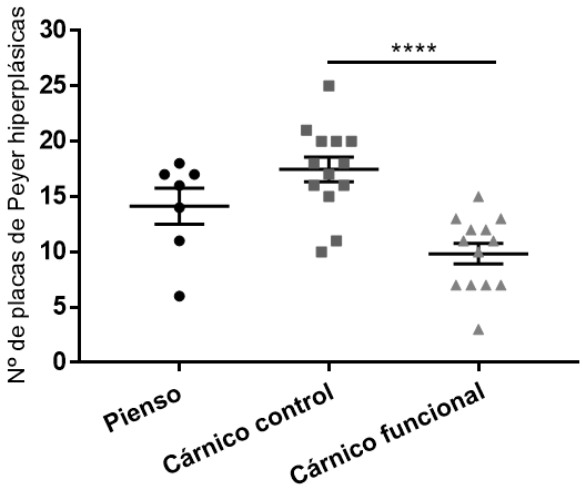

Figura 50: Número medio de placas de Peyer hiperplásicas en cada cohorte (en las 7 ratas de cada grupo a las que se les indujo CCR).

4.4.4. Efecto del alimento funcional sobre el número de pólipos y la superficie afectada en la mucosa del colon

Tras el sacrificio se contabilizaron los pólipos macroscópicos del intestino grueso, que mostraron una dispersión de su diámetro de entre 1 y 11 mm. El número de pólipos en la

cohorte de pienso fue de 23,4 ± 2,3, aumentando hasta los 30,5 ± 3,9 en la cohorte de alimento cárnico control. En la cohorte de cárnico funcional se contabilizaron 15,3 ± 3, lo que representa un 49,9% menos de tumores que en la cohorte de cárnico control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (p-valor de 0,008) [Figura 51A].

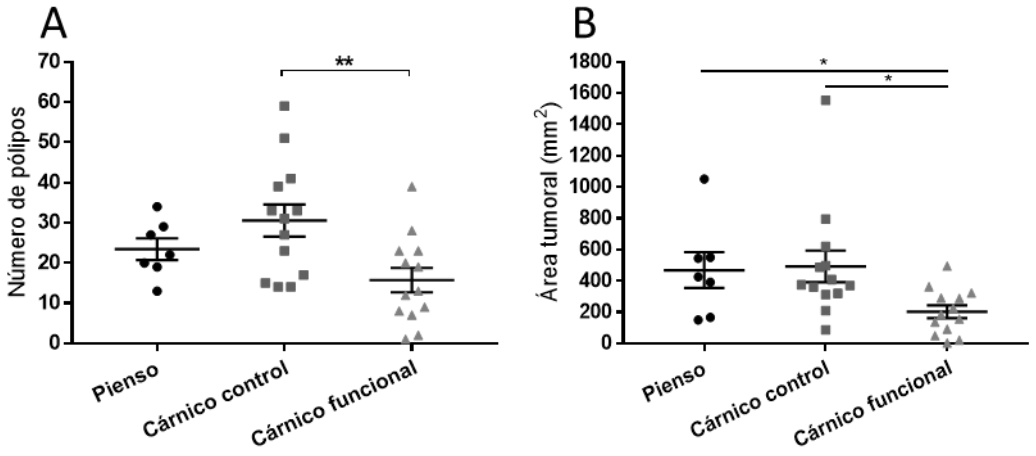

Figura 51: (A) Valor medio del número de pólipos en el colon de cada cohorte. (B) Valor medio del área total de los pólipos de cada cohorte. Para cada animal, se calculó el área de cada pólipo individualmente, y luego se sumaron estos valores, representándose la media de cada grupo en mm^2.

Posteriormente se calculó el área de cada pólipo presente en la mucosa del colon de cada animal, sumándose el total de cada uno y realizándose a continuación la media de la superficie de la mucosa afectada en cada cohorte. Se observó una reducción significativa, del 56,9%, de la superficie tumoral en la cohorte de cárnico funcional (201,4 ± 40,5 mm^2) respecto a la cohorte de pienso (467,7 ± 114,7 mm^2) (p-valor de 0,04) y del 59% respecto a la cohorte de cárnico control (491,4 ± 101,3 mm^2) (p-valor de 0,01) [Figura 51B].

Los estudios de anatomía patológica de los tumores de cada cohorte mostraron una reducción de las displasias de bajo grado en la cohorte de cárnico funcional respecto a las cohortes de pienso y cárnico control. Además, solo se encontraron dos adenocarcinomas infiltrantes, uno en la cohorte de pienso y otro en la cohorte de cárnico control.

4.4.5. Efecto del alimento funcional sobre la concentración de SCFAs en heces

Se cuantificaron los SCFAs a partir de heces (obtenidas de los ciegos almacenados a -80 ºC), encontrándose diferencias en los dos principales SCFAs, el ácido propiónico y el butírico.

En el caso del ácido propiónico se encontraron concentraciones superiores estadísticamente significativas en la cohorte de cárnico funcional (2,5 ± 0,2 mM). En concreto éstas eran un 72,6% superiores a las de la cohorte de pienso (0,69 ± 0,04 mM) y un 51,8% superiores a las de la cohorte cárnico control (1,23 ± 0,06 mM) (p-valores < 0,0001 para ambos casos) [Figura 52A].

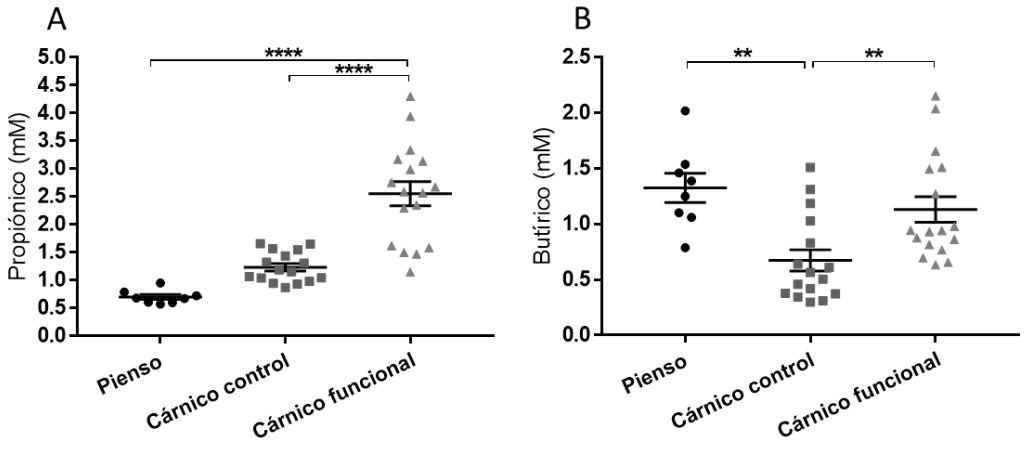

Figura 52: Concentraciones de los dos principales SCFAs en heces de ciego. (A) Concentraciones medias de propionato en las tres cohortes (B) Concentraciones medias de butirato en las tres cohortes. Las unidades se expresan en mM.

Las concentraciones de ácido butírico en la cohorte de pienso fueron de 1,32 ± 0,13 mM. En el caso de la cohorte de alimento cárnico control, estas concentraciones descendieron hasta 0,67 ± 0,09 mM, lo que representó una reducción estadísticamente significativa (p-valor 0,002). Las concentraciones de ácido butírico en la cohorte de cárnico funcional fueron de 1,1 ± 0,11 mM, un aumento significativo respecto a la cohorte de cárnico control (p-valor de 0,009) [Figura 52B].

4.4.6. Efecto del alimento funcional sobre la composición de la microbiota intestinal

La secuenciación metagenómica de la microbiota intestinal de estos tres grupos animales mostró diferencias a nivel de la composición de los filos [Tabla 9].

La principal diferencia observada fue el aumento del filo *Bacteroidetes* en la cohorte de cárnico control y de cárnico funcional, respecto a la cohorte de pienso (46% y 69,7% de aumento respectivamente), así como una reducción del filo *Firmicutes* del 19,61% y del

49,09% respectivamente y un aumento del filo *Proteobacteria* del 90,1% y del 93,81% respectivamente. El filo *Synergistetes* sufrió un aumento en la cohorte de cárnico control respecto a la de pienso y la de cárnico funcional, ya que en estas dos últimas cohortes dicho filo era prácticamente inexistente [Tabla 9].

Porcentaje de:	Pienso	Cárnico control	Cárnico funcional	P-CC	P-CF	CC-CF
Actinobacteria	0,06	0,10	0,05			
Bacteroidetes	15,97	29,58	52,75	*	****	****
Deferribacteres	0,01	0,02	0,00			
Firmicutes	83,47	67,10	42,49	**	****	****
Proteobacteria	0,29	2,94	4,69	*	***	
Synergistetes	0,03	0,17	0,00	**		****
Tenericutes	0,11	0,09	0,00			

Tabla 9: Composición de la microbiota intestinal a nivel de filo para las tres cohortes estudiadas, mostrándose la media del porcentaje respecto al total. El * indica diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes P (pienso), CC (cárnico control) y CF (cárnico funcional).

La relación Firmicutes/Bacteroidetes, descrita como un parámetro indirectamente relacionado con obesidad, mostró un valor significativamente mayor en la cohorte de pienso 6,7 ± 1,5, respecto a la cohorte de cárnico control 2,7 ± 0,4 (p-valor de 0,001), y de la cohorte de cárnico funcional 0,8 ± 0,06 (p-valor < 0,0001) [Figura 53].

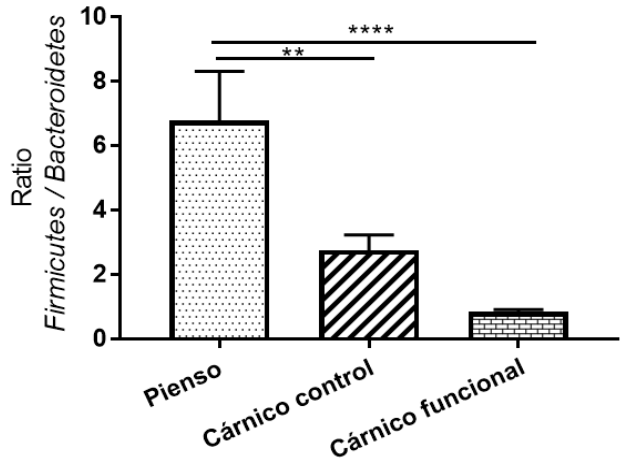

Figura 53: Representación gráfica de la relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* en las tres cohortes de alimentación.

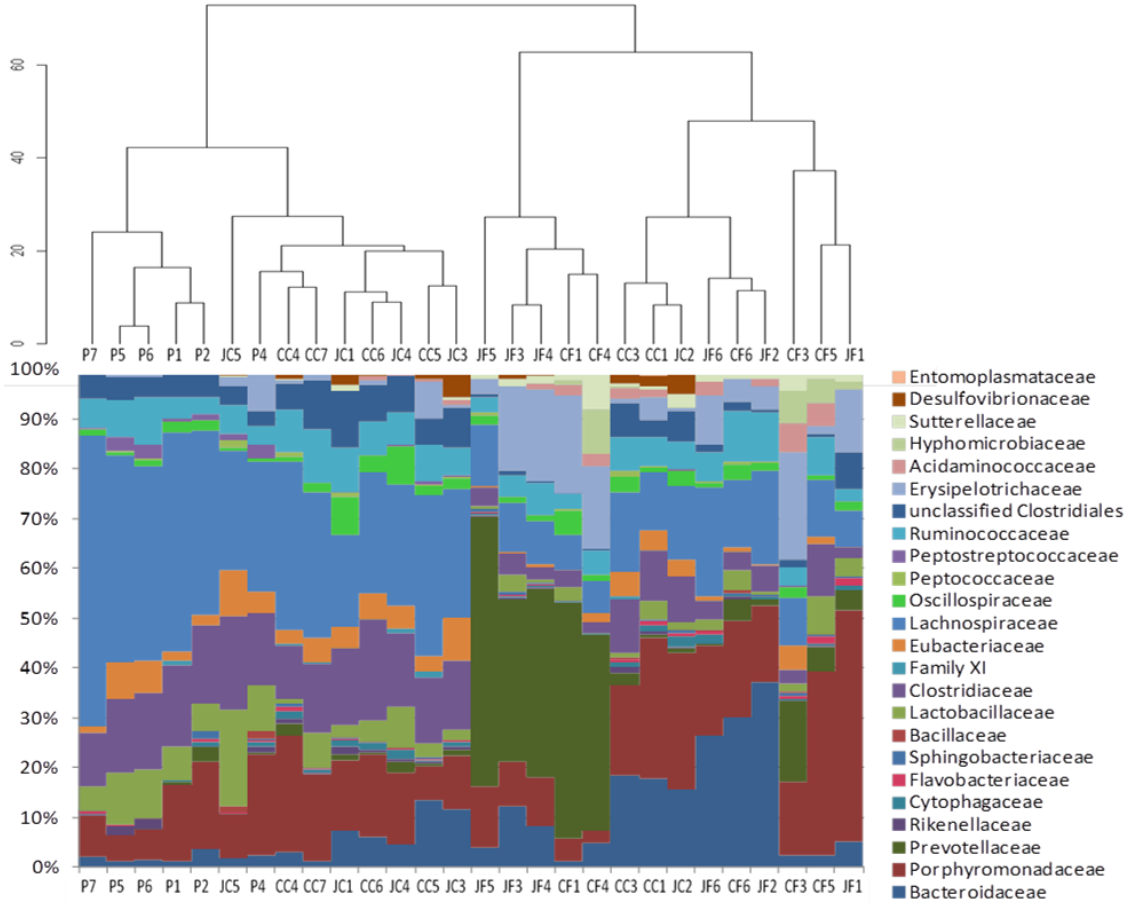

Figura 54: Dendrograma de las principales familias presentes en los animales de las tres cohortes del estudio. P: Pienso. CC: Chorizo control. JC: Jamón control. CF: Chorizo funcional. JF: Jamón funcional.

A nivel de familias, se encontró en primer lugar una distribución homogénea de la microbiota en los animales de cada cohorte. En el dendrograma realizado con los valores de este parámetro para todas las ratas supervivientes [Figura 54] se observó que los animales estaban divididos en dos ramas principales respecto a la homogeneidad de la composición de su microbiota a nivel de familia. Así, estaban agrupados por un lado (zona izquierda de la figura) los animales pertenecientes a la cohorte de pienso y de alimento cárnico control (chorizo y jamón controles) [Figura 54]. Por otro lado (zona derecha del dendrograma) se encontraban todos los animales pertenecientes a la cohorte de alimento cárnico funcional (chorizo y jamón funcionales), con la salvedad de tres animales control (CC3, CC1 y JC2), que se encontraban en una zona más cercana a las cohortes funcionales que al resto de las cohortes control en cuanto a la distribución de familias de esta microbiota intestinal [Figura 54]. Esto implica un mayor parecido entre todos los animales de las cohortes control, bien diferenciados de los de las cohortes funcionales.

Las familias más abundantes en la cohorte de pienso fueron *Lachnospiraceae* (51,9%), *Clostridiaceae* (13,9%) y *Porphyromonadaceae* (9,6%). En la cohorte de cárnicos control, las tres principales familias fueron las mismas que en la cohorte de pienso, aunque cambiaban su proporción absoluta: *Lachnospiraceae* (31,9%), *Clostridiaceae* (13,6%) y *Porphyromonadaceae* (13,2%). Sin embargo, en la cohorte de cárnicos funcionales, las tres principales familias fueron *Prevotellaceae* (22,8%), *Bacteroidaceae* (15,8%) y *Porphyromonadaceae* (12%) [Figura 54].

Las principales diferencias estadísticamente significativas a nivel de familia se encontraron en el caso de *Lachnospiraceae* (51,9% ± 5 en pienso, 31,9% ± 2,4 en cárnico control y 11,9% ± 1,5 en cárnico funcional), *Prevotellaceae* (0,6% ± 0,5; 1,3% ± 0,3 y 22,8% ± 6 respectivamente), *Bacteroidaceae* (4,3% ± 0,8; 12,5% ± 1,8 y 15,8% ± 3,7 respectivamente), *Clostridiaceae* (13,9% ± 1,2; 13,6% ± 1,2 y 6,0% ± 0,9 respectivamente), *Erysipelotrichaceae* (2,1% ± 1,5; 1,7% ± 0,7 y 11,3% ± 2,2 respectivamente), *Ruminococcaceae* (4,5% ± 0,4; 10,8% ± 0,8 y 6,2% ± 0,6 respectivamente), *Lactobacillaceae* (7,4% ± 0,8; 4,6% ± 1,4 y 2,3% ± 0,7 respectivamente), *Hyphomicrobiaceae* (0% ± 0; 0% ± 0 y 1,7% ± 0,8 respectivamente), *Acidominococcaceae* (7,4% ± 0,8; 4,6% ± 1,4 y 2,3% ± 0,7 respectivamente), *Sutterellaceae* (0,0% ± 0,0; 0,5% ± 0,2 y 1,8% ± 0,2 respectivamente) y *Desulfovibrionaceae* (0,2% ± 0,0; 2,1% ± 0,4 y 0,6% ± 0,1 respectivamente) [Figura 55].

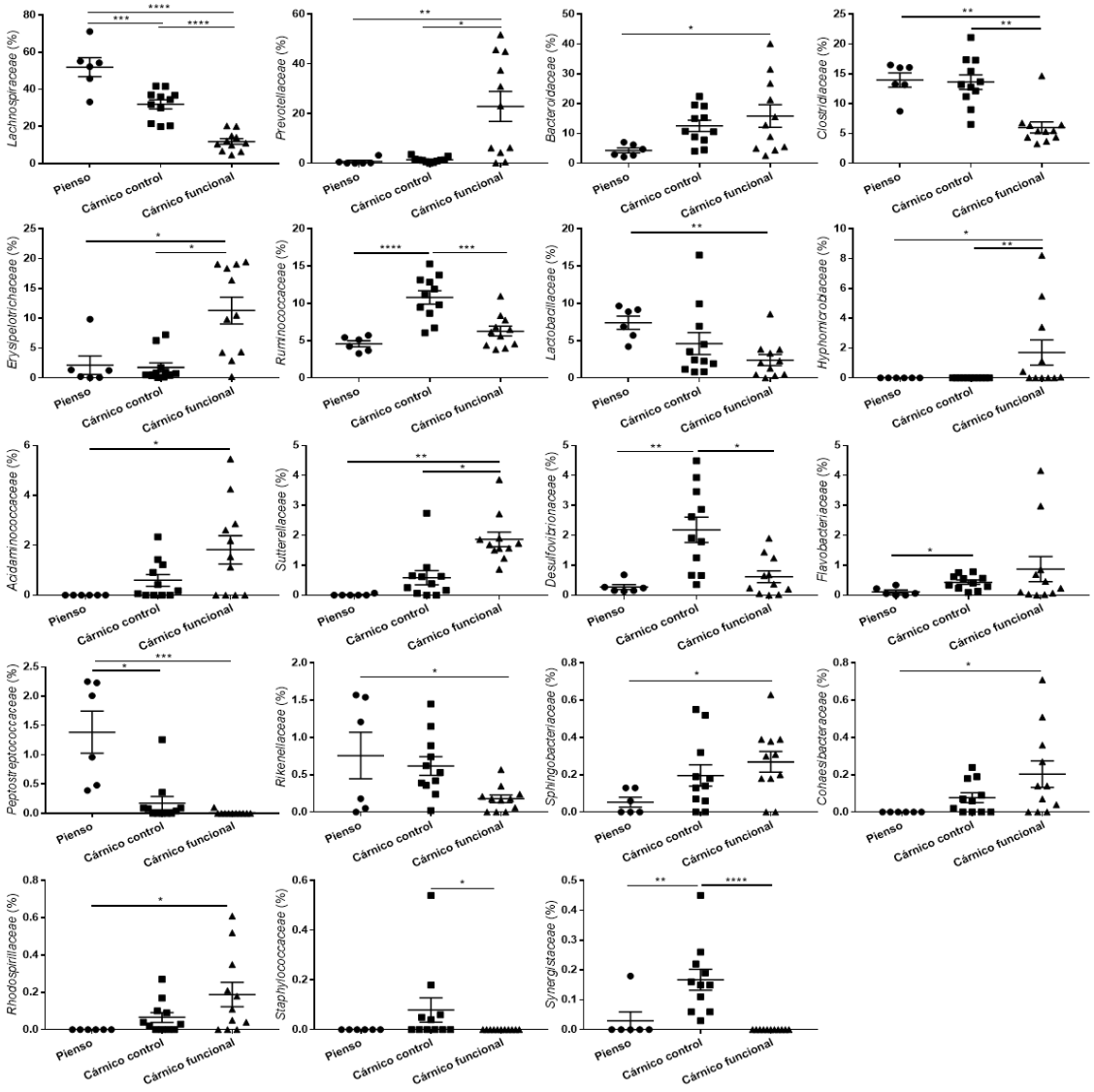

Figura 55: Familias que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso, cárnico control y cárnico funcional.

Otras familias como *Flavobacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Rikenellaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Cohaesibacteriaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Staphylococcaceae* y *Synergistaceae* mostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque con porcentajes de distribución menores al 1% [Figura 55].

En la Tabla 10 se muestran los géneros bacterianos y especies con diferencias significativas entre las cohortes de pienso, cárnico control y cárnico funcional.

Géneros	Especies	Pienso	Cárnico control	Cárnico funcional	P-CC	P-CF	CC-CF
Bacteroides		0,61	8,04	11,34	**	**	
	caccae	0,00	0,80	0,73	**	**	
	thetaiotaomicron	0,00	0,10	0,11	*	*	
	vulgatus	0,24	2,80	0,64	*		
Parabacteroides		0,20	1,09	1,16		*	
	merdae	0,06	0,51	0,61	*	**	
Lactobacillus		7,31	4,44	2,38	*		
	intestinalis	1,61	0,27	0,20	**	*	
	reuteri	0,21	0,06	0,01	*	**	
	taiwanensis	0,77	0,00	0,00	****	****	
	vaginalis	1,02	0,32	0,06	*	**	
Clostridium		5,50	6,07	3,46			**
	hiranonis	0,14	0,03	0,00	*	***	
Anaerostipes		0,01	1,97	0,78	**		
Blautia		0,00	3,86	5,38	*	**	
	glucerasea	0,00	0,07	0,39		**	*
	producta	0,00	0,91	0,39	*		
	sp.	0,00	0,34	0,79		*	
Dorea		0,00	0,52	0,11	*		
Eubacterium		0,00	0,50	0,00			*
	hadrum	0,00	0,50	0,00			*
Lachnoanaerobaculum		0,17	0,12	0,00		**	
Marvinbryantia		0,00	0,18	0,05	*		
Ruminococcus	***gnavus***	0,44	0,29	0,00		***	*
(Ruminococcus)		19,46	9,24	0,22		***	*
	gnavus	6,72	6,08	0,06		***	**
Acetanaerobacterium		0,04	0,12	0,00			*
Ruminococcus	***flavefaciens***	0,55	0,02	0,00	*	*	
Flavonifractor		0,00	0,33	0,82	*	*	
	plautii	0,00	0,24	0,62	*	*	
(Eubacterium)		0,00	0,08	0,48		*	
	dolichum	0,00	0,08	0,48		*	
Phascolarctobacterium		0,00	0,59	1,82		*	
	succinatutens	0,00	0,51	1,65		*	
Gemmiger		0,00	0,00	1,70		*	**
	formicilis	0,00	0,00	1,70		*	**
Parasutterella		0,01	0,58	1,86		***	*
	excrementihominis	0,01	0,49	1,74		***	*
Bilophila		0,05	1,27	0,36	*		
	wadsworthia	0,05	0,92	0,27	*		
Desulfovibrio		0,22	0,88	0,25	**		***
	piger	0,10	0,76	0,23	***		**

Tabla 10: Porcentajes a nivel de géneros y especies y diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota intestinal para las ratas pertenecientes a las cohortes de pienso, cárnico control y cárnico funcional. P: Pienso, CC: cárnico control y CF: cárnico funcional.

Las principales diferencias en cuanto a la abundancia relativa a nivel de géneros y especies se asociaron con una mayor proporción de algunos géneros en la cohorte de cárnico funcional, como *Bacteroides*, *Blautia*, *Phascolarctobacterium*, *Gemmiger* y *Parasutterella* [Tabla 9]. Otros géneros como *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Ruminococcus* mostraron una reducción de sus proporciones en dicha cohorte con respecto a las otras dos [Tabla 10].

4.5. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR genético

Para corroborar los resultados anteriores con los alimentos cárnicos funcionales en un modelo inducido de CCR, se decidió realizar un ensayo con un modelo animal genético.

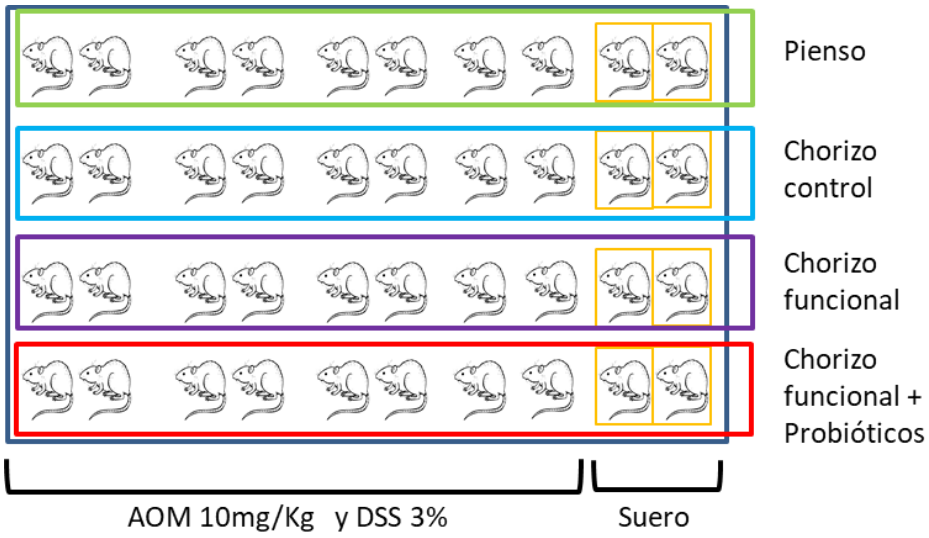

Figura 56: Esquema de la composición de los 4 grupos experimentales. A 8 ratas de cada uno de los 4 grupos se les potenció el desarrollo del CCR mediante la administración de dos dosis de AOM y 1 periodo de DSS al 3% en el agua de bebida. A las otras 2 ratas de cada grupo no se les administró el tratamiento (controles absolutos).

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa KAD, que posee un genotipo F344/NSlc-Apc$^{1588/kyo}$, y que presentan predisposición a desarrollar CCR. La razón es que poseen mutado el gen *apc*, simulando una versión atenuada de PAF. Las ratas se separaron en 4 cohortes con distinta alimentación, compuestas por 10 animales cada una: pienso, chorizo control, chorizo funcional (15,8% de inulina), y chorizo funcional (15,8% de inulina) suplementado con la administración de dos especies bacterianas con potencial efecto beneficioso: *Phascolarctobacterium succinatutens* y *Parasutterella excrementihominis*. Estas dos especies se eligieron en base a experimentos anteriores en el modelo animal de CCR inducido químicamente. A cada uno de los animales de los 3 grupos con alimentación cárnica se les proporcionó diariamente 20 g del alimento cárnico combinados con 10 g de pienso.

Las dos cepas probióticas se administraron mediante cánula orofaríngea a una concentración de 10^8 UFC/mL, una vez a la semana durante los primeros 45 días del experimento y luego cada 15 días hasta la finalización. Cada administración constó de 0,5 mL por animal y día.

Tras la primera semana de alimentación se procedió a administrar, a 8 animales de cada grupo, 2 dosis de AOM a 10 mg/ kg por vía intraperitoneal, separadas entre sí por una semana, con el objeto de potenciar el desarrollo genético del CCR. Una semana después de la segunda dosis de AOM se administró a estos animales DSS al 3% en el agua de bebida, durante 7 días. En este caso solo se administró DSS una única semana. La duración total del ensayo experimental fue de 20 semanas.

4.5.1. Efecto del alimento funcional sobre el peso corporal

Todos los animales se pesaron periódicamente a lo largo del experimento. Las ratas de las cohortes de alimentación cárnica tuvieron un período de unas tres semanas de adaptación al alimento, en las que comían menos de lo previsto, de ahí las diferencias iniciales con la cohorte de pienso [Figura 57].

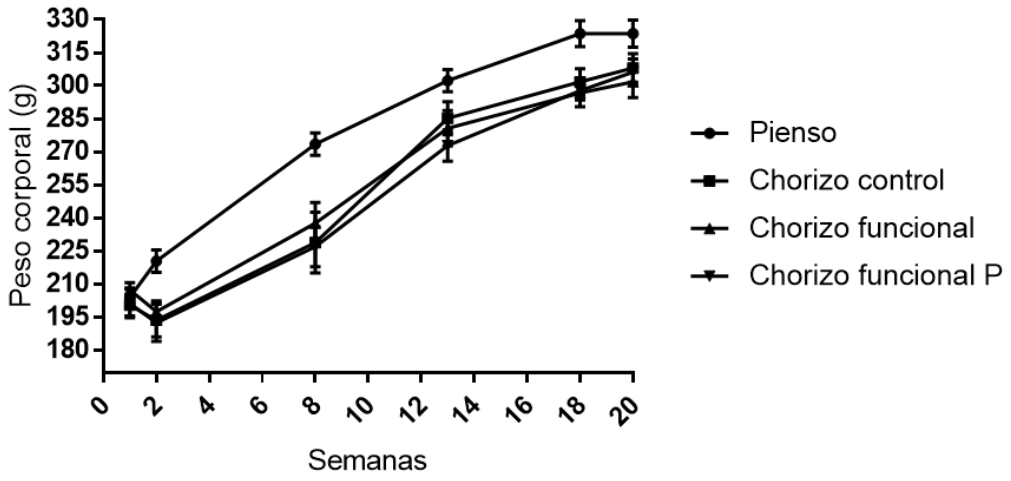

Figura 57: Evolución del peso corporal a lo largo de todo el experimento para las ratas de las cuatro cohortes: pienso control (círculos), chorizo control (cuadrados), chorizo funcional (triángulos), chorizo funcional con probióticos (triángulos invertidos). El peso corporal se midió en las semanas 1, 2, 8, 13, 18 y 20.

Tras la administración del DSS falleció una rata de la cohorte chorizo funcional (animal número 7). En la cohorte chorizo funcional con probióticos fallecieron 4 ratas (números 1, 8, 5 y 10), posiblemente por problemas en el tracto respiratorio (broncoaspiración), asociados a potenciales efectos secundarios de la administración de las dos especies bacterianas mediante la cánula orofaríngea. Ninguna de estas ratas tenía problemas digestivos en suficiente grado como para causar la muerte (ni CCR avanzado, ni CU con

hemorragia intestinal). También falleció durante las primeras semanas experimentales una rata control absoluto de la cohorte chorizo control (número 9), por causas ajenas a alteraciones digestivas.

Tras el sacrificio de los animales, el valor medio del peso en la cohorte de pienso fue de 323,7 ± 6,1 g; en la cohorte de chorizo control fue de 308 ± 6,5 g; en la cohorte de chorizo funcional fue de 301,7 ± 7,1 g; y en la cohorte de chorizo funcional con posibles probióticos fue de 306,1 ± 6 g [Figura 57].

4.5.2. Efecto del alimento funcional sobre el peso del ciego

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes de chorizo funcional y chorizo funcional con probióticos respecto a las cohortes de pienso y chorizo control. Los valores medios de peso del ciego en las 4 cohortes de alimentación fueron: 6,0 ± 0,4 g en pienso, 4,3 ± 0,5 g en chorizo control, 14,7 ± 0,6 g en chorizo funcional, y 14,9 ± 1,3 g en chorizo funcional con probióticos [Figura 58].

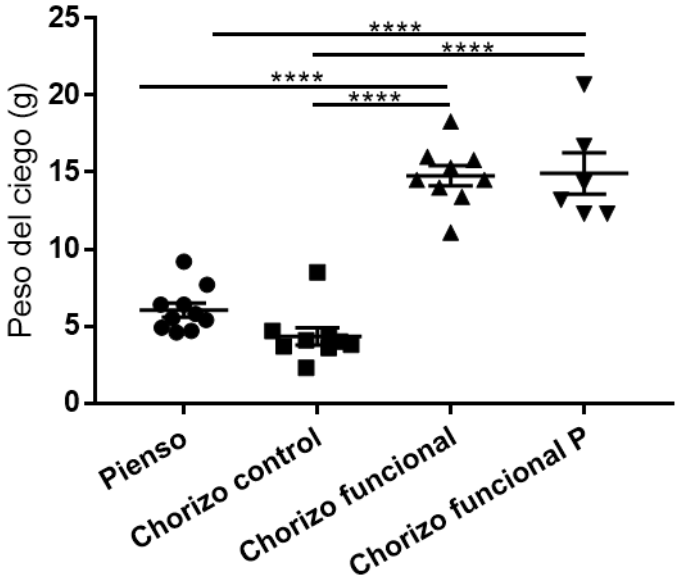

Figura 58: Valores medios del peso del ciego para cada una de las cuatro cohortes. El aumento de peso en las cohortes de chorizo funcional y chorizo funcional más probióticos fue estadísticamente significativo respecto a las otras dos cohortes (p-valores <0,001).

4.5.3. Efecto del alimento funcional sobre el número de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado

Tras el sacrificio se contabilizaron las Placas de Peyer hiperplásicas presentes en la mucosa del intestino delgado. Se muestran los valores medios de estas placas de Peyer sólo en las ratas a las que se les indujo CCR, en las cuatro cohortes utilizadas.

En la cohorte de chorizo control se observó un mayor número de placas de Peyer hiperplásicas respecto a las otras tres cohortes, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

El número de placas de Peyer hiperplásicas en cada cohorte fue de 8 ± 0,3 en pienso; 13,8 ± 0,9 en chorizo control; 9,7 ± 0,6 en chorizo funcional; y 8,8 ± 0,5 en chorizo funcional con probióticos [Figura 59].

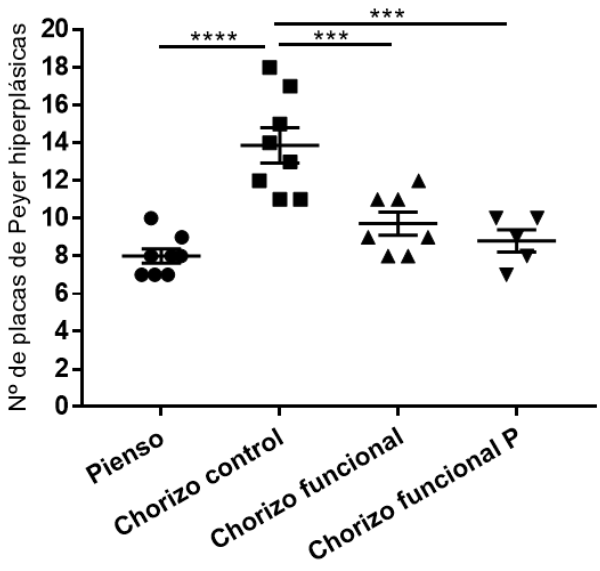

Figura 59: Valores medios de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado para cada una de las cuatro cohortes. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre la cohorte de chorizo control y el resto: pienso (p-valor <0,0001), chorizo funcional (p-valor de 0,001), y chorizo funcional con probióticos (p-valor de 0,0003).

4.5.4. Efecto del alimento funcional sobre el número de pólipos y la superficie afectada en la mucosa del colon

Tras el sacrificio de los animales se contabilizó el número de pólipos y su tamaño a lo largo del intestino grueso. Los pólipos detectados tuvieron un tamaño comprendido entre 1 y 10 mm de diámetro.

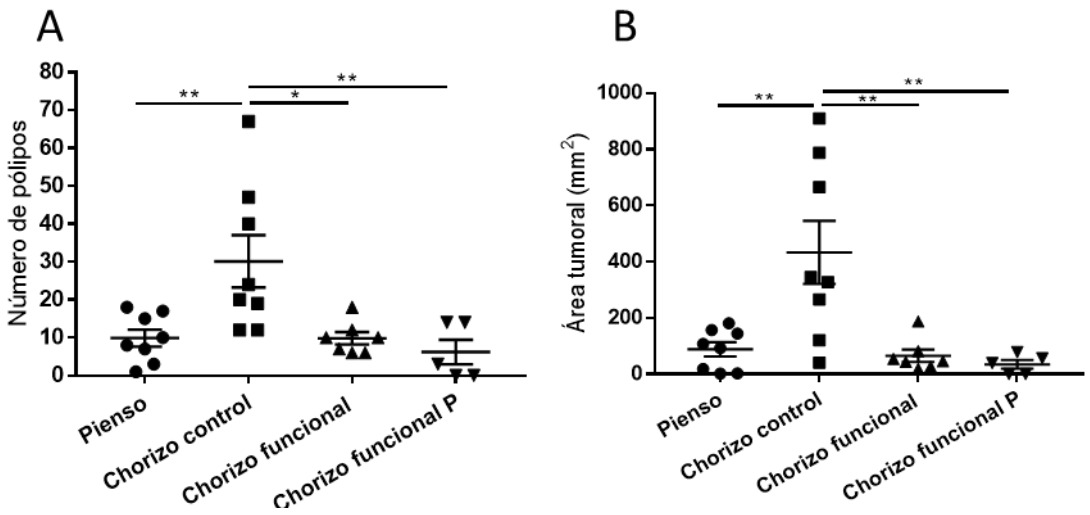

Figura 60: (A) Valor medio del número de pólipos en el colon de cada cohorte. (B) Valor medio del área total de los pólipos en cada cohorte. Para cada animal, se calculó el área de cada pólipo individual, y luego se sumaron estos valores, representando la media de cada grupo en mm^2.

El número medio de pólipos en cada cohorte fue de 9,8 ± 6,3 en pienso; 30,1 ± 6,8 en chorizo control; 9,8 ± 1,6 en chorizo funcional; y 6,2 ± 3,2 en chorizo funcional con probióticos [Figura 60A]. Cabe destacar que en la cohorte de chorizo funcional con probióticos se encontraron dos animales, de los cinco experimentales que sobrevivieron, con cero tumores, un hecho inédito en todos los experimentos realizados sobre CCR en esta tesis.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la cohorte de chorizo control con el resto de cohortes: con la de pienso (p-valor de 0,009), con la de chorizo funcional (p-valor de 0,01) y con la de chorizo funcional con probióticos (p-valor de 0,007) [Figura 60A].

Posteriormente se calculó el área de cada pólipo presente en la mucosa del colon de cada animal, sumando la de todos ellos por animal y realizando la media de la superficie de la mucosa afectada en cada cohorte.

El valor medio de la superficie total del colon afectada por tumores en cada cohorte fue de 88,5 ± 25,5 mm^2 en pienso; 433,1 ± 112,2 mm^2 en chorizo control; 65,8 ± 21,7 mm^2 en chorizo funcional; y 34,9 ± 15,5 mm^2 en chorizo funcional con probióticos [Figura 60B].

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cohorte de chorizo control con el resto de cohortes: con la de pienso (p-valor de 0,003), con la de chorizo funcional (p-valor de 0,003), y con la de chorizo funcional con probióticos (p-valor de 0,003) [Figura 60B].

4.5.5. Efecto del alimento funcional sobre la concentración de SCFAs en heces

Se identificaron y cuantificaron cinco SCFAs a partir de contenido del ciego de cada animal: propionato, butirato, hexanoato, isobutirato y valerato [Figura 61].

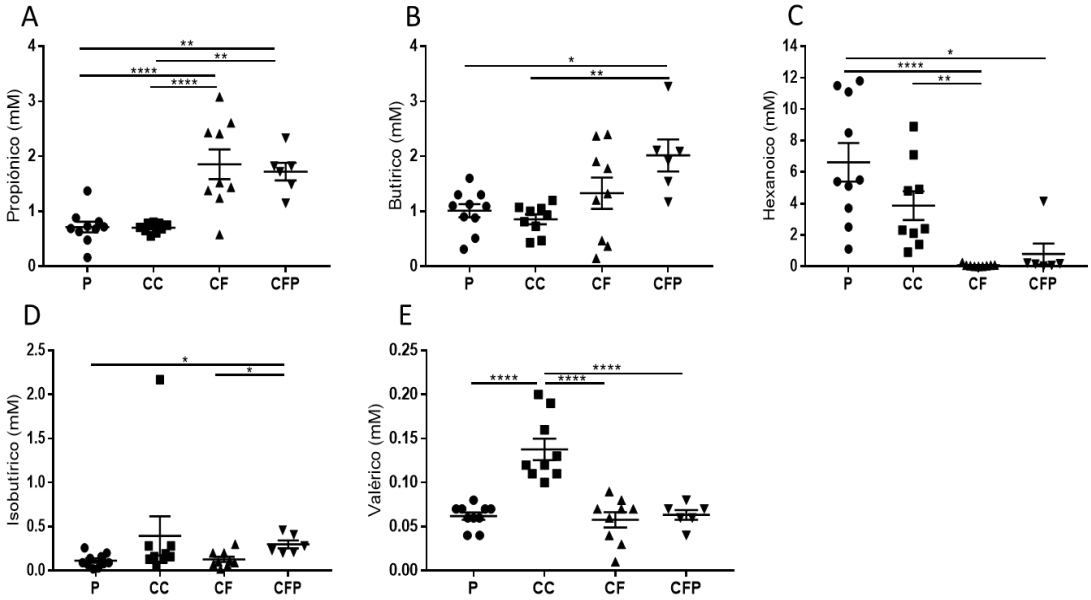

Figura 61: (A) Concentraciones de propionato cecal en las cuatro cohortes. (B) Concentraciones de butirato cecal en las cuatro cohortes. (C) Concentraciones de hexanoato cecal en las cuatro cohortes. (D) Concentraciones de isobutirato cecal en las cuatro cohortes. (E) Concentraciones de valerato cecal en las cuatro cohortes. P: Pienso, CC: Chorizo control, CF: Chorizo funcional, CFP: Chorizo funcional con probióticos.

Las concentraciones de propionato en las 4 cohortes fueron 0,7 ± 0,09 mM en pienso; 0,7 ± 0,02 mM en chorizo control; 1,8 ± 0,2 mM en chorizo funcional y 1,7 ± 0,3 mM en chorizo funcional con probióticos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en

chorizo funcional respecto a pienso y a chorizo control (p-valores <0,0001), y en chorizo funcional con probióticos también con respecto a pienso y a chorizo control (p-valores de 0,001) [Figura 61A].

Las concentraciones de butirato en las 4 cohortes fueron 1 ± 0,1 mM en pienso; 0,8 ± 0,08 mM en chorizo control; 1,3 ± 0,2 mM en chorizo funcional y 2 ± 0,2 mM en chorizo funcional con probióticos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en chorizo funcional con probióticos con respecto a pienso (p-valor de 0,01) y a chorizo control (p-valor de 0,003) [Figura 61B].

Las concentraciones de hexanoato en las 4 cohortes fueron 6,6 ± 1,2 mM en pienso; 3,8 ± 0,9 mM en chorizo control; 0,06 ± 0,02 mM en chorizo funcional y 0,7 ± 0,6 mM en chorizo funcional con probióticos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en pienso respecto a chorizo funcional (p-valor <0,0001) y a chorizo funcional con probióticos (p-valor de 0,01), y en chorizo control con respecto a chorizo funcional (p-valores de 0,005) [Figura 61C].

Las concentraciones de isobutirato en las 4 cohortes fueron 0,1 ± 0,02 mM en pienso; 0,4 ± 0,2 mM en chorizo control; 0,1 ± 0,02 mM en chorizo funcional y 0,3 ± 0,04 mM en chorizo funcional con probióticos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en chorizo funcional con probióticos respecto a pienso (p-valor de 0,01) y a chorizo funcional (p-valor de 0,04) [Figura 61D].

Por último, las concentraciones de valerato en las 4 cohortes fueron 0,06 ± 0,004 mM en pienso; 0,1 ± 0,01 mM en chorizo control; 0,06 ± 0,008 mM en chorizo funcional y 0,06 ± 0,005 mM en chorizo funcional con probióticos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en chorizo control respecto a las tres cohortes restantes (p-valores <0,0001) [Figura 61E].

4.5.6. Efecto del alimento funcional sobre la composición de la microbiota intestinal

En este apartado, al igual que en el estudio previo de inulina en el modelo animal de CCR inducido químicamente, se comparó primero la composición de la microbiota intestinal entre las tres de las cuatro cohortes, en concreto las de pienso, chorizo control y chorizo funcional.

Posteriormente se analizaron los cambios presentes entre la cohorte de chorizo funcional y la de chorizo funcional con probióticos.

Se produjeron cambios significativos a nivel de la composición de filos entre las tres cohortes del primer análisis. En la cohorte de chorizo funcional aumentaron los *Bacteroidetes* un 46,8% con respecto a la cohorte de pienso y un 44,2% respecto a la de chorizo control. En esta misma cohorte de chorizo funcional disminuyeron los *Firmicutes* un 53,8% y un 47,8% respecto a la de pienso y la de chorizo control respectivamente [Tabla 11].

Las *Proteobacterias* aumentaron un 76,7% en la cohorte de chorizo control y un 87,2% en la de chorizo funcional con respecto a la de pienso en ambos casos. Por el contrario, en la cohorte de pienso hubo una mayor proporción de los filos *Synergistetes* y *Tenericutes*, que sin embargo no estaban presentes en la cohorte de chorizo funcional [Tabla 11].

Porcentaje de:	P	CC	CF	P-CC	P-CF	CC-CF
Actinobacteria	0,52	0,48	0,69			
Bacteroidetes	25,71	26,96	48,38		****	****
Firmicutes	69,61	61,59	32,10		****	****
Proteobacteria	2,26	9,72	17,79	**	****	***
Deferribacteres	0,34	0,42	0,20			
Lentisphaerae	0,03	0,00	0,01			
Nitrospinae	0,00	0,00	0,00			
Spirochaetes	0,00	0,14	0,00			
Synergistetes	0,15	0,05	0,00	*	****	
Tenericutes	0,68	0,22	0,00		***	*
unclassified bacteria	0,16	0,11	0,00			
Verrucomicrobia	0,10	0,01	0,23			

Tabla 11: Composición de la microbiota intestinal a nivel de filo para las tres cohortes estudiadas, mostrando la media del porcentaje respecto al total de bacterias cuantificadas. El * indica diferencias estadísticamente significativas entre P (Pienso), CC (Chorizo control) y CF (Chorizo funcional).

Estas diferencias en la composición de microbiota a nivel de filo hicieron que la relación *Firmicutes/Bacteroidetes*, descrita como un marcador asociado a enfermedad (obesidad, etc.), fuese significativamente mayor en la cohorte de pienso (2,8 ± 0,3); y en la cohorte de chorizo control (2,7 ± 0,5), respecto a la cohorte de chorizo funcional (0,6 ± 0,07) (p-valores de 0,0002 y 0,003, respectivamente) [Figura 62].

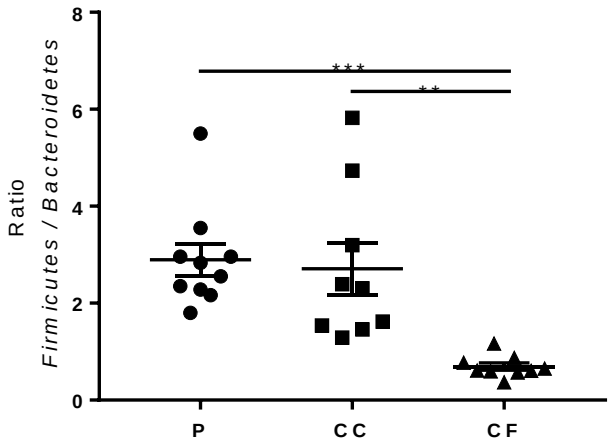

Figura 62: Relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* en las tres cohortes de alimentación. P: Pienso. CC: Chorizo control. CF: Chorizo funcional.

La microbiota intestinal a nivel de familias mostró una composición homogénea entre los animales de cada cohorte de alimentación. Las familias más representadas en la cohorte de pienso fueron *Lachnospiraceae* con un 30,3%; *Clostridiaceae* con 15,2%; y *Porphyromonadaceae* con 15,1% [Figura 63].

En la cohorte de chorizo control se mantuvieron estas mismas familias como las más abundantes, aunque cambiaron sus proporciones: *Lachnospiraceae* 25,9%, *Porphyromonadaceae* 13,8%; y *Clostridiaceae* 12,5% [Figura 63].

En la cohorte de chorizo funcional se produjo un cambio en la composición de las familias más abundantes con respecto a las otras dos cohortes. Aquí, las familias con mayor porcentaje de abundancia fueron *Porphyromonadaceae* 20,7%; *Prevotellaceae* 12,3%; *Desulfovibrionaceae* 9,5%; y *Bacteroidaceae* 8,1% [Figura 63].

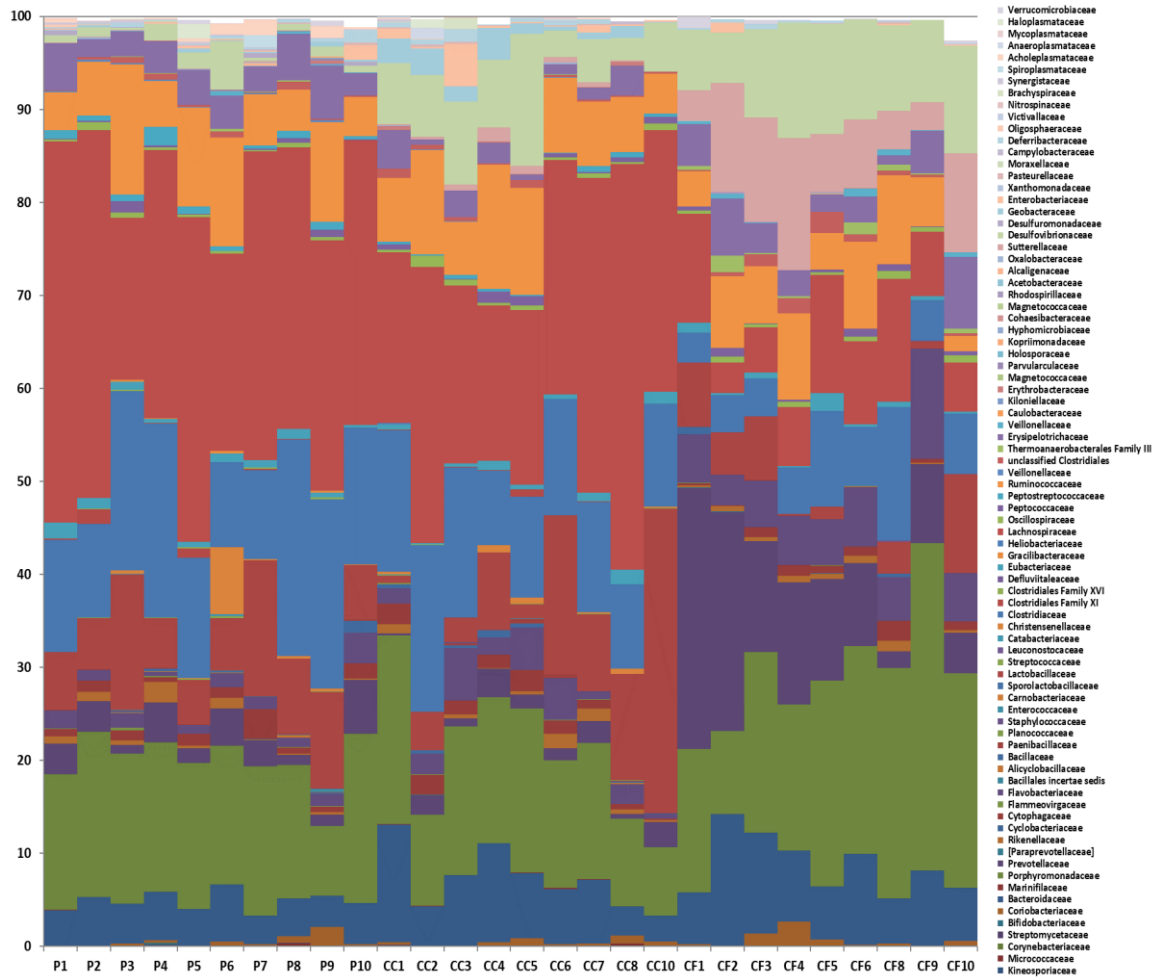

Figura 63: Composición de la microbiota intestinal, a nivel de familias, en cada animal de las tres cohortes estudiadas en esta fase. P: Pienso. CC: Chorizo control. CF: Chorizo funcional.

Las principales diferencias estadísticamente significativas a nivel de familia se encontraron en *Lachnospiraceae* (30,3% ± 2,3 en pienso, 25,9% ± 2,9 en chorizo control y 8,1% ± 1,2 en chorizo funcional), *Porphyromonadaceae* (15,1% ± 0,9; 13,8% ± 1,4 y 20,7% ± 2,4; respectivamente), *Prevotellaceae* (2,8% ± 0,5; 1,6% ± 0,3 y 12,3% ± 2,8; respectivamente), *Clostridiaceae* (15,2% ± 1,6; 12,5% ± 1,1 y 6,4% ± 1,2; respectivamente), *Desulfovibrionaceae* (1,3% ± 0,4; 6,5% ± 1,1 y 9,5% ± 0,8; respectivamente), *Bacteroidaceae* (4,3% ± 0,3; 6,7% ± 1,1 y 8% ± 1; respectivamente), *Flavobacteriaceae* (1,4% ± 0,2; 2,6% ± 0,6 y 5,8% ± 0,8; respectivamente), *Sutterellaceae* (0,04% ± 0,02; 0,5% ± 1,4 y 7,9% ± 1,3; respectivamente) y *Erysipelotrichaceae* (3,6% ± 0,4; 1,7% ± 0,4 y 3,8% ± 0,7; respectivamente) [Figura 64].

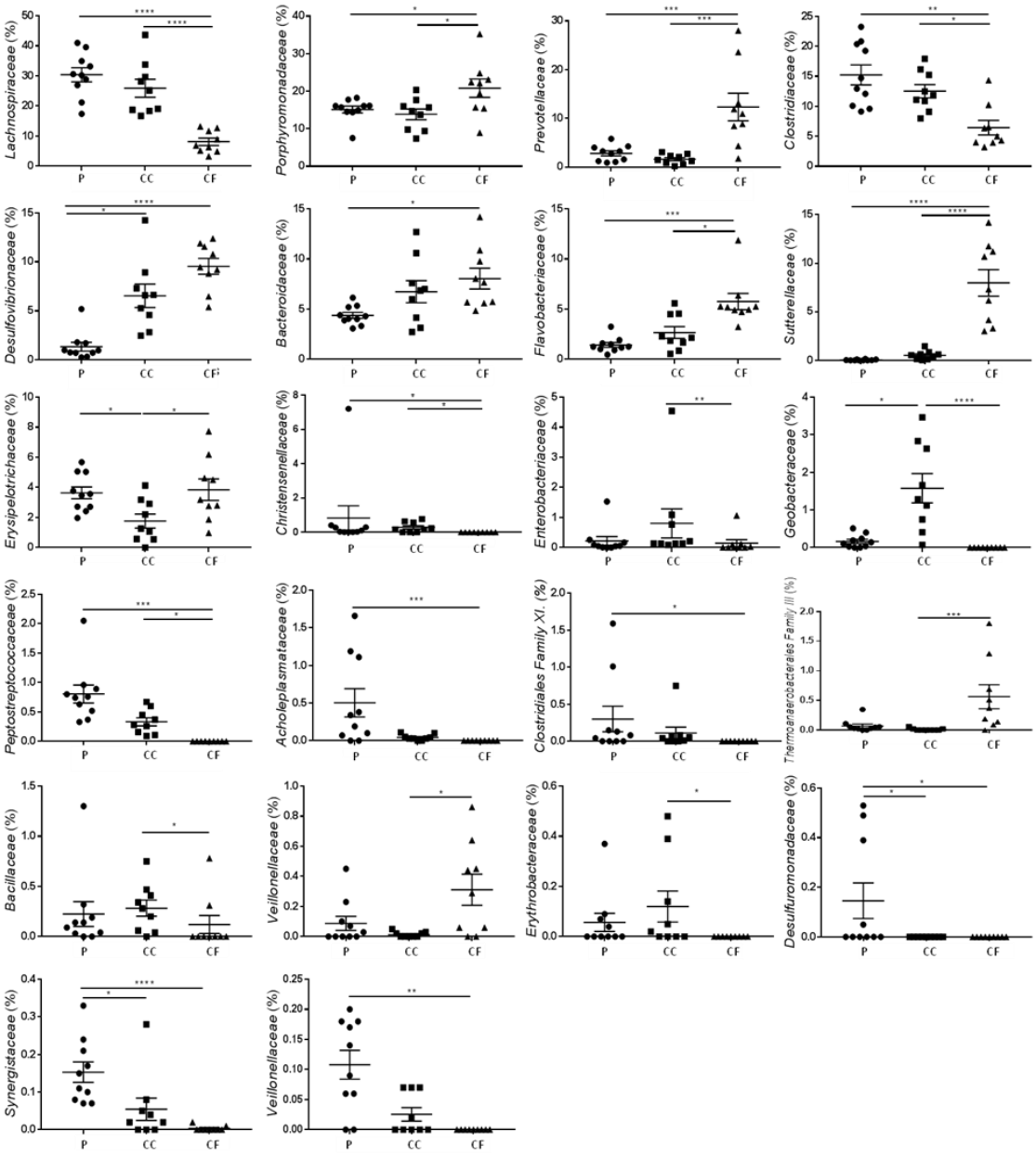

Figura 64: Familias con diferencias estadísticamente significativas entre las tres cohortes analizadas en esta fase. P: Pienso. CC: Chorizo control. CF: Chorizo funcional.

Otras familias presentaron también diferencias estadísticamente significativas entre las tres cohortes analizadas, pero representaban porcentajes inferiores al 1% *Christensenellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Geobacteraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Acholeplasmataceae*, *Clostridiales* familia *XI*, *Thermoanaerobacterales* familia *III*, *Bacillaceae*, *Veillonellaceae* (clase *Clostridia*), *Erythrobacteraceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Synergistaceae* y *Veillonaceae* (Clase *Negativicutes*) [Figura 64].

En la tabla 12 se muestran los géneros y especies que presentaron diferencias significativas entre las tres cohortes analizadas (pienso, chorizo control y chorizo funcional).

Géneros	Especies	P	CC	CF	P-CC	P-CF	CC-CF
Bacteroides		0,869	3,217	1,526	*		
	acidifaciens	0,484	2,568	0,017		*	****
	thetaiotaomicron	0,000	0,043	0,076		**	
Prevotella		0,644	0,606	0,104		*	
Alistipes	*shahii*	0,000	0,042	0,090		*	
Lactobacillus	*intestinalis*	2,439	0,113	0,122	***	***	
	johnsonii	0,732	0,162	0,018	**	***	
	reuteri	0,389	0,448	0,006		**	
	vaginalis	1,229	1,134	0,034		***	**
Clostridium		7,984	5,877	4,522		*	
	bolteae	0,000	0,000	0,149		**	**
	vincentii	0,094	0,011	0,000	*	**	
Anaerostipes	*caccae*	0,000	0,000	0,079		*	*
	sp.	0,000	0,000	1,966		**	**
Blautia		0,106	0,558	0,959		*	
	wexlerae	0,000	0,000	0,149		***	***
	glucerasea	0,004	0,218	0,000	*		**
	producta	0,000	0,029	0,058		*	
Coprococcus		0,187	0,021	0,000		**	
Dorea	*dorea*	0,000	0,027	0,179		*	
	formicigenerans	0,091	0,150	0,000			*
Lachnoclostridium		0,132	0,187	1,187		**	*
	clostridioforme	0,000	0,000	0,966		***	***
Marvinbryantia	*formatexigens*	0,003	0,004	0,059		**	*
Oribacterium		0,213	0,029	0,000		**	
Parasporobacterium		0,040	0,086	0,006	*		***
Tyzzerella		0,119	0,174	0,014		*	**
[Ruminococcus]		9,621	8,587	0,543		***	**
	gnavus	2,669	3,518	0,407		**	***
Oscillibacter	*valericigenes*	0,046	0,086	0,002		*	**
Faecalibacterium		1,133	1,850	3,081		**	
Ruminiclostridium		0,143	0,164	0,014		**	***
Ruminococcus	*flavefaciens*	0,382	0,059	0,004	**	***	
	sp.	0,005	0,136	0,107	**	*	
Subdoligranulum	*sp.*	0,000	0,000	0,096		****	****
Flavonifractor		0,184	0,056	0,710			*
	plautii	0,000	0,000	0,641		**	**
Pseudoflavonifractor		0,060	0,286	0,121	*		
[Eubacterium]	*dolichum*	0,000	0,000	1,502		***	***
Holdemania	*filiformis*	0,000	0,014	0,061		**	
Turicibacter		1,066	0,087	0,012	**	****	
Parasutterella		0,039	0,517	7,930		****	****
	excrementihominis	0,039	0,486	7,423		****	****
Bilophila		0,059	0,832	9,411		****	*
	wadsworthia	0,053	0,731	8,083		****	*
Desulfovibrio		0,918	0,912	0,129			*
Akkermansia	*muciniphila*	0,095	0,006	0,229			*

Tabla 12: Diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota intestinal a nivel de géneros y especies para las ratas pertenecientes a las tres cohortes analizadas. P: Pienso. CC: Chorizo control: CF: Chorizo funcional.

Así, en la cohorte de chorizo funcional se produjo un aumento en la proporción de varios géneros bacterianos, como por ejemplo *Anaerostipes*, *Blautia*, *Dorea*, *Lachnoclostridium*,

Faecalibacterium, *Flavonifractor*, [*Eubacterium*], *Parasutterella* o *Bilophila* [Tabla 12]. Otros géneros como *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, [*Ruminococcus*], *Turicibacter* o *Desulfovibrio* disminuyeron su proporción en es cohorte [Tabla 12].

Finalmente, se compararon también las diferencias en la composición de microbiota entre la cohorte de chorizo funcional y la cohorte de chorizo funcional con probióticos, observándose varias diferencias estadísticamente significativas. Entre ellas, se produjo una reducción de la presencia del filo *Proteobacteria* en la cohorte de chorizo funcional con probióticos (13,4% ± 1,3) respecto a la cohorte de chorizo funcional (17,7% ± 1,7) (p-valor de 0,04) [Figura 65A]. También se produjo una disminución de la proporción del filo *Actinobacteria*, con un 0,1% ± 0,06 en chorizo funcional y un 0,7% ± 0,2 en chorizo funcional con probióticos (p-valor de 0,07) [Figura 65B]. El porcentaje del filo *Synergistetes* aumentó de una forma estadísticamente significativa en la cohorte de chorizo funcional con probióticos (0,02% ± 0,01) respecto a la cohorte de chorizo funcional (0,003 ± 0,002), con un p-valor de 0,09 [Figura 65C].

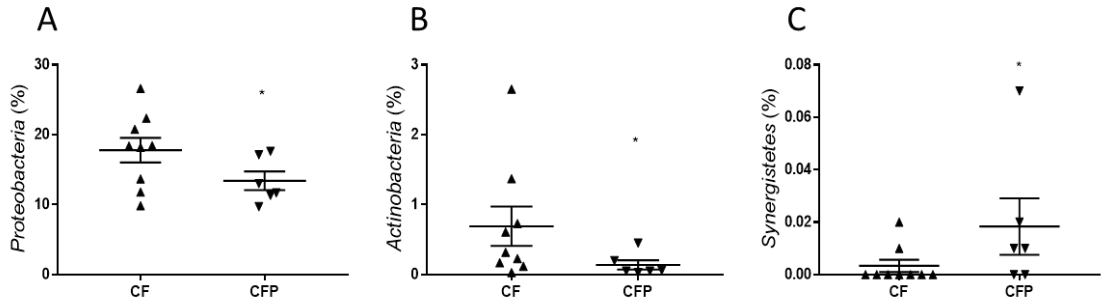

Figura 65: Diferencias estadísticamente significativas a nivel de filos entre la cohorte chorizo funcional y la cohorte chorizo funcional con probióticos. (A) Diferencias en el filo *Proteobacteria*. (B) Diferencias en el filo *Actinobacteria*. (C) Diferencias en el filo *Synergistetes*. CF: Chorizo funcional. CFP: Chorizo funcional con probióticos.

Hubo tres familias en las que las diferencias fueron estadísticamente significativas entre la cohorte de chorizo funcional con probióticos y chorizo funcional. Así, se observó un aumento en la proporción de *Lachnospiraceae*: 11,5% ± 1,4 en la cohorte de chorizo funcional con probióticos y 8,1% ± 1,2 en la cohorte de chorizo funcional (p-valor de 0,09) [Figura 66A]. Se redujo en cambio la proporción de *Coriobacteriaceae:* 0,1% ± 0,05 en la cohorte de chorizo funcional con probióticos y 0,6% ± 0,2 en la cohorte de chorizo funcional (p-valor de 0,07) [Figura 66B]. Por último, la familia *unclassified Clostridiales* también

disminuyó en la cohorte de chorizo funcional con probióticos (0,2% ± 0,05) con respecto a la cohorte de chorizo funcional (0,8% ± 0,2), con un p-valor de 0,03 [Figura 66C].

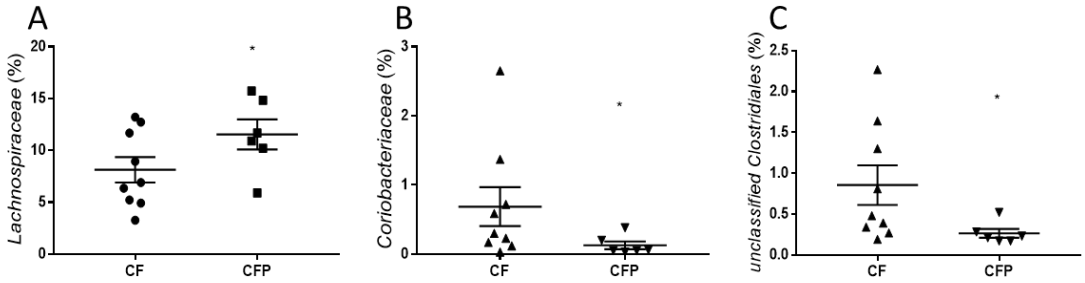

Figura 66: Diferencias estadísticamente significativas a nivel de familia entre la cohorte chorizo funcional y la cohorte chorizo funcional con probióticos. (A) Diferencias a nivel de la familia *Lachnospiraceae*. (B) Diferencias a nivel de la familia *Coriobacteriaceae* (C) Diferencias a nivel de la familia *unclassified Clostridiales*. CF: Chorizo funcional. CFP: Chorizo funcional con probióticos.

Sin embargo, a nivel de género y especie, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para *Phascolarctobacterium succinatutens* ni *Parasutterella excrementihominis,* que fueron las dos especies bacterianas administradas periódicamente a los animales de la cohorte chorizo funcional con probióticos por vía nasofaríngea.

A este nivel taxonómico solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de *Anaerostipes sp.* que aumentó en la cohorte de chorizo funcional con probióticos (5,3% ± 1,4) respecto a la cohorte de chorizo funcional (1,9% ± 0,9), con un p-valor de 0,06. Y también en el caso de *Subdoligranulum sp.*, que redujo su presencia en la cohorte de chorizo funcional con probióticos (0,04% ± 0,01) con respecto a la de chorizo funcional (0,09% ± 0,01), con un p-valor de 0,01.

5. DISCUSIÓN

5.1. Estudio de alimentos cárnicos funcionales enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados para la prevención de CU en un modelo animal

El consumo de altas dosis de productos cárnicos procesados no es recomendable dentro de una dieta saludable o en pacientes con diversas patologías intestinales, como CU. Sin embargo, determinados productos cárnicos tradicionales, como el jamón ibérico de bellota, contienen niveles muy elevados de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), que poseen propiedades antiinflamatorias. El objetivo de este estudio ha sido evaluar si una dieta basada en un producto cárnico con un contenido alto de ácido oleico y una buena (baja) relación ω-6/ω-3 podría ayudar a disminuir los síntomas de CU en un modelo animal (rata) para esta enfermedad. El jamón ibérico de bellota utilizado aquí tiene una relación ω-6/ω-3 más baja que el jamón celta control y el pienso para rata utilizados en las otras dos cohortes experimentales [Tabla 2]. Tanto el ácido oleico como los ácidos grasos ω-3 se consideran antiinflamatorios, protegiendo frente a la CU (Haskey & Gibson 2017; Jowett et al. 2004; Simopoulos 2002; Reddy & Naidu 2016; Tomasello et al. 2016) y otras enfermedades, como las cardiovasculares (Christon 2003; de Lorgeril & Salen 2006; Scoditti et al. 2014).

Un parámetro importante para ver el estadio de la CU en los animales de las tres cohortes empleadas (pienso, jamón control y jamón ibérico de bellota) fue la evolución del peso del animal durante todo el experimento [Figura 12]. Así, en la cohorte de pienso se observó que la ganancia del peso era negativa en el 50% de los animales [Figura 12A]. En la cohorte de jamón control, seis de los ocho animales con CU inducida no sobrevivieron a la enfermedad, y los dos restantes tuvieron una ganancia de peso negativa [Figura 12B]. Finalmente, en la cohorte de jamón de bellota, los 8 animales a los que se les indujo CU tuvieron una ganancia de peso positiva [Figura 12C]. Este parámetro indica una mejor evolución de los animales alimentados con jamón de bellota frente a la CU. A partir de aquí, el resto de los análisis se realizó comparando los datos obtenidos de las cohortes de pienso y de jamón de bellota, ya que en la cohorte de jamón control sobrevivieron tan solo 2 animales, lo cual le restaba potencia estadística.

Tras el sacrificio de los animales que habían sobrevivido al experimento, se analizó el efecto de las tres diferentes dietas empleadas sobre la CU. En concreto se estudiaron primero tres parámetros histológicos: evaluación del daño macroscópico, alteración del epitelio del colon

y densidad de células inflamatorias en la mucosa del colon [Figura 13A, 13B y 13C], observándose en los tres parámetros diferencias estadísticamente significativas entre la cohorte de jamón de bellota y la de pienso. Estos tres parámetros son indicativos de la extensión de los daños causados en la mucosa del colon y de la del estado proinflamatorio, mostrando que la dieta con jamón de bellota ayudó a prevenir y a mejorar la recuperación del daño causado en la mucosa del colon debido al tratamiento con DSS, utilizado para inducir CU. Una posible explicación es que estos efectos protectores de la mucosa del colon son debidos al efecto antiinflamatorio del ácido oleico, que es muy abundante en el jamón de bellota (51,92%), así como a su baja relación ω-6/ω-3, que indica una baja concentración de ácidos grasos ω-6, de carácter proinflamatorio (Reddy & Naidu 2016; Simopoulos 2002).

Otro dato histológico, que respalda el menor estado proinflamatorio en la mucosa del colon de las ratas de la cohorte jamón de bellota, es que los niveles de mieloperoxidasa en la mucosa del colon de esta cohorte fueron significativamente mucho más bajos, 0,13 unidades de MPO frente a 1,76 unidades de MPO en la cohorte de pienso [Figura 13D]. La prueba de la mieloperoxidasa se lleva a cabo en estudios de CU porque sirve como un método cuantitativo para la presencia de granulocitos infiltrados en la mucosa del colon, un tipo de células inmunes asociadas a estados inflamatorios y, por lo tanto, cuanto mayor es el valor de mieloperoxidasa mayor es el estado proinflamatorio de esta mucosa (Soubh et al. 2015; Nakase et al. 2001; Topcu-Tarladacalisir et al. 2013). En línea con estos resultados, se determinó también el índice de actividad de enfermedad (DAI), que mostró un descenso en la cohorte de jamón de bellota (DAI 0,87), estadísticamente significativo respecto a la cohorte de pienso (DAI 4) [Figura 12E].

Se analizaron además diversos parámetros en plasma sanguíneo en estas dos cohortes (pienso y jamón de bellota). Uno de ellos, la capacidad antioxidante (medida por el método FRAP), fue significativamente mayor (un 30,5%) en la cohorte de jamón de bellota respecto a la de pienso [Figura 15A]. Este hecho se explica debido a los niveles más elevados de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (con capacidad antioxidante) en el jamón de bellota. En cuanto a los niveles de citocinas proinflamatorias analizadas, IL-17 e IFN-γ, éstas sufrieron un descenso estadísticamente significativo (77,2% y 21,6% de descenso respectivamente) en sus niveles plasmáticos en el caso de la cohorte de jamón de bellota respecto a la de pienso [Figura 15B y 15C]. Estos parámetros inmunológicos son una clara

explicación a nivel bioquímico de los menores daños observados en la mucosa del colon en los animales de esta cohorte [Figura 13].

También se observaron diferencias importantes en el contenido de ácidos grasos en el plasma sanguíneo [Tabla 4]. Así, como se esperaba de una dieta rica en ácido oleico, los animales de la cohorte de jamón de bellota mostraron el doble de cantidad de ácido oleico en plasma sanguíneo [Figura 17A], y también un menor contenido de ω-6 (21,8% frente al 33,6% en la cohorte de pienso), lo que iba asociado a una menor relación ω-6/ω-3 [Figura 17B y C].

Todos estos parámetros indicaron un estado proinflamatorio menor en los animales de la cohorte jamón de bellota, que en realidad se corroboró a nivel histológico, como se ha descrito ya.

Finalmente se analizó mediante GC-MS el contenido cecal de cada animal sacrificado, ya que en este órgano la microbiota intestinal lleva a cabo procesos de fermentación, entre otros sustratos sobre la fibra ingerida, dando lugar a SCFAs (Clauss et al. 2003). Se trató así de buscar diferencias en la producción de SCFAs, asociadas a la digestión de las diferentes dietas en el ciego de los animales (Louis & Flint 2009; Fernández et al. 2015; Hamer et al. 2008). Sólo tres SCFAs mostraron una mayor concentración en el ciego de los animales de la cohorte de jamón de bellota: el ácido isobutírico, el ácido isovalérico y el ácido valérico [Figura 16]. Sin embargo, la concentración de ácido butírico disminuyó en la cohorte de jamón de bellota (0,32 mM) respecto a la de pienso (0,98 mM), debido a la lógica ausencia de fibra prebiótica en el jamón de bellota [Tabla 1], nutriente que debe ser fermentado por la microbiota presente en el ciego para generar SCFAs (Fernández et al. 2015; Fernández et al. 2016).

Por otro lado, dos de los animales de la cohorte de pienso, P3, y especialmente P4, se encontraban en un estado crítico una semana después del tratamiento con DSS (DAI 7 y 8 respectivamente) [Figura 12E]. Estas dos ratas perdieron entre el 21% y el 25% del peso corporal con respecto a la semana 1 [Figura 12A]. Además, curiosamente en estas ratas P3 y P4 la mayor pérdida de peso corporal se produjo en la semana posterior a la retirada del DSS [Figura 12A], es decir, durante el período de recuperación, lo cual indicaba una mala prognosis de la enfermedad.

Al estudiar en detalle la microbiota intestinal de estos dos animales con problemas serios de pérdida de peso (P3 y P4), se evidenció una importante alteración a todos los niveles taxonómicos examinados, especialmente en la rata P4, en comparación con los demás animales de la cohorte de pienso [Figuras 18 y 19]. A nivel de filos, la rata P4 mostró un 52% de contenido en *Bacteroidetes*, un 38% de *Firmicutes* y 9% de *Proteobacteria*, con una relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* de 0,7. En cambio, el resto de ratas de esta cohorte de pienso mostraron, de promedio, un 13% de *Bacteroidetes*, 86% de *Firmicutes* y 0,5% de *Proteobacteria*, con una relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* de 6,6. Estas diferencias indicaban claramente una disbiosis intestinal profunda en las ratas P3 y P4 con respecto a los otros animales de la cohorte de pienso. De hecho, la distribución a nivel de filo para estas ratas P3 y P4 era más similar a la de los animales de la cohorte de jamón de bellota (44% *Bacteroidetes*, 34% *Firmicutes* y 21% *Proteobacteria*, con una relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* de 0,8. Esta similitud puede indicar que la relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* probablemente no es suficiente para expresar el estado de salud del individuo, ya que aunque la rata P4 estaba en una condición crítica, los animales de la cohorte de jamón de bellota se recuperaron y prosperaron tras los tratamientos con DSS, y sin embargo ambos tipos de animales mostraban la misma relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes*.

Aunque había además también más similitudes que diferencias en las proporciones relativas de la mayoría de las familias presentes en la microbiota de la rata P4 en comparación con los valores promedio de los animales de la cohorte de jamón de bellota, sin embargo, se encontraron diferencias significativas a nivel de género y especie. Por ejemplo, la proporción relativa del género *Parabacteroides* fue la misma (4,5%) en la rata P4 y en la cohorte de jamón de bellota, pero mientras que la distribución a nivel de especie dentro de esta familia en los animales de la cohorte de jamón de bellota fue de 2,8% de *Parabacteroides distasonis*; 0,7% *P. goldsteinii* y 0,01% *P. merdae*; en la rata P4 estos valores fueron de 0,7% de *P. distasonis*, 0,5% de *P. goldsteinii* y 3% de *P. merdae*. Fueron tal vez estas distribuciones tan diferentes a nivel de especie las que causaron la diferencia tan importante entre un animal enfermo (como las ratas P3 y P4) y uno sano (como aquellos en la cohorte de jamón de bellota).

En general, los animales de la cohorte de jamón de bellota mostraron una distribución de taxones de la microbiota intestinal muy diferente respecto a los de la cohorte de pienso

[Figuras 18, 19 y 20]. El significado de todos estos cambios es difícil de determinar, así como establecer los taxones más relevantes que fueron favorecidos con la dieta de jamón de bellota, y que podrían estar por tanto involucrados en la protección frente al daño por DSS durante la inducción de CU.

En este sentido, *Bacteroides vulgatus* (familia *Bacteroidaceae*) [Figuras 19 y 20B] tuvo una presencia relativamente alta en la cohorte de jamón de bellota (7,7%), en comparación con la cohorte de pienso (0,4%). Varios estudios han encontrado que esta especies es más frecuente en controles humanos sanos que en pacientes con CU o EII (Conte et al. 2006; Takaishi et al. 2008; Noor et al. 2010), y que puede proporcionar protección frente a la CU (Waidmann et al. 2003; Sydora et al. 2005; Frick et al. 2007). Sin embargo, otros estudios muestran que la actividad sialidasa de *B. vulgatus* causa la liberación de ácido siálico desde el tejido intestinal, causando inflamación intestinal y disbiosis microbiana en ratones después de la administración de DSS (Huang et al. 2015).

Parabacteroides distasonis (filo *Bacteroidetes*, familia *Porphyromonadaceae*) [Figura 19] estaba presente en mayor proporción en la cohorte de jamón de bellota (4%) que en la cohorte de pienso (0,05%). Como en el caso de *B. vulgatus*, se han asignado roles opuestos a esta especie en el desarrollo de CU. Por un lado se ha descrito como un reductor de la inflamación intestinal en ratones tratados con DSS, debido a la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Kverka et al. 2011). Pero por otro lado también se ha descrito como un potenciador de la inflamación en ratones que portan una mutación en las proteínas antiinflamatorias de reconocimiento del péptidoglicano a nivel intestinal (Pglyrps, *peptidoglycan recognition proteins*) (Dziarski et al. 2016). Quizás, el papel protector de *P. distasonis* requiere la presencia de las proteínas Pglyrps en la mucosa intestinal. Homólogos de estas proteínas pueden estar presentes en los animales de tipo silvestre utilizados en este estudio y podrían ayudar por tanto a *P. distasonis* a llevar a cabo un efecto antiinflamatorio, ya que los animales de la cohorte de jamón de bellota con altos números de esta especie mostraron un estado más saludable.

Los animales de la cohorte de jamón de bellota mostraron una gran reducción en el filo *Firmicutes* con respecto a la cohorte de pienso, del 50% [Figuras 18A y C]. Dos familias en este filo mostraron las mayores reducciones en la cohorte de jamón de bellota respecto a la de pienso, *Lachnospiraceae* (del 47% en pienso al 10% en jamón de bellota) y

Ruminococcaceae (del 12% en pienso al 2%) [Figuras 19 y 20A]. Estas dos familias incluyen numerosas especies con capacidad de sintetizar SCFAs (como butirato o propionato) por fermentación de diversas fibras prebióticas (Biddle et al. 2013; Volf et al. 2016). Estas fibras están presentes en la dieta de pienso, pero están totalmente ausentes en los dos tipos de dietas de jamón. Por lo tanto, la ausencia (o poblaciones muy reducidas) de estas dos familias en los animales de la cohorte jamón de bellota debería de ser un factor facilitador del desarrollo de CU en estas ratas. Sin embargo, este no fue el caso, y probablemente otros factores estuvieron involucrados en la disminución de los síntomas de la CU mostrada por estos animales de la cohorte de jamón de bellota [Figura 12E]. Dentro de *Lachnospiraceae* se redujeron las poblaciones de bacterias mucolíticas, como *Ruminococcus gnavus*, en los animales de la cohorte de jamón de bellota (del 17,5% en pienso al 1,5% en jamón de bellota). Estos resultados van en consonancia con diversos estudios que describen que esta bacteria es más abundante en pacientes con EC y EII (Joossens et al. 2011; Willing et al. 2010; Png et al. 2010) y que puede desempeñar un papel importante en la inducción de inflamación intestinal crónica (Eun et al. 2014).

Incluso a pesar de esta disminución observada en *Lachnospiraceae* para la cohorte de jamón de bellota, algunos géneros como *Blautia* aumentaron, de un 0,01% en la cohorte de pienso a un 4% en la cohorte de jamón de bellota. En la literatura, los pacientes con CU y EC han mostrado una menor abundancia del género *Blautia* que la población sana (G.-L. Chen et al. 2017; Wang et al. 2018). Una explicación a este hecho es que *Blautia* podría ayudar a mantener la homeostasis intestinal, siendo beneficiosa debido a su capacidad de producir propionato (Polansky et al. 2015).

En la cohorte de jamón de bellota, la pérdida de microbiota productora de butirato, como especies de la familia *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* [Figura 16E] podría haberse compensado con un aumento de microorganismos capaces de producir otros SCFAs como isobutirato, isovalerato y valerato [Figuras 16A, B y C].

El mayor porcentaje de *Bacteroidetes* en la cohorte de jamón de bellota, un 44% frente a un 13% en la cohorte de pienso [Figura 18] podría explicar el mantenimiento en la producción de SCFAs, ya que algunos de los géneros de este filo pueden producir butirato, como *Butyricimonas* (0,04% en la cohorte de pienso frente a 1,2% en la cohorte de jamón de bellota) (Lin et al. 2013), y la mayoría de los miembros de este filo son principalmente

productores de propionato (Polansky et al. 2015). Así, por ejemplo, el género *Alistipes* (familia *Rikenellaceae*) [Figuras 19 y 20B]. no estaba presente en la cohorte de pienso, pero representaba el 1,6% en la cohorte de jamón de bellota. Varios estudios han relacionado la presencia de *Alistipes* con un estado bueno de salud (Mancabelli et al. 2017), y una disminución de este género se ha asociado a procesos inflamatorios (Borton et al. 2017). Aparte de producir SCFAs, *Alistipes* genera succinato como producto final y esto puede estimular la producción de varios SCFAs por parte de otros microorganismos comensales presentes en el intestino, en concreto a través de la ruta del succinato (Nagai et al. 2010). Por ejemplo, *Phascolarctobacterium* (familia *Acidaminococcaceae*, *Firmicutes*) [Figuras 19 y 20A] es un género bacteriano que utiliza succinato para producir propionato, y que era casi indetectable en ratas de la cohorte de pienso, pero que poseía un 0,7% de presencia en la cohorte jamón de bellota (Watanabe et al. 2012).

Otra diferencia notable entre ambas cohortes fue la presencia de la bacteria *Bilophila wadsworthia* (familia *Desulfovibrionaceae*) [Figuras 19 y 20C]. Aunque esta especie del filo *Proteobacteria* está presente en la microbiota intestinal de humanos sanos (Jia et al. 2012), se ha encontrado frecuentemente asociada a inflamación en el apéndice y puede considerarse como un patógeno oportunista (Schumacher et al. 1997). En varios modelos de ratón también se han encontrado evidencias de que la EII puede ser causada por *B. wadsworthia*, ya que esta bacteria aumenta considerablemente en ratones mutantes IL10 $^{-/-}$, carentes de esta interleucina antiinflamatoria (I. Yang et al. 2013). Una dieta alta en grasas saturadas, como las derivadas del consumo de leche, puede promover la multiplicación de *B. wadsworthia* en el intestino, conduciendo a un aumento significativo de CU en los ratones mutantes IL10 $^{-/-}$, pero no en animales silvestres (Devkota et al. 2012; Devkota & Eugene B. Chang 2015). En otros estudios, la administración oral de *B. wadsworthia* en ratones libres de patógenos dio como resultado la reducción del peso corporal, de la grasa, hepatoesplenomegalia y aumento de varios factores inflamatorios séricos; incluida la proteína sérica amiloide A y la IL-6, que indican una respuesta inflamatoria sistémica (Feng et al. 2017).

En la cohorte de pienso hubo total ausencia de *B. wadsworthia*, con la excepción de la rata P4 (1,3%), que presentaba con una profunda disbiosis frente al resto de sus congéneres de cohorte. Por el contrario, las cohortes de jamón mostraron una proporción de un 16,5% para esta bacteria; unos valores están en consonancia con un trabajo previo que mostró un aumento de la misma en dietas cárnicas (David et al. 2014).

Sin embargo, en este trabajo, los animales de la cohorte de jamón de bellota que mostraron altas poblaciones de *B. wadsworthi*a tenían también un DAI más bajo que las ratas de la cohorte de pienso. En la cohorte de jamón de bellota, el aumento de peso y la recuperación fueron mejores después del tratamiento con DSS [Figura 12C]. Además, los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias (como TNF-α e IL-6) no fueron estadísticamente diferentes entre la cohorte pienso y la de jamón de bellota, lo que indica que se requieren más factores además de la presencia de *B. wadsworthia* para el desarrollo de CU en este modelo animal.

Un evento destacado en este experimento fue el hecho de que en la cohorte de jamón control, 6 de los 8 animales tratados con DSS murieron con hemorragias y daños graves en el colon [Figura 12B]. Cuando se comparó la tasa de crecimiento de los animales control absoluto (aquellos que carecían del tratamiento con DSS, las ratas 9 y 10) en las tres cohortes, se observó que las ratas control absoluto de la cohorte de jamón de bellota tuvieron al final del experimento un aumento medio de peso del 44%; mientras que las ratas control absoluto de la cohorte jamón control mostraron un 13% de ganancia de peso, un valor que fue incluso menor que el de los animales de la cohorte de pienso (32% de aumento de peso) [Figura 12D].

Una explicación plausible para estos resultados es la presencia de una concentración elevada de nitratos, utilizados como conservantes, en el jamón control (189 ppm) [Tabla 1]. Los nitratos y nitritos son aditivos comunes utilizados en la carne y otros productos alimenticios, que proporcionan un atractivo color rojo intenso, debido a su unión a la mioglobina muscular (Skibsted 2011). Su principal uso es proteger contra la contaminación y el deterioro provocado en esos alimentos por los microorganismos anaerobios, como las especies del género *Clostridium*, por lo que son aditivos importantes en seguridad alimentaria, que evitan, por ejemplo, brotes de botulismo (Skovgaard 1992). Sin embargo, durante la elaboración del jamón de bellota no se añaden nitratos, con lo que el contenido de los mismos en este producto es de solo 15 ppm (12,5 veces menor que en el jamón control) [Tabla 1]. A nivel intestinal, diversas especies de la microbiota llevan a cabo la reducción de los nitratos a nitritos, que son más tóxicos. Esta transformación intestinales una causa bien conocida de intoxicación en el ganado, donde los nitritos causan la oxidación de la hemoglobina en los eritrocitos, dando lugar a metahemoglobinemia (Cockburn et al. 2013). Además, se sabe que la ingestión crónica de nitritos actúa como un agente tóxico para los riñones, el intestino, el

hígado, los pulmones y otros órganos, e incluso tiene potencial efecto procarcinógeno (Özen et al. 2014).

En este trabajo se pudo observar de forma indirecta la formación de nitritos a partir de nitratos (debido a la actividad nitrato reductasa), ya que se cuantificaron las proporciones de microorganismos intestinales capaces de llevar a cabo esta reducción enzimática. Otros autores han identificado genes codificadores de la actividad nitrato reductasa en los genomas asociados a grupos filogenéticos concretos de la microbiota intestinal (Winter & Bäumler 2014). Esos estudios demostraron la presencia de estos genes en la mayoría de los genomas pertenecientes al filo *Actinobacteria,* así como en dos clases del filo *Proteobacteria* (*Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*). En nuestros experimentos, el porcentaje de estos grupos taxonómicos en concreto fue tres veces mayor en la cohorte de jamón control (13,7%) que en la cohorte de jamón de bellota (4,7%) [Figura 67]. Esta diferencia podría deberse a la mayor cantidad de nitrato presente en el jamón control [Tabla 1], lo que habría favorecido el crecimiento de estas bacterias intestinales reductoras de nitrato y la formación de altas cantidades tóxicas de nitrito. Así, cuando estos animales de la cohorte de jamón control estuvieron expuestos al tratamiento con DSS, la mayoría (6 de 8 animales) no pudieron superar el daño proinflamatorio intestinal adicional tras el causado por esas concentraciones elevadas de nitrito y se murieron.

Los dos únicos animales de la cohorte jamón control que sobrevivieron al estudio (C1 y C5), mostraron una proporción mucho más elevada del género *Enterococcus* (12,6%) respecto a los controles absolutos de la misma cohorte (ratas C9 y C10), que tenían una proporción del 0,6% [Figura 19]. La alta presencia del género *Enterococcus* en la cohorte de jamón control respecto a las otras dos cohortes (donde representaban menos del 0,05%) podría deberse a la capacidad de estas bacterias para obtener energía a partir de la reducción de los nitritos presentes, generando óxido nítrico a través de la vía de la desnitrificación (donde están implicados los genes *nirK* y *nirS*) (Heylen et al. 2006). La presencia de este género reductor de nitritos podría explicar la supervivencia de las ratas C1 y C5 durante el tratamiento con DSS, debido a las propiedades probióticas de las especies de *Enterococcus* y la capacidad demostrada de estas cepas para suprimir el desarrollo de colitis inducida por DSS (L. L. Chen et al. 2009; Avram-Hananel et al. 2010; Kanda et al. 2016; Raz et al. 2007).

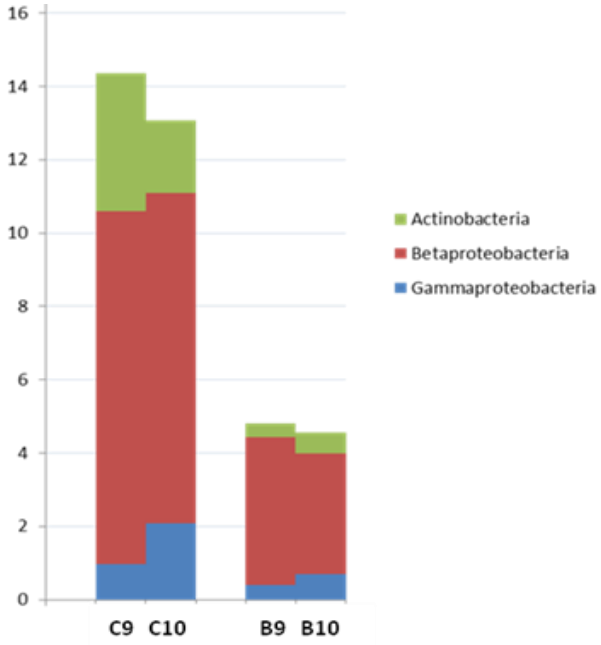

Figura 67: Potenciales taxones reductores de nitrato a nitrito presentes en la microbiota de las ratas control absoluto de la cohorte jamón control y de la de jamón de bellota. C: Jamón control. B: Jamón de bellota.

Así, este modelo animal ha demostrado que una alta ingesta dietética de productos cárnicos que contienen un alto contenido de nitrato puede ser una razón de toxicidad crónica (en este caso letal) por la formación de nitritos, debido a la reducción intestinal del nitrato. Sin embargo, la suplementación dietética con algunas especies de *Enterococcus* podría usarse para contrarrestar las intoxicaciones esporádicas de nitritos en humanos.

En resumen, la dieta de jamón de bellota modificó la microbiota intestinal de las ratas debido a la menor presencia de carbohidratos y mayor de proteínas en este alimento, lo que condujo a una disminución de las especies de *Firmicutes* (sacarolíticas) y a un aumento de *Bacteroidetes* (proteolíticos) y *Proteobacteria* [Figura 18]. Esta disbiosis en la cohorte de jamón de bellota redujo las poblaciones de bacterias productoras de butirato, pero aumentó las de productoras de isobutirato, isovalerato y valerato; de modo que las cantidades totales de SCFAs en ambas cohortes fueron similares, incluidas concentraciones similares de propionato [Figura 16]. Otras propiedades beneficiosas de las especies incrementadas en la cohorte de jamón de bellota fueron la contribución al mantenimiento de una homeostasis intestinal apropiada y la mejoría en la recuperación de estos animales después del tratamiento con DSS.

Además, la composición de ácidos grasos saludables presentes en el jamón de bellota, con niveles muy altos de ácido oleico (antiinflamatorio) y una baja relación de ω-6/ω-3, puede servir en el futuro como una estrategia en la prevención del inicio y progresión de la CU, como se ha demostrado en este modelo animal. Este perfil saludable de ácidos grasos en el jamón de bellota se debe a que los cerdos ibéricos en libertad se alimentan exclusivamente con bellotas, que muestran un perfil similar, alto, de estos ácidos grasos saludables.

5.2. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con antocianinas para la prevención de CCR en un modelo animal.

En este segundo estudio, las salchichas administradas como alimento (a dos cohortes de animales) fueron diseñadas con un bajo contenido en grasas saturadas, mediante el uso de caña de lomo de cerdo como ingrediente principal (30% de proteínas y un 8% de lípidos). Estos dos tipos de salchichas también contenían como ingredientes un 1,5% de ajo y un 0,3% de pimienta negra. En las salchichas funcionales, a esta fórmula base se añadió un 10% de una mezcla de mora y fresa deshidratada, como fuente de antocianinas (0,1% del total).

Las tres cohortes de ratas fueron alimentadas así durante 20 semanas con pienso, salchichas control o salchichas funcionales. En este modelo animal para CCR, los tumores de colon se indujeron químicamente mediante AOM y su efecto carcinogénico se potenció con un estadio transitorio de CU mediante la administración de DSS en el agua de bebida, durante dos semanas separadas en el tiempo. Uno de los animales de la cohorte de pienso murió durante la segunda administración de DSS, debido a un intenso sangrado rectal inducido por la CU. El efecto perjudicial del AOM (administrado en las semanas 2 y 3) y del DSS (administrado en las semanas 4 y 15) se corroboró al monitorizar el peso de cada animal de las diferentes cohortes, ya que en esos períodos de tratamiento se observó una reducción del crecimiento, especialmente en las ratas de la cohorte de pienso y de salchicha control [Figura 22]. Una posible explicación de esta aparente protección frente a los efectos del AOM y DSS en la cohorte de salchichas funcionales puede ser el conocido efecto antiinflamatorio de las antocianidinas (Decendit et al. 2013; Sodagari et al. 2015b; Piberger et al. 2011; Boussenna et al. 2016; Chamcheu et al. 2015).

Tras las 20 semanas del experimento, se sacrificaron las 29 ratas supervivientes y se evaluó el efecto de las diferentes dietas sobre el desarrollo de CCR. Para ello, se analizaron varios parámetros histológicos, como el número de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino

delgado, la capacidad antioxidante total en plasma sanguíneo, el peso del ciego, el número de tumores y la extensión tumoral total [Figuras 23 a 26].

En el caso de las placas de Peyer hiperplásicas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes de salchicha funcional y de salchicha control [Figura 23]. Estas estructuras de la mucosa del intestino delgado contienen gran cantidad de linfocitos y se vuelven hiperplásicas como una reacción a alteraciones en el tracto digestivo que afecten al sistema inmune del animal, como por ejemplo ante la respuesta a toxinas (Mishra et al. 2014). En este estudio, el número de placas de Peyer hiperplásicas sirvió como medida indirecta de la condición proinflamatoria general de los animales tras el tratamiento de inducción de CCR. Los resultados mostraron un menor número de placas de Peyer hiperplásicas en la cohorte de salchichas funcionales (un 27,1% menor que en salchichas normales), pudiendo explicarse este hecho por el efecto antiinflamatorio que ejercían las antocianinas presentes en este tipo de alimento (un 0,11% del contenido total de esta matriz cárnica).

Otro efecto beneficioso de las antocianinas presentes en el alimento de la cohorte de salchichas funcionales fue mostrado al analizar la capacidad antioxidante en el plasma sanguíneo (mediante ensayo FRAP) [Figura 24]. En la cohorte salchicha funcional se observó un aumento estadísticamente significativo de este parámetro en comparación con la cohorte de pienso, indicando que estos flavonoides, al igual que gran parte de los compuestos de esta familia, son potentes antioxidantes, protegiendo frente a daños en el ADN y frente a la progresión del cáncer (Lin et al. 2017; Alipour et al. 2016; Lu et al. 2017).

A nivel histológico se midió además el número de tumores presentes en cada colon y la extensión de la mucosa del colon afectada por estos [Figura 26]. En cuanto al número de tumores, se produjo una reducción estadísticamente significativa entre la cohorte de salchichas funcionales (31,8 ± 3,3) respecto a la cohorte de pienso (58,5 ± 9,5). Esta reducción fue también notable respecto a la cohorte de salchichas control (44,5 ± 6,2), aunque en este caso careció de significación estadística. A partir de estos resultados se puede deducir que la adición de antocianinas a la formulación de las salchichas funcionales proporcionó protección frente a CCR, pdando lugar por tanto a cárnicos procesados con propiedades preventivas frente a CCR en este modelo animal.

Es de destacar también que la cohorte de salchichas control mostró un aumento en el número de tumores respecto a la cohorte de salchichas funcionales, pero mostró menos tumores que la cohorte de pienso, aunque sin una diferencia estadísticamente significativa. Una explicación es que estas salchichas se formularon utilizando caña de lomo de cerdo, que tiene un bajo contenido graso (8% de lípidos) y con la ausencia de los conservantes habituales en este tipo de cárnicos procesados, como los nitritos y nitratos (precursores de nitrosaminas, potencialmente carcinogénicas). Además, en la formulación de este alimento cárnico se utilizó un 1,5% de ajo en polvo y un 0,3 % de pimienta negra liofilizada, como aditivos antimicrobianos. Estas especias tienen propiedades antitumorales demostradas frente a CCR, debido al contenido de alicina del ajo y el contenido en piperina de la pimienta negra (Jikihara et al. 2015; Rather & Bhagat 2018). Estos nutracéuticos pueden ser los responsables de la pequeña reducción en cuanto al número de tumores en la cohorte de salchichas control respecto a la de pienso. De todos modos, la adición del 1,1% de antocianinas a este cárnico permitió la generación de un alimento cárnico con propiedades preventivas de CCR [Figura 26].

La composición de la microbiota intestinal en estos animales se determinó, como en el estudio del apartado anterior, mediante secuenciación del ARN ribosomal 16S de muestras del contenido del ciego. A nivel de filo, se observaron diferencias entre la cohorte de pienso y las dos de salchichas (control y funcional) [Tabla 5 y Figura 27]. Sin embargo, la composición a nivel de filo entre las dos cohortes de salchichas fue bastante similar [Figura 27], conteniendo ambas cohortes altas proporciones del filo *Proteobacteria* (15,8% en la cohorte de salchichas control y 10,4% en la funcional). Por tanto se puede deducir que la adición de carne en la dieta de estos animales causó un incremento en el porcentaje del filo *Proteobacteria* [Tabla 5], que va en consonancia con varios estudios en modelos animales y poblaciones humanas, donde la presencia de mayores cantidades de productos cárnicos en la dieta se asocia con una disbiosis en la microbiota intestinal hacia poblaciones del filo *Proteobacteria* y un estado proinflamatorio. Este estado proinflamatorio, relacionado con una mayor ingesta de productos cárnicos, ha sido asociado a una mayor incidencia de CU, EC y CCR (Constante et al. 2017; Agus et al. 2016). Por el contrario, en la cohorte de pienso, con un mayor contenido de fibra ingerida, aumentaron las poblaciones de *Firmicutes* (82,99%, frente a 69,6% y 75,2 % en salchicha control y funcional, respectivamente) y

Bacteroidetes (16,42%, frente a 12,4% y 12,1% en salchicha control y funcional, respectivamente) [Tabla 5].

La composición a nivel de familias fue bastante similar en las dos cohortes de salchichas, aunque se observaron algunas diferencias en tres familias en concreto [Figuras 28 y 29]. *Clostridiaceae* fue más frecuente en la cohorte de salchichas funcionales, y *Enterobacteriaceae* y *Desulfovibrionaceae* fueron menos frecuentes en la cohorte de salchichas funcionales [Figura 28]. La reducción de la presencia de la familia *Desulfovibrionaceae,* del 11,09% en la cohorte de salchicha control al 7,96% en la de salchicha funcional, fue la única que mostró diferencias estadísticamente significativas también a nivel de especie. Éste fue el caso de *Bilophila wadsworthia*, una bacteria intestinal que es capaz de reducir el sulfito, generando H_2S [Figura 30]. En diversos estudios donde se utilizaron dietas ricas en carne, *B. wadsworthia* aumentó sus poblaciones intestinales, ya que el mayor contenido en grasas de estas dietas indujo un incremento de la secreción de ácidos biliares, a los que esta bacteria es resistente. Además, la mayor abundancia de esta especie en personas afectadas por enfermedades intestinales (apendicitis, EII, etc.) produce altos niveles genotóxicos de H_2S en el intestino, que están asociados al desarrollo de trastornos intestinales proinflamatorios y al CCR (David et al. 2014; Devkota et al. 2012; Rowan et al. 2009; Attene-Ramos et al. 2007; Yazici et al. 2017). Este efecto proinflamatorio de *B. wadsworthia* se ha demostrado en un modelo de ratón libre de patógenos, donde la administración oral de esta bacteria indujo un estado inflamatorio, con reducción de peso corporal, hepatoesplenomegalia, elevación de los niveles de IL-6 sérica y de la proteína amiloide A (Feng et al. 2017).

En base a estos datos, se pudo observar que la introducción de antocianinas en estas salchichas funcionales permitió producir diversos cambios en la microbiota intestinal, principalmente en tres familias (*Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Desulfovibrionaceae*). En la familia *Desulfovibrionaceae*, estos cambios se debieron principalmente a una reducción en las poblaciones de *B. wadsworthia,* que en el caso de la cohorte de salchichas funcionales causó probablemente un efecto secundario protector tras la ingestión de antocianinas. Sin embargo, el potencial efecto inhibitorio de las antocianinas sobre el crecimiento de *B. wadsworthia* aún no ha sido analizado directamente *in vitro*.

Respecto a la prevención de CCR, *in vitro* se ha observado efecto antitumoral sobre líneas celulares de este cáncer usando diferentes extractos ricos en antocianinas(Feng et al. 2017). Por ejemplo, experimentos *in vitro* con la línea celular de CCR Caco-2 mostraron una reducción del 40% en la supervivencia después del tratamiento con antocianinas extraídas de boniatos azules (Feng et al. 2017). Se han observado efectos similares sobre otras líneas celulares de CCR, como HT29 (Venancio et al. 2017; López de Las Hazas et al. 2017). Estos flavonoides también han mostrado un efecto protector *in vivo* en modelos animales de CCR, como en ratones con el gen a*p*c mutado, donde se observó que el número de tumores se redujo un tercio tras la suplementación de la dieta con un 10% de boniato azul (0,12% de antocianinas) (Asadi et al. 2017). Una reducción similar de los tumores en el colon se observó también en un modelo de ratones alimentados con extracto de arándanos, una fuente rica en antocianinas (Lippert et al. 2017).

Las antocianinas muestran importantes propiedades antiinflamatorias, siendo capaces de reducir los niveles de linfocitos T $CD3^+$ en la mucosa intestinal, un grupo celular asociado a las cascadas de inflamación (Päivärinta et al. 2016). En otros estudios, las antocianinas han sido descritas como agentes moduladores de la microbiota intestinal. Por ejemplo, la suplementación de antocianinas en un modelo animal de CCR fue capaz de reducir las poblaciones de bacterias patógenas (como *Enterococcus sp.* y *Desulfovibrio sp.*) y al mismo tiempo aumentar la de especies con potencial probiótico (como *Eubacterium rectale* o *Faecalibacterium prausnitzii*) en el intestino (Chen et al. 2018). Esta modulación de la microbiota intestinal puede explicar las diferencias presentadas entre las dos cohortes de salchichas de este estudio experimental. En el intestino, los flavonoides glucosilados, como las antocianinas, sufren la hidrólisis enzimática de sus azúcares, dando lugar a sus aglicones, en este caso las antocianidinas, que son la parte activa de estos flavonoides, absorbida entonces por los colonocitos (Marín et al. 2015; D'Archivio et al. 2010).

En este estudio, la prevención observada frente a CCR probablemente se deba a los efectos antiinflamatorios de la suplementación con antocianinas, ya descritos para estos flavonoides; al igual que a la capacidad antioxidante observada en el plasma de los animales de la cohorte salchichas funcionales, pero también a la reducción de poblaciones bacterianas con potencial efecto proinflamatorio, como *B. wadsworthia*.

En resumen, en este segundo estudio se ha formulado un producto cárnico procesado funcional con antocianinas, con propiedades preventivas en CCR. Estos productos cárnicos funcionales pueden ser una alternativa en la dieta para promover una mejor salud en la población, especialmente en países donde se produce una alta disbiosis de la microbiota debido al consumo excesivo de productos cárnicos.

5.3. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con prebióticos derivados de lactulosa para la prevención de CCR en un modelo animal

En este estudio se utilizó una dieta que contenía añadido el prebiótico GOS-Lu, que está formado por una mezcla de lactulosa 24,7%; fructosa 19,5%; galactosa 12,4%; glucosa 1,2%; disacáridos GOS-Lu 13,6%; trisacáridos GOS-Lu 22,6%; tetrasacáridos GOS-Lu 5,1%; y pentasacáridos GOS-Lu 1%. Este prebiótico fue añadido al 10% en el agua de bebida de los animales utilizados.

Se indujo químicamente CCR a 8 animales de cada una de las dos cohortes que conformaron el estudio (pienso, y pienso con GOS-Lu). Para ello se utilizó el método de AOM con refuerzo vía DSS. Un animal de la cohorte de pienso falleció durante la segunda administración de DSS a causa de hemorragias intestinales causadas por la inducción de CU. El efecto perjudicial de la inducción de CCR se observó al cuantificar la ganancia de peso de los animales, con una reducción de su crecimiento en las primeras semanas (especialmente en la semana 5) a consecuencia de la administración de AOM y DSS. No hubo diferencias significativas en la ganancia de peso entre las dos cohortes durante las 20 semanas que duró el experimento [Figura 32].

Al finalizar el experimento en la semana 20, los 19 animales que sobrevivieron fueron sacrificados con el fin de evaluar el efecto de la dieta prebiótica sobre el CCR. Para ello, se analizaron ciertos parámetros histológicos, como el peso del ciego, el número de tumores y la extensión tumoral afectada total [Figuras 33 y 34].

El peso del ciego aumentó significativamente en la cohorte de GOS-Lu (7,63 ± 0,4 g) frente a la cohorte de pienso (5,64 ± 0,4 g) [Figura 33]. El aumento del ciego sirve como una indicación de las propiedades prebióticas de esta preparación GOS-Lu, ya que el ciego es la parte principal del trato digestivo donde se produce el proceso fermentativo dela fibra

prebiótica, llevado a cabo por la microbiota intestinal. En presencia de prebióticos, algunas poblaciones bacterianas prosperan en el ciego, lo que contribuye a que este órgano aumente de tamaño (Roller, Rechkemmer, et al. 2004; Wang et al. 2010; Chen et al. 2011).

La producción de SCFAs detectada en las heces se correlaciona así con la fermentación bacteriana de los compuestos prebióticos en el ciego. En este estudio se observó un aumento estadísticamente significativo del 56,9% en las concentraciones de propionato de la cohorte GOS-Lu respecto a la de pienso [Figura 35A]. En los otros SCFAs detectados mediante GC-MS, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, pese a que las concentraciones de butirato y hexanoato descendieron en la cohorte de GOS-Lu [Figura 35]. Estos resultados se correlacionarán más adelante con los cambios en la composición de la microbiota intestinal de ambas cohortes, donde se estudiarán los taxones bacterianos involucrados en la producción de SCFAs.

A nivel histológico se cuantificó el número de tumores presentes en el colon y la extensión de la mucosa afectada por los mismos [Figura 34]. El número de tumores sufrió un descenso estadísticamente significativo de un 57,5% en la cohorte de GOS-Lu (24,8 ± 1,5) frente a la cohorte de pienso (58,5 ± 9,5). Este descenso también se observó en la extensión de la mucosa del colon afectada por tumores, en la que se redujo un 50,4% su extensión en la cohorte de GOS-Lu (240 ± 28,1 mm^2) con respecto a la cohorte de pienso (484,8 ± 76,6 mm^2). Estos resultados muestran un claro efecto protector de la suplementación de la dieta con GOS-Lu frente al CCR, que concuerdan con los potenciales efectos antitumorales de los diferentes prebióticos descritos en la bibliografía (Gourineni et al. 2011; Bauer-Marinovic et al. 2006; Hsu et al. 2004).

Tras analizar estos parámetros histológicos, se determinó la composición de la microbiota intestinal a partir del contenido cecal mediante la secuenciación del ARN ribosomal 16S. En este caso se utilizaron diversos índices de diversidad alfa para calcular la diversidad taxonómica de las muestras de las dos cohortes. Los índices de Shannon, Chao y Simpson mostraron mayor riqueza bacteriana en el ciego de los animales de la cohorte de GOS-Lu respecto a los animales de la cohorte de pienso [Figura 37].

El análisis de microbiota a nivel de filos mostró diferencias importantes entre ambas cohortes [Tabla 6]. Así, la cohorte de GOS-Lu mostró un incremento del 28.1% en *Bacteroidetes* y una disminución del 19.3% en *Firmicutes*. Consecuentemente, en la cohorte de GOS-Lu se

produjo una disminución estadísticamente significativa en la ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* [Figura 36]. En la literatura se ha propuesto que una ratio elevada del parámetro *Firmicutes*/*Bacteroidetes* es un buen marcador para determinadas enfermedades en animales y humanos, como obesidad y diabetes tipo II (ambas afecciones inflamatorias y metabólicas) (Ley et al. 2005; Ley et al. 2006).

A nivel taxonómico de familias, se observó que el aumento significativo del filo *Bacteroidetes* en la cohorte de GOS-Lu se debía principalmente al aumento en la abundancia de la familia *Bacteroidaceae* (en concreto en el género *Bacteroides*) y de la familia *Prevotellaceae* (en concreto en el género *Paraprevotella*), además de a un aumento del género *Parabacteroides* [Tabla 7, Figura 38 y 40]. Estos tres géneros cobraron importancia en este estudio, ya que habían sido descritos como buenos productores de propionato (Polansky et al. 2015). El género *Phascolarctobacterium*, que pertenece a la familia *Acidaminococcaceae* (*Firmicutes*), también es un buen productor de propionato (Watanabe et al. 2012) y sufrió incremento en la cohorte de GOS-Lu. Estos cuatro géneros son así los principales responsables del aumento en la producción de propionato observada en la cohorte de GOS-Lu [Tabla 7, Figuras 40 y 41A]. Este aumento de la concentración de propionato puede ser una explicación plausible para la gran reducción de tumores observada en esa cohorte con suplementación prebiótica en la dieta [Figura 34].

La reducción estadísticamente significativa en el filo *Firmicutes* se debió, en general, a los menores porcentajes de población de la familia *Lachnospiraceae* [Figuras 38 y 40]. Sin embargo, algunos géneros concretos de esta familia eran ligeramente más abundantes en la cohorte de GOS-Lu (*Lachnoclostridium*, *Anaerostipes*, *Dorea* o *Blautia*). La familia *Lachnospiraceae* está involucrada en la producción de altos niveles de butirato (Polansky et al. 2015), y su reducción en la cohorte de GOS-Lu podría relacionarse con los niveles más bajos de producción de butirato encontrados en los animales de esta cohorte [Figura 35B]. Dentro de la familia *Lachnospiraceae,* la bacteria mucolítica *Ruminococcus gnavus* mostró una reducción significativa. Esta bacteria no beneficiosa aumenta en casos de EC y EII (Joossens et al. 2011; Willing et al. 2010; Png et al. 2010), jugando un papel importante en la inducción de inflamación intestinal crónica (Eun et al. 2014).

La familia *Eubacteriaceae* (*Firmicutes*) también sufrió una reducción de sus niveles en la cohorte de GOS-Lu. Esta disminución puede tener un papel protector frente a procesos

proinflamatorios, ya que se ha descrito un aumento de *Eubacteriaceae* en perros que padecían EII (Omori et al. 2017).

Otras tres familias de *Firmicutes* fueron más abundantes en la cohorte de GOS-Lu: *Oscillospiraceae*, *Christensenellaceae* y *Ruminococcaceae* (en especial aquí los géneros *Faecalibacterium* y *Subdoligranulum*) [Tabla 7]. Esto es importante, ya que se ha descrito a *Faecalibacterium* como un género antiinflamatorio que secreta metabolitos capaces de bloquear la activación de NF-kB, un mediador celular proinflamatorio que está implicado en CCR (Sokol et al. 2006; Huang et al. 2017; Han et al. 2016). De manera similar, la familia de *Christensenellaceae* se ha asociado con efectos beneficiosos en el huésped, como un menor riesgo de obesidad (Goodrich et al. 2014).

En el filo *Actinobacteria*, la cohorte de GOS-Lu mostró un aumento, debido principalmente a la familia *Bifidobacteriaceae* y especialmente al género *Bifidobacterium*, que se asocian a beneficios en la salud, incluida la protección contra afecciones proinflamatorias y contra el CCR [Tabla 6 y Figura 40]. La protección frente al CCR está asociada en este caso a la supresión de la vía proinflamatoria dependiente de NF-kB (Roller, Pietro Femia, et al. 2004; Paveljšek et al. 2018; Celiberto et al. 2017; Kim et al. 2010).

Finalmente, dentro del filo *Proteobacteria* se redujeron las poblaciones del género *Desulfovibrio* (familia *Desulfovibrionaceae*) en la cohorte de GOS-Lu [Tabla 7]. La presencia de esta bacteria mucinolítica está asociada a la inducción de apoptosis en la mucosa del colon de modelos *in vitro* y a cambios proinflamatorios en pacientes con CU, como la disminución de la sulfatación de mucina (Coutinho et al. 2017; Lennon et al. 2014). Además, este género está asociado a niveles elevados de daño a nivel de mucosa, causados por la reducción del grosor de la barrera de mucina, que en condiciones normales actúa como protección natural frente a los procesos proinflamatorios inducidos por la microbiota luminal (Song et al. 2018).

Sin embargo, en este modelo animal, *Bilophila wadsworthia* (otro miembro de la familia *Desulfovibrionaceae*) aumentó en la cohorte de GOS-Lu. Esta especie está asociada normalmente a un efecto proinflamatorio, aunque parece ser que esto requiere la presencia de niveles bajos de la interleucina antiinflamatoria IL-10, como los encontrados en ratones mutados para IL-$10^{-/-}$ en la mucosa del colon (Rennick et al. 1997; Devkota & Eugene B Chang 2015; Devkota et al. 2012). Por lo tanto, en un modelo animal de ratas silvestres como

las de este trabajo, el efecto proinflamatorio de *B. wadsworthia* podría atenuarse a diferentes niveles en la mucosa intestinal, ya que en este caso los niveles de IL-10 son normales.

En base a estos resultados, se puede deducir que la adición del prebiótico GOS-Lu a la dieta permitió disminuir los tumores de colon (57,5% de reducción), un efecto que pudo atribuirse principalmente a un aumento en las concentraciones intestinales de propionato. Este SCFA posee propiedades antitumorales (inducción de apoptosis en células de CCR) y sus concentraciones elevadas en la cohorte GOS-Lu pueden asociarse a un aumento de poblaciones bacterianas descritas como buenas productoras de propionato, como es el caso de *Bacteroides*, *Paraprevotella* (ambos géneros del filo *Bacteroidetes*) y *Phascolarctobacterium* (un género de *Firmicutes*).

Además, la administración de GOS-Lu puede asociarse aquí a una reducción de las poblaciones de bacterias proinflamatorias, como *Desulfovibrio* (un género del filo *Proteobacteria*), pero especialmente con la mayor abundancia de géneros bacterianos con propiedades antiinflamatorias y antitumorales, como es el caso de *Bifidobacterium* (un género del filo *Actinobacteria*) y de *Faecalibacterium* (un género del filo *Firmicutes*). En base a estos resultados, el compuesto GOS-Lu puede describirse como un prebiótico con efectos protectores contra el inicio y la progresión del CCR en este modelo animal, lo que abre el camino a su amplio uso en poblaciones humanas como nutracéutico.

Además, con el fin de demostrar la actividad de los principales SCFAs (propionato y butirato) determinados en las muestras cecales de este estudio, se realizaron ensayos sobre tres líneas celulares de CCR (HCT116, HT29 y T84) con los mismos. Los ensayos de viabilidad celular con butirato mostraron gran actividad en las tres líneas celulares de CCR [Figura 43], siendo más activo en la línea HCT116 [Tabla 8], que es la única de las tres líneas celulares de CCR ensayadas que no posee mutado el gen TP53. En las células control BHK21 (fibroblastos) se observó una cierta resistencia frente al butirato, necesitándose concentraciones más elevadas que en las otras tres líneas celulares para llegar a la CI_{50} (8,6 veces mayor que en HCT116, 5,32 veces mayor que en HT29 y 3,04 veces mayor que en T84) [Tabla 8]. Estos resultados mostraron cierta especificidad del butirato por las líneas celulares tumorales frente a los fibroblastos normales.

Los ensayos de viabilidad celular con propionato mostraron una mayor actividad en la línea HCT116 que en HT29 y una resistencia elevada en la línea tumoral metastásicaT84,

necesitándose aquí concentraciones 10 veces superiores respecto a las otras dos líneas celulares tumorales [Figura 42]. Este compuesto mostró una menor actividad que el butirato, necesitándose concentraciones más elevadas que éste para producir la misma reducción de la viabilidad en cultivos de CCR [Figura 44].

Las concentraciones de SCFAs que mostraron actividad antitumoral, salvo en el caso del propionato frente la línea celular T84 (muy elevadas), fueron concentraciones totalmente fisiológicas, del orden de 0,9 a 7 mM. Así, las dietas con una ingesta moderada-alta de fibra mostraron concentraciones intestinales de SCFAs próximas a 10 mM (Fleming et al. 1985; Fleming et al. 1983), que por tanto son mucho mayor que las ensayadas para estos dos SCFAs *in vitro*.

En estos estudios *in vitro* frente a líneas tumorales de CCR se observó que estas reducciones de la viabilidad eran debidas a una inducción de apoptosis mediada por estos compuestos [Figura 45]. El principal mecanismo de acción antitumoral descrito para los SCFAs es el bloqueo de la histona deacetilasa en el núcleo de las células tumorales, lo que provoca cambios transcripcionales en genes con actividad proapoptótica como BAK y TP21 (Donohoe et al. 2012; Fernández et al. 2015). Las líneas celulares HT29 y T84 mostraron mayor resistencia al tratamiento que la línea HCT116, debido a las diversas mutaciones que poseen [Tabla 3], entre ellas la del supresor tumoral TP53, que regula a TP21, uno de los principales mediadores de la actividad de los SCFAs.

Estos efectos sobre las líneas celulares se completaron con el estudio del ciclo celular. Así, en la línea tumoral HCT116 tratada con SCFAs, el ciclo celular quedó bloqueado en la fase S [Figura 46], probablemente debido a que esta línea tiene menos mutaciones en genes (como TP53) involucrados en puntos de control de la división celular (Zeng et al. 2017; Kim et al. 2004). Las otras dos líneas celulares utilizadas poseen mutados varios genes reguladores del ciclo celular [Tabla 3], por lo que los SCFAs actuaron aquí con menos eficiencia y el bloqueo en estas líneas fue producido en una fase diferente, la G1/G2. Este bloqueo está mediado por TP21, con la producción de ciclinas (cdks), que van a realizar este bloqueo del ciclo celular en fases tempranas (Hinnebusch et al. 2002).

En estos experimentos se observó por tanto que las concentraciones fisiológicas de SCFAs (especialmente en el caso de butirato) son capaces de reducir la viabilidad de las células de CCR, pero no la de los fibroblastos control, mediante la inducción de apoptosis por vías de

señalización mediadas por TP21 y BAK. El uso de propionato y butirato puede llegar a ser un tratamiento adyuvante prometedor frente a este cáncer, ya que los compuestos quimioterápicos usados en el tratamiento de este tipo de neoplasia generan multitud de efectos secundarios y resistencias (Marin et al. 2012; Housman et al. 2014).

5.4. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR inducido químicamente

Para este estudio se fabricaron dos alimentos cárnicos (chorizo y jamón cocido), limitando el contenido lipídico (8%), y sin la adición de conservantes (exceptuado pimentón dulce, sal y ajo). Además, el ahumado, en el caso de los chorizos, se realizó por métodos novedosos de fricción de madera a baja temperatura para evitar la presencia de benzopirenos, generándose así unos productos cárnicos procesados más saludables. Estos alimentos se convirtieron en funcionales mediante la adición de inulina (15,8% en chorizo y 10% en jamón cocido) reduciéndose aún más el contenido lipídico total, ya que ésta reemplaza al tocino utilizado en la preparación del chorizo.

Las ratas se agruparon en este caso en tres cohortes (pienso, cárnico control y cárnico funcional), reuniendo en una única cohorte así tanto el chorizo y el jamón control como sus versiones funcionales, para ganar potencia estadística, ya que no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de alimentos (chorizo y jamón cocido). Los tumores del colon se indujeron de nuevo químicamente mediante dos dosis de AOM y dos períodos de DSS, para potenciar el efecto del AOM con una fase de inflamación aguda. De las 50 ratas iniciales del experimento, fallecieron dos de los grupos control en las primeras semanas (pienso 10 y jamón control 7), debido a patologías adquiridas desde el nacimiento (menor peso corporal de partida). Además, tras la primera administración de DSS fallecieron otros dos animales (chorizo funcional 6 y jamón control 6) a causa de un sangrado rectal intenso causado por una CU severa.

Tras las 20 semanas de experimentación, las 46 ratas que sobrevivieron se sacrificaron y se analizaron diferentes parámetros histológicos y bioquímicos, como el nivel de triacilglicéridos en sangre, el peso del ciego, las placas de Peyer hiperplásicas en intestino delgado, el número de tumores y la extensión colónica afectada, la producción de SCFAs en heces de ciego y la microbiota intestinal.

Los niveles de triacilglicéridos en plasma sanguíneo disminuyeron significativamente en la cohorte de cárnico funcional (110 ± 5,7 mg/dL) respecto a la cohorte de pienso (172,1 ± 22,1 mg/dL) y sufrieron un descenso no significativo frente a la cohorte de cárnico control (147 ± 13,2 mg/dL, p-valor de 0,06) [Figura 48]. Estos resultados son positivos, ya que el aumento del contenido lipídico en el sistema circulatorio está asociado a problemas cardiovasculares, obesidad, fallos renales, diabetes, inflamación mediada por macrófagos, etc. (Goldberg 2018; Kang et al. 2015; Scordo & Pickett 2017). El descenso de estos niveles en la cohorte funcional se correlaciona con otros estudios donde se ha observado que el consumo de prebióticos, como la inulina y los fructooligosacáridos, reducen los niveles de triglicéridos sanguíneos entre un 20 y un 30% (Pereira & Gibson 2002).

El peso del ciego aumentó significativamente en la cohorte funcional (12,4 ± 0,5 g) respecto a la cohorte de pienso (6,3 ± 0,4 g) y a la de cárnico control (5,1 ± 0,2 g) [Figura 49]. Este hecho corroboró el efecto prebiótico de la inulina, que no puede ser digerida a lo largo del tracto gastrointestinal, fermentándose en el ciego por medio de la microbiota intestinal. Este órgano funciona como una especie de biorreactor intestinal donde la microbiota fermentadora va a multiplicarse en presencia de sustratos prebióticos, aumentando así su tamaño (Cummings et al. 2001; Xiao et al. 2015).

El número de placas de Peyer hiperplásicas del intestino delgado disminuyó significativamente en la cohorte funcional (9,8 ± 0,9) respecto a la de cárnico control (17,4 ± 1,1). También se observó un descenso en el número respecto a la cohorte de pienso (14,1 ± 1,6) [Figura 50]. Las placas de Peyer son parte del tejido linfoide, y están formadas por folículos rodeados de linfocitos T, capaces de desencadenar una respuesta inmune al interaccionar con toxinas, patógenos o células cancerígenas, provocándose entonces el crecimiento macroscópico de estos tejidos linfoides (Bailey et al. 2001; Mishra et al. 2014). La cuantificación de estas placas nos permite así describir de forma indirecta el estado inflamatorio de cada animal.

En la cohorte funcional el número de tumores sufrió una disminución significativa de un 49,9% respecto a la cohorte de cárnico control. La disminución en el número de tumores también se observó con respecto a la cohorte de pienso, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa [Figura 51A]. Estos datos iban parejos a la extensión total de la mucosa del colon afectada por tumores, ya que la cohorte de cárnico funcional mostró un 56,9% y un

59% menos de extensión afectada que en la cohorte de pienso y cárnico control respectivamente [Figura 51B]. Estos efectos están de acuerdo con otros estudios que habían observado un efecto protector de la inulina frente a la formación de CCR (Moen et al. 2016; Qamar et al. 2016).

En cuanto a la concentración de SCFAs en las heces del ciego, en la cohorte funcional se produjo un importante aumento en el propionato respecto a las otras dos cohortes (del 51,8% frente a cohorte cárnico control y 72,6% frente a la de pienso) [Figura 52A] y un aumento significativo de la concentración de butirato respecto a la cohorte de cárnico control (del 39,1%) [Figura 52B]. Los SCFAs son los principales productos de la fermentación prebiótica, siendo el butirato y el propionato dos compuestos con grandes propiedades antitumorales en CCR, como ya se ha descrito (Fernández et al. 2016; Yang & Yu 2018).

Tras los análisis histológicos, se realizó la metagenómica del ARN 16S de las heces del ciego intestinal se observaron aquí diferencias en todos los taxones entre las diferentes cohortes estudiadas. En la cohorte funcional se observó un incremento del 67.7% y del 43,9% respecto a la cohorte de pienso y de cárnico control respectivamente del filo *Bacteroidetes* y una disminución del 49,1% y del 36,7% respectivamente del filo *Firmicutes* [Tabla 9], dando lugar a un ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* mucho más bajo que en el resto de cohortes (0,8 frente a 6,7 en pienso y 2,7 en chorizo control) [Figura 53], un dato positivo, ya que unos niveles elevados de *Firmicutes* generalmente se relacionan con enfermedades asociadas a inflamación, como obesidad o diabetes (Ley et al. 2005; Ley et al. 2006). En la cohorte funcional el aumento de *Bacteroidetes* y la disminución de *Firmicutes* estaba en concordancia con otros estudios donde se habían observado los mismos cambios en dietas ricas en almidón resistente o inulina, así como un aumento del filo *Proteobacteria,* que también ocurre en nuestro caso (Ferrario et al. 2017; Van den Abbeele et al. 2013; Reygner et al. 2016).

A nivel de familias se observó una composición diferencial entre las tres cohortes. La cohorte de pienso mostró mayor similitud con la cohorte de cárnico control, ya que las tres familias predominantes fueron las mismas (*Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae* y *Porphyromonadaceae*) y difirieron de las tres más frecuentes en la cohorte funcional (*Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* y *Porphyromonadaceae*). Estas diferencias se observan en el dendrograma [Figura 54], donde los animales pertenecientes a la cohorte de pienso y a la

cohorte de cárnico control se muestran agrupados en el brazo izquierdo del mismo. Sin embargo, los animales de la cohorte funcional están agrupados en el brazo derecho, a excepción de tres integrantes de cárnico control (CC1, CC3 y JC2) que están agrupados en una subdivisión del lado derecho, mostrando más parecido con la composición de las familias de la cohorte funcional [Figura 54]. Las diferencias homogéneas entre las cohortes a nivel de familias nos muestran que la suplementación con inulina fue capaz de modular la microbiota intestinal respecto a sus controles.

El aumento tan elevado del filo *Bacteroidetes* en la cohorte funcional se debió principalmente al incremento en las familias *Bacteroidaceae* y *Prevotellaceae* y en menor medida al género *Parabacteroides* [Tabla 10 y Figura 54]. Estos taxones están catalogados como productores de propionato (Polansky et al. 2015), por lo que su incremento en la cohorte funcional puede correlacionarse con el aumento de los niveles de propionato encontrado en sus ciegos [Figura 52].

El gran incremento observado en la familia *Prevotellaceae* en el caso de la cohorte funcional está de acuerdo con otros estudios, donde se ha detectado un incremento de esta familia en el caso de dietas ricas en fibra, debido a la capacidad sacarolítica de los géneros y especies que la integran, generando SCFAs (Ferrario et al. 2017; Koleva et al. 2012; Van den Abbeele et al. 2018; Voreades et al. 2014). Esta familia *Prevotellaceae* presenta una relación controvertida con el CCR, ya que la mayoría de investigaciones observan una reducción de esta familia en casos de CCR (Weir et al. 2013; Zackular et al. 2013; Sun & Kato 2016; Zhu et al. 2014), mientras que su aumento está correlacionado con dietas ricas en frutas y verduras (fibra). Sin embargo, otros estudios muestran el efecto contrario, con concentraciones elevadas de la familia *Prevotellaceae* en casos de CCR (Chen et al. 2012) o en el tejido tumoral (Sivaprakasam et al. 2016), aunque algunos autores asocian este incremento a una mayor supervivencia tras la cirugía en CRC (Flemer et al. 2018).

La familia *Rikenellaceae* (filo *Bacteroidetes*) mostró una reducción en la cohorte funcional, correlacionándose con algunos estudios donde se observa una mayor presencia de la misma en pacientes con CCR y un incremento a medida que se desarrolla el tumor, pudiendo tener un efecto intensificador de los procesos inflamatorios (Sun & Kato 2016; Dai et al. 2018).

La reducción del filo *Firmicutes* en la cohorte funcional se debió principalmente a la menor presencia de la familia *Lachnospiraceae*. Esta reducción en esta familia ha sido descrita tras

la ingesta de prebióticos como la inulina (Catry et al. 2018; Sanchez et al. 2014). Dentro de esta familia, el principal descenso a nivel de género se observó en *Ruminococcus*, y en concreto en el caso de la especie *R. gnavus.* Estos datos son positivos, ya que esta especie posee factores de virulencia, está asociada a bacteriemias (Toscano et al. 2017), y aparece en niveles elevados en pacientes con EII, incrementando en ellos su sintomatología (Hall et al. 2017). Además, *R. gnavus* está relacionada con alergias o procesos inflamatorios (Chua et al. 2018).

Pese a este descenso en la familia *Lachnospiraceae* en general, el género *Blautia* aumentó significativamente en la cohorte funcional. Este género se asocia con la ingesta de fibras prebióticas, por su capacidad para fermentarlas (Tannock et al. 2014; Neyrinck et al. 2016). Además se observa una disminución de este género en pacientes con CCR (Chen et al. 2012). El género *Blautia* tiene la capacidad de fermentar fibras, pero también actúa a nivel del sistema inmune, con acción antinflamatoria (Jenq et al. 2015; Bhattacharyya et al. 2018).

Otra familia que sufrió una gran reducción de sus poblaciones en el filo *Firmicutes* fue *Clostridiaceae,* a la que pertenece el género *Clostridium,* con numerosas especies patógenas. Dietas ricas en prebióticos han causado reducciones en las poblaciones de esta familia (Palaria et al. 2012; S. Zhang et al. 2017).

La presencia de la familia *Ruminococcaceae* (*Firmicutes*) se redujo significativamente en la cohorte funcional respecto a la de cárnico control. Está disminución estaba asociada a la ingesta de inulina y como consecuencia una reducción en la producción de ácidos biliares secundarios en la que participa activamente esta familia (Ferrario et al. 2017; Catry et al. 2018). En estudios clínicos se ha visto una mayor abundancia de esta familia en pacientes de CCR, relacionándose con las etapas iniciales de esta enfermedad (Sun et al. 2017). Además dentro de esta familia, en la cohorte funcional se observó la ausencia total del género *Acetanaerobacterium*, asociado con la producción de enterolactonas (asociadas a adiposidad y síndrome metabólico) (W. Zhang et al. 2017).

Pese a la gran reducción de los valores del filo *Firmicutes* en la cohorte funcional, se observó un aumento en dos familias de dicho filo, *Erysipelotrichaceae* y *Acidaminococcaceae*. La familia *Erysipelotrichaceae* ha mostrado grandes aumentos de sus poblaciones en otros estudios con dietas ricas en fibras prebióticas como la inulina (Ferrario et al. 2017; Catry et al. 2018; J. Yang et al. 2013), asociándose a aumentos en la producción de SCFAs (Van den

Abbeele et al. 2018). Sin embargo, otros autores han detectado un aumento de esta familia en casos de CCR (pero no en EII) y la han vinculado a procesos inflamatorios (Kaakoush 2015). Por otro lado, el aumento de la familia *Acidaminococcaceae* en la cohorte cárnico funcional se debió principalmente al género *Phascolarctobacterium*¸ que está descrito como un productor de SCFAs a partir de prebióticos, en especial de propionato por la vía del succinato (Zhang et al. 2018). Este aumento de *Phascolarctobacterium* se correlaciona en esta cohorte de cárnicos funcionales perfectamente con el aumento de SCFAs observado en la misma [Figura 52]. Además, algunos autores atribuyen a este género efectos antiinflamatorios, como la reducción de los niveles plasmáticos de la proteína de unión al lipopolisacárido y de la proteína C-reactiva (Citronberg et al. 2018).

Respecto a la presencia del filo *Proteobacteria*, se observó un ligero aumento de la misma en la cohorte funcional, la cual se correlacionó principalmente con un aumento de los géneros *Parasutterella* y *Gemmiger* [Tabla 10]. El género *Parasutterella* está asociado a fermentación prebiótica y a beneficios para la salud (Y. Chen et al. 2017). Se ha descrito un descenso en los niveles de *Parasutterella* en pacientes obesos o con inflamación del hipotálamo, por lo que se atribuyen a este género efectos antiinflamatorios (Kreutzer et al. 2017). En cambio, hay posiciones enfrentadas respecto al género *Gemmiger,* ya que por un lado hay estudios que muestran un aumento de este género en pacientes con EC y lesiones inflamatorias recurrentes, por lo que le atribuyen (en concreto a la especie *G. formicilis*) efectos inflamatorios y empeoramiento de la sintomatología propia de la enfermedad (Toscano et al. 2017). Sin embargo, otros estudios asocian un aumento de este género con la ingesta de inulina (Aguirre et al. 2016) y le atribuyen efectos de estimulación inmunológica frente a la CU y respuesta anticancerígena (Chaput et al. 2017).

En la cohorte de cárnicos funcionales se observó una disminución de las poblaciones de dos géneros dentro del filo *Proteobacteria*, en concreto *Desulfovibrio* y *Bilophila* [Tabla 10]. El género *Desulfovibrio* está relacionado con bacterias comensales reductoras del sulfato que pueden contribuir a la inflamación de la mucosa a través de la producción de sulfuro de hidrógeno, observándose un aumento de estas bacterias en casos de CCR (Thomas et al. 2016). Afortunadamente, dietas ricas en fibras prebióticas permiten disminuir sus poblaciones, minimizando los efectos que producen estas bacterias, como la degradación de mucina (reduciendo la protección del epitelio intestinal), la producción de lipopolisacárido y la estimulación de la respuesta inflamatoria (Zhang et al. 2018; Song et al. 2018; Deng et

al. 2017). El género *Bilophila* es más frecuente en pacientes con CCR, debido a la producción de H_2S y a la presencia de ácidos biliares secundarios (frente a los que estas bacterias son resistentes) (Thomas et al. 2016). Las dietas ricas en prebióticos causan reducciones en la producción de ácidos biliares y disminuyen el pH intestinal, creando un entorno menos favorable para el crecimiento de *Bilophila* (Vandeputte et al. 2017).

Por último, cabe destacar la ausencia total en la cohorte de cárnicos funcionales del filo *Synergistetes* que se encontraba representado en la cohorte de cárnicos control. Este filo está asociado a enfermedades periodontales, produciendo inflamación y destrucción del tejido gingival (Hiranmayi et al. 2017).

En resumen, la formulación de alimentos cárnicos funcionales con inulina ha permitido generar un efecto preventivo frente a CCR, observándose una modulación de la microbiota intestinal hacia taxones con actividad antiinflamatoria y fermentativos de estas fibras, produciéndose SCFAs en mayores cantidades, unos potentes antitumorales. Estos alimentos cárnicos funcionales pueden mejorar la salud de la población, especialmente en zonas con elevado consumo de productos cárnicos.

5.5. Estudio de alimentos cárnicos funcionales con inulina para la prevención de CCR en un modelo de CCR genético

Se realizó un estudio de prevención de CCR en un modelo genético con el fin de corroborar los efectos obtenidos en el estudio previo de alimentos cárnicos funcionales con inulina en un modelo de CCR inducido químicamente. Se utilizó para este fin la cepa de rata (F344-Apc^{m1Kyo}), que tiene mutado el gen *apc* en una zona que produce poliposis adenomatosa familiar atenuada (Irving et al. 2014b). En estas ratas no se produce CCR de forma espontánea en un corto espacio de tiempo, pudiendo vivir 1,5 años sin que aparezcan tumores en el colon, por lo que se les potenció la predisposición inicial genética con dos dosis intraperitoneales de AOM y un tratamiento de DDS al 3% en el agua de bebida durante una semana. En este caso no se administró una segunda semana de tratamiento con DSS para evitar que la inducción del CCR fuese demasiado potente y falleciesen las ratas antes de finalizar el experimento.

En este estudio se utilizó un alimento cárnico (chorizo) bajo en grasas, sin benzopirenos, ni conservantes ni colorantes añadidos (con la salvedad de pimentón dulce, sal y ajo). El

alimento funcional se consiguió añadiendo un 15,8% de inulina en sustitución de tocino en este chorizo.

Las ratas se agruparon en 4 cohortes de 10 animales cada una (pienso, chorizo control, chorizo funcional y chorizo funcional con probióticos), 8 de las cuales en cada cohorte recibieron el tratamiento de AOM y DSS y las otras 2 sirvieron de control absoluto sin la potenciación del CCR de base genética. A la cohorte de chorizo funcional con probióticos se administró periódicamente, a través de una sonda orofaríngea (una vez por semana los primeros 45 días y posteriormente una vez cada 15 días), dos especies bacterianas, *Phascolarctobacterium succinatutens* (familia *Acidaminococcaceae*, *Firmicutes*) y *Parasutterella excrementihominis* (familia *Sutterellaceae*, *Proteobacteria*). Se escogieron estas dos bacterias debido a los resultados obtenidos en los anteriores experimentos de esta tesis, en los que se observó un ligero incremento de ambas en el grupo de cárnicos funcionales. Este incremento se consideró entonces un efecto beneficioso ya que *P. succinatutens* genera SCFAs a partir de succinato y tiene propiedades antiinflamatorias (Zhang et al. 2018; Citronberg et al. 2018), y *P. excrementihominis* fermenta prebióticos y posee también efectos antiinflamatorios (Y. Chen et al. 2017).

Al monitorizar el peso de estos animales a lo largo de las 20 semanas de experimentación se observó que en las primeras semanas las tres cohortes alimentadas con chorizo (cohorte control, funcional y funcional con probióticos) no crecieron a un ritmo normal e incluso redujeron su peso tras el tratamiento con AOM [Figura 57]. La falta de crecimiento en estas primeras semanas se debió probablemente a una adaptación de los animales a la matriz alimentaria, ya que al principio no ingerían las dosis de alimento estandarizado por día, aunque con el paso del tiempo fueron incrementando su ingesta. Este hecho es llamativo, ya que las ratas utilizadas en experimentos previos ya descritos con estos tipos de alimentos, los animales siempre se adaptaron muy bien a las matrices cárnicas, incluso prefiriéndolas respecto al pienso.

En la primera semana experimental, una rata control absoluto de la cohorte chorizo control (rata número 9) falleció por problemas ajenos a este estudio. Asimismo, durante las primeras semanas experimentales, una rata de la cohorte de chorizo funcional (rata número 7) falleció por problemas asociados al tratamiento de inducción de CU por medio de DSS. En la cohorte de chorizo funcional con probióticos fallecieron 4 animales (ratas número 1, 8, 5 y 10), sin

manifestarse daños digestivos relacionados con CU ni CCR. En alguno de los cadáveres de estos animales se observaron ligeras hemorragias en el tracto respiratorio, por lo que los fallecimientos se pudieron deber en parte al método de administración del suplemento probiótico mediante cánula orofaríngea, pudiendo haberse producido sepsis o neumonías en el tracto respiratorio.

Tras las 20 semanas experimentales se sacrificaron las 36 ratas que sobrevivieron y se analizaron diferentes parámetros histológicos como peso del ciego, el número de placas de Peyer hiperplásicas en el intestino delgado, el número de tumores y la extensión afectada del colon, la producción de SCFAs en el ciego y el análisis de la microbiota intestinal.

El tamaño del ciego aumentó de forma significativa en las dos cohortes alimentadas con chorizo funcional (cohorte funcional y cohorte funcional con probióticos) respecto a la cohorte de pienso y la de chorizo control, no observándose diferencias en la media de los pesos del ciego entre las dos cohortes funcionales [Figura 58]. El incremento del peso de estos órganos se debió a la fermentación de la inulina en el mismo, lo cual fomentó probablemente el crecimiento de taxones bacterianos capaces de degradar este prebiótico, aumentando de forma indirecta el tamaño de este órgano (Xiao et al. 2015; Cummings et al. 2001).

En el número de placas de Peyer hiperplásicas del intestino delgado se produjo un descenso significativo en las dos cohortes funcionales (9,7 ± 0,6 en chorizo funcional y 8,8 ± 0,5 en chorizo funcional con probióticos) respecto a la cohorte de chorizo control (13,8 ± 0,9) [Figura 59]. Como ya se ha comentado, las placas de Peyer forman parte del sistema inmune y responden frente a diferentes alteraciones en el intestino delgado causadas por toxinas, patógenos, células cancerígenas, etc. (Mishra et al. 2014; Bailey et al. 2001). Estos resultados nos indican que la cohorte de chorizo funcional tiene una menor alteración de parámetros inmunológicos a nivel del sistema digestivo, un menor estado inflamatorio.

En cuanto al número de tumores en la mucosa del colon, la cohorte más afectada fue la de chorizo control (30,1 ± 6,8 pólipos), mientras que en las otras tres cohortes se observó un descenso significativo de los tumores respecto a ésta (9,8 ± 6,3 en pienso; 9,8 ± 1,6 en chorizo funcional; y 6,2 ± 3,2 en chorizo funcional con probióticos) [Figura 60A]. Cabe destacar la ausencia de tumores en dos animales de la cohorte de chorizo funcional con probióticos, hecho inédito hasta el momento en nuestros estudios de prevención de CCR. En

cuanto a la extensión total tumoral ocurrió algo similar, ya que la cohorte de chorizo control resultó ser la más afectada (433,1 ± 112,2 mm^2) disminuyendo significativamente este valor en las otras tres cohortes (88,5 ± 25,5 mm^2 en pienso; 65,8 ± 21,7 mm^2 en chorizo funcional; y 34,9 ± 15,5 mm^2 en chorizo funcional con probióticos) [Figura 60B]. Se observó una menor extensión tumoral en la cohorte de chorizo funcional con probióticos, siendo un 60,5% menor que en la cohorte de pienso y un 46,9% menor que en la cohorte de chorizo funcional. Estos datos no llegaron a ser estadísticamente significativos debido a la falta de potencia estadística por el bajo número de animales supervivientes de esta cohorte, aunque la tendencia mostró unos resultados prometedores en cuanto a la potenciación del efecto protector de los probióticos sobre el inicial de la inulina.

En cuanto a las concentraciones de SCFAs producidos en el ciego, se observó un incremento de los dos principales SCFAs en las dos cohortes funcionales [Figura 61]. El propionato se incrementó en los dos grupos funcionales de forma similar (1,8 ± 0,2 mM en chorizo funcional y 1,7 ± 0,3 mM en chorizo funcional con probióticos) respecto a las otras dos cohortes control (0,7 ± 0,09 mM en pienso; 0,7 ± 0,02 mM en chorizo control). El butirato también se incrementó significativamente en las cohortes funcionales (1,3 ± 0,2 mM en chorizo funcional y 2 ± 0,2 mM en chorizo funcional con probióticos) respecto a las cohortes control (1 ± 0,1 mM en pienso; 0,8 ± 0,08 mM en chorizo control). El incremento de butirato en un 35% en la cohorte de chorizo funcional con probióticos respecto a la cohorte funcional no llegó a ser estadísticamente significativo por falta de potencia estadística. En las cohortes funcionales se redujo la producción de valérico y hexanoico y en la cohorte funcional con probióticos aumentaron los valores de isobutírico.

Este aumento de propionato y butirato se correlaciona perfectamente con la fermentación de inulina por parte de la microbiota intestinal y también con el efecto antitumoral observado en los animales de las dos cohortes alimentadas con chorizo funcional, ya que como se ha comentado en otros apartados, estos dos SCFAs producen cambios transcripcionales en las células de CCR, induciendo en las mismas apoptosis (Fernández et al. 2016; Yang & Yu 2018).

Los análisis de metagenómica del ARN ribosomal 16S permitió detectar diferencias de composición de la microbiota intestinal de cada cohorte. En primer lugar, se van a comparar las cohortes de pienso, chorizo control y chorizo funcional. Posteriormente se compararán

la cohorte funcional y la cohorte funcional con probióticos, para identificar las diferencias causadas por la administración de probióticos.

A nivel de filos, se observó en la cohorte chorizo funcional un incremento del 46,8% y del 44,3% respecto a la cohorte de pienso y de chorizo control respectivamente de *Bacteroidetes*; del 87,3% y del 45,3% respectivamente de *Proteobacteria* y una disminución del 53,8% y del 45,3% respectivamente de *Firmicutes* [Tabla 11]. En esta cohorte de chorizo funcional, la relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* fue mucho más baja que en las otras dos (pienso y chorizo control) [Figura 62], lo que se considera un efecto positivo (Ley et al. 2005; Ley et al. 2006). El cambio de composición de los tres grandes filos en la cohorte chorizo funcional es lógico teniendo en cuenta los procesos fermentativos ya descritos asociados a dietas ricas en fibras prebióticas o almidones resistentes (Reygner et al. 2016; Ferrario et al. 2017; Van den Abbeele et al. 2013).

La composición de la microbiota a nivel de familias fue homogénea en las dos cohortes control (pienso y chorizo control), siendo las familias más representativas *Lachnospiraceae, Porphyromonadaceae* y *Clostridiaceae;* y difiriendo de la cohorte funcional, donde las familias más representativas fueron *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Desulfovibrionaceae* y *Bacteroidaceae* [Figura 63].

El aumento del filo *Bacteroidetes* en la cohorte funcional se debió principalmente al aumento en las familias *Bacteroidaceae, Porphyromonadaceae* y especialmente *Prevotellaceae* [Figura 63]. En estas familias están presentes numerosos géneros relacionados con la producción de propionato (Polansky et al. 2015), lo cual se puede correlacionar con las mayores concentraciones de este SCFA detectadas en esta cohorte. El aumento de la familia *Prevotellaceae* está asociado a su capacidad fermentativa y de producción de SCFAs (Koleva et al. 2012; Van den Abbeele et al. 2018; Ferrario et al. 2017). Algunos autores asocian esta familia *Prevotellaceae* a una mayor presencia en CCR (Sivaprakasam et al. 2016; Chen et al. 2012), mientras que otros la asocian a salud, disminución de CCR y mejor supervivencia en pacientes con CCR (Zhu et al. 2014; Chen et al. 2012; Zackular et al. 2013; Weir et al. 2013; Flemer et al. 2018).

La disminución observada del filo *Firmicutes* fue debida a la reducción de las familias *Lachnospiraceae* (un 73,2% y un 68,7% frente a la cohorte de pienso y chorizo control respectivamente) y *Clostridiaceae* (un 57,9% y un 48,8% respectivamente) [Figura 64]. En

la familia *Lachnospiraceae* principalmente se redujo el género *Ruminococcus,* y en concreto la especie proinflamatoria *R. gnavus,* asociada a EII, alergias e inflamación (Chua et al. 2018; Toscano et al. 2017; Hall et al. 2017); por lo que su menor proporción fue considerada positiva. Pese a la gran reducción en los niveles de esta familia *Lachnospiraceae* en general, cuatro géneros de la misma aumentaron (*Anaerostipes*, *Blautia*, *Dorea* y *Lachnoclostridium*) [Tabla 12]. Estos géneros son conocidos fermentadores de prebióticos, generando butirato y propionato. Además, alguno de estos géneros, como *Blautia,* posee efectos antiinflamatorios (Polansky et al. 2015; Bhattacharyya et al. 2018; Jenq et al. 2015).

El descenso de la familia *Clostridiaceae* asociado a la dieta prebiótica se considera saludable, ya que algunas especies de esta familia son patógenas (Jenq et al. 2015; Bhattacharyya et al. 2018).

Pese a la disminución global del filo *Firmicutes* en la cohorte funcional, se observó que dos de sus géneros aumentaban sus poblaciones (*Faecalibacterium* y *Flavonifractor*). El género *Faecalibacterium* (familia *Ruminococcaceae*) está asociado a la producción de butirato y a estados de buena salud, ya que su presencia en niveles bajos se ha asociado con enfermedades como CU, EC y CCR (Lopez-Siles et al. 2015). Además, las especies de este género poseen capacidad antiinflamatoria, ya que son capaces de bloquear la activación de NF-κB (Huang et al. 2017; Sokol et al. 2006; Haenen et al. 2013). Por su parte el género *Flavonifractor* (familia de los *Clostridiales* no clasificados) es capaz de sintetizar diversos SCFAs como propionato y butirato (Borrelli et al. 2017; Klaring et al. 2013).

Los principales cambios en el filo *Proteobacteria* de la cohorte chorizo funcional se fueron el aumento de las familias *Sutterellaceae* y *Desulfovibrionaceae.* El aumento de la familia *Sutterellaceae* estaba asociado principalmente con el aumento de la especie *Parasutterella excrementihominis,* especie asociada a fermentación y a beneficios saludables, ya que está involucrada en procesos antiinflamatorios (Y. Chen et al. 2017; Kreutzer et al. 2017).

Dentro de la familia *Desulfovibrionaceae* se produjo un aumento de la especie *Bilophila wadsworthia,* que es una bacteria patógena oportunista, sobre todo en animales deficientes en IL-10, ya comentada en otros capítulos (Devkota et al. 2012; David et al. 2014; Yazici et al. 2017). . Dentro de la familia *Desulfovibrionaceae* se produjo un descenso en las poblaciones del género *Desulfovibrio* en la cohorte chorizo funcional. Este género es

productor de H_2S y provoca daños inflamatorios y en la barrera de la mucosa intestinal (Song et al. 2018; Zhang et al. 2018; Coutinho et al. 2017).

Finalmente, los cambios en la composición de la microbiota entre la cohorte de chorizo funcional con probióticos respecto a la cohorte de chorizo funcional no fueron los esperados, ya que no se observaron cambios significativos en las poblaciones intestinales de las dos cepas bacterianas (*Phascolarctobacterium succinatutens* y *Parasutterella excrementihominis)* administradas regularmente por vía oral. Esta ausencia de diferencias pudo deberse a problemas a la hora de la administración, como que las dos cepas no aguantasen el proceso de preparación previa (en presencia de oxígeno atmosférico), que no resistiesen los bajos niveles de pH durante el paso por el estómago de los animales hasta llegar al colon, incluso que no se asentasen en el nicho intestinal. Pese a que no aumentaron las poblaciones de estas dos bacterias en los animales de esta cohorte con probióticos, si se observó que la cohorte de chorizo funcional con probióticos producía mayores concentraciones de SCFAs en los análisis de GC-MS, mostraba un menor número de tumores (dos animales tuvieron 0 tumores) y estos tumores eran más pequeños que en el resto de las cohortes.

Con estos resultados parece que algún beneficio sí se estaba produciendo tras la administración de estas dos especies bacterianas potencialmente probióticas. En este sentido se puede hipotetizar por ejemplo que estas bacterias fueron capaces de producir metabolitos durante su crecimiento *in vitro*, y que al administrarlas al animal ejercían efectos beneficiosos sin necesidad de que la bacteria viva estuviese presente en el intestino. Podría ser un caso parecido al de la bacteria *Akkermansia muciniphila*, una bacteria beneficiosa para la salud intestinal en la que se ha visto que los efectos beneficiosos no desaparecen cuando se utiliza bacteria pasteurizada y se administra muerta a los animales de estudio (Cani & de Vos 2017).

En resumen, en este último estudio, la mayor diferencia encontrada a nivel de microbiota intestinal fue el aumento en la cohorte de chorizo funcional con probióticos de la familia *Lachnospiraceae y* del género *Anaerostipes*. *Anaerostipes* [Figura 65 y 66] es un género que se caracteriza por ser un gran productor de butirato (Cani & de Vos 2017), y que podría explicar el aumento de este SCFA en dicha cohorte [Figura 61].

Sin embargo, se requieren más estudios para llegar a comprender lo ocurrido en esta cohorte y poder comprender el efecto beneficioso frente al CCR de las dos cepas bacterianas administradas en este experimento.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La incorporación de diversos nutracéuticos, como ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), flavonoides (antocianinas) o prebióticos (inulina, GOS-Lu) a alimentos cárnicos los convierte alimentos funcionales útiles en la prevención de diversas patologías intestinales, como la CU o el CCR.
2. La presencia de estos mismos nutracéuticos induce cambios en la microbiota intestinal de los animales tratados con estos alimentos funcionales, que en varios casos se consideran cambios favorables, al reducirse las poblaciones de bacterias con carácter inflamatorio o patogénico, y aumentarse las poblaciones de otras bacterias consideradas beneficiosas.
3. El consumo de jamón ibérico de bellota con elevados niveles de ácido oleico y una buena (baja) relación ω-6/ω-3 protege frente a la CU en un modelo animal para esta enfermedad, mejorando los parámetros de crecimiento del animal, así como los histológicos, inmunológicos e inflamatorios.
4. Una alimentación basada en jamón ibérico de bellota produce un aumento de las bacterias del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal, asociado a especies con capacidad antiinflamatoria y productoras de SCFAs. Se produce en este caso además un descenso, beneficioso, de bacterias consideradas mucolíticas.
5. El consumo diario de grandes cantidades de nitratos en alimentos procesados es perjudicial, ya que estos conservantes se reducen a nitrito en el tubo digestivo, pasando a sangre y provocando problemas en el transporte de oxígeno a nivel de todos los tejidos.
6. La presencia en la microbiota intestinal de una proporción elevada de taxones bacterianos con capacidad desnitrificante, como el género *Enterococcus*, puede proporcionar una protección frente a los efectos tóxicos de estos nitratos ingeridos.
7. La incorporación de un 10% de frutos rojos (con un aporte neto de 0,1% de antocianinas) a alimentos cárnicos procesados como las salchichas, permite aumentar los niveles antioxidantes en plasma y reducir un 45,6% del número de tumores en un modelo animal de CCR.
8. La incorporación de antocianinas en alimentos cárnicos procesados modula la microbiota intestinal, reduciendo las poblaciones de la bacteria reductora de sulfito *Bilophila wadsworthia*, una especie con características proinflamatorias.

9. La ingesta del prebiótico GOS-Lu en el agua de bebida al 10% causa un incremento de las concentraciones intestinales de propionato, asociado a una disminución del 57,5% en el número de tumores en un modelo animal de CCR.
10. El prebiótico GOS-Lu es beneficioso, ya que su consumo incrementa las poblaciones intestinales de familias bacterianas relacionadas con la producción de propionato, como *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* y *Acidominococcaceae*, y otras familias moduladoras de la respuesta inmune como *Bifidobacteriaceae* y *Ruminococcaceae*. Además, este prebiótico reduce las poblaciones del género *Desulfovibrio* y de la especie *Ruminococcus gnavus*, considerados no beneficiosos.
11. El propionato y el butirato poseen una actividad citotóxica selectiva frente a líneas celulares de CCR (HCT116, HT29 y T84), a concentraciones similares a las alcanzadas en condiciones fisiológicas en dietas con fibra prebiótica. Esta acción beneficiosa se debe a la inducción de apoptosis, mediada por el bloqueo de las histonas deacetilasas y la activación de las vías de señalización mediadas por Tp21 y Bak.
12. La incorporación de inulina en alimentos cárnicos procesados (chorizo y jamón cocido) reduce hasta un 49,9% el número de tumores en la mucosa del colon, causando un aumento en la producción de SCFAs, especialmente de propionato, en un modelo animal de CCR utilizado.
13. El consumo de inulina en estos alimentos cárnicos causa un aumento de varias familias bacterianas productoras de SCFAs como *Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Erysipelotrichaceae, Acidominococcaceae* o *Sutterellaceae,* y una reducción de las poblaciones de la familia *Desulfovibrionaceae*, que tiene características proinflamatorias.
14. La ingesta de alimentos cárnicos con inulina como aditivo funcional posee beneficios similares en cuanto a la protección frente a CCR en un modelo animal genético o inducido químicamente, con similares efectos en la modulación de la microbiota intestinal.
15. La administración de *Phascolarctobacterium succinatutens* y *Parasutterella excrementihominis* junto con un alimento cárnico funcional con inulina mejora los efectos preventivos frente a CCR ejercidos por la inulina, con un descenso aún mayor en el número de tumores (cero en algunos animales) y un aumento en las concentraciones

de SCFAs. Sin embargo, no se observan diferencias en la composición de la microbiota, excepto un aumento notable en las poblaciones del género *Anaerostipes*, un productor de SCFAs.

7. BIBLIOGRAFÍA

Van den Abbeele, P. et al., 2018. Arabinoxylo-Oligosaccharides and Inulin Impact Inter-Individual Variation on Microbial Metabolism and Composition, Which Immunomodulates Human Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(5), pp.1121–1130. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29363966.

Van den Abbeele, P. et al., 2013. Different human gut models reveal the distinct fermentation patterns of Arabinoxylan versus inulin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(41), pp.9819–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028202.

Aguirre, M., Bussolo de Souza, C. & Venema, K., 2016. The Gut Microbiota from Lean and Obese Subjects Contribute Differently to the Fermentation of Arabinogalactan and Inulin. *PloS one*, 11(7), p.e0159236. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27410967.

Agus, A. et al., 2016. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. *Scientific Reports*, 6(1), p.19032. Available at: http://www.nature.com/articles/srep19032.

Alex, P. et al., 2009. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 15(3), pp.341–52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942757.

Alipour, B., Rashidkhani, B. & Edalati, S., 2016. Dietary flavonoid intake, total antioxidant capacity and lipid oxidative damage: A cross-sectional study of Iranian women. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(5), pp.566–72. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26830011.

Amos-Landgraf, J.M. et al., 2007. A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), pp.4036–4041. Available at: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611690104.

Ananthakrishnan, A.N., 2015. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(2), pp.290–298.

Asadi, K. et al., 2017. Cancer-preventive Properties of an Anthocyanin-enriched Sweet

Potato in the APCMIN Mouse Model. *Journal of cancer prevention*, 22(3), pp.135–146. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018778.

Attene-Ramos, M.S. et al., 2007. Hydrogen Sulfide Induces Direct Radical-Associated DNA Damage. *Molecular Cancer Research*, 5(5), pp.455–459. Available at: http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-06-0439.

Aureli, P. et al., 2011. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*, 63(5), pp.366–376. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661811000569.

Avram-Hananel, L. et al., 2010. E Durans Strain M4–5 Isolated From Human Colonic Flora Attenuates Intestinal Inflammation. *Diseases of the Colon & Rectum*, 53(12), pp.1676–1686. Available at: https://insights.ovid.com/crossref?an=00003453-201012000-00014.

Bailey, M. et al., 2001. Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 60(4), pp.427–35. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069394.

Barile, D. & Rastall, R.A., 2013. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), pp.214–219. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166913000116.

Barreiro-de Acosta, M. et al., 2017. Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) y de la Confederación de Asociaciones de Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (ACCU) para el manejo de los aspectos psicológicos en la enfermedad inflamator. *Gastroenterología y Hepatología*. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570517302443.

Bauer-Marinovic, M. et al., 2006. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. *Carcinogenesis*, 27(9), pp.1849–59. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597648.

Beggs, A.D. et al., 2010. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and

recommendations for management. *Gut*, 59(7), pp.975–986. Available at: http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2009.198499.

Berrino, F. et al., 2007. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCARE-4 study. *Lancet Oncology*, 8(9), pp.773–783.

Bhalla, A. et al., 2013. Molecular Diagnostics in Colorectal Carcinoma. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33(4), pp.835–859. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271213000772.

Bhattacharyya, A. et al., 2018. Graft-Derived Reconstitution of Mucosal-Associated Invariant T Cells after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 24(2), pp.242–251. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879117307589.

Biddle, A. et al., 2013. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*, 5(3), pp.627–640. Available at: http://www.mdpi.com/1424-2818/5/3/627.

Bode, L., 2006. Recent Advances on Structure, Metabolism, and Function of Human Milk Oligosaccharides. *The Journal of Nutrition*, 136(8), pp.2127–2130. Available at: https://academic.oup.com/jn/article/136/8/2127/4664766.

Borges-Canha, M. et al., 2015. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: A systematic review. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 107(11), pp.659–671.

Borrelli, L. et al., 2017. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Scientific reports*, 7(1), p.16269. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29176587.

Borton, M.A. et al., 2017. Chemical and pathogen-induced inflammation disrupt the murine intestinal microbiome. *Microbiome*, 5(1), p.47. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28449706.

Boussenna, A. et al., 2016. Dietary Supplementation with a Low Dose of Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract Prevents Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Rats.

Journal of Medicinal Food, 19(8), pp.755–758. Available at: http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2015.0124.

Boutron, M.C. et al., 1996. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case--control study. *British journal of cancer*, 74(1), pp.145–51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8679449.

Bouvard, V. et al., 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncology*, 2045(15), pp.1–2.

Brosens, L.A. et al., 2011. Juvenile polyposis syndrome. *World journal of gastroenterology*, 17(44), pp.4839–44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22171123.

Brosens, L.A.A. et al., 2016. Pathology and Genetics of Syndromic Gastric Polyps. *International Journal of Surgical Pathology*, 24(3), pp.185–199. Available at: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1066896915620013.

Bruce, W.R. & Corpet, D.E., 1996. The colonic protein fermentation and insulin resistance hypotheses for colon cancer etiology: experimental tests using precursor lesions. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 5 Suppl 2, pp.41–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9061294.

Burisch, J. & Munkholm, P., 2013. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Current opinion in gastroenterology*, 29(4), pp.357–62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23695429.

Calder, P.C., 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), pp.469–484. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198114001656.

Calder, P.C., 2008. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(8), pp.885–897. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200700289.

Canfora, E.E., Jocken, J.W. & Blaak, E.E., 2015. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), pp.577–591.

Available at: http://www.nature.com/articles/nrendo.2015.128.

Cani, P.D. et al., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58(8), pp.1091–103.

Cani, P.D. & de Vos, W.M., 2017. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of Akkermansia muciniphila. *Frontiers in microbiology*, 8, p.1765. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018410.

Cantos, E. et al., 2003. Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (Quercus spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), pp.6248–6255. Available at: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf030216v.

Cardelle-Cobas, A. et al., 2009. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *Journal of Dairy Research*, 76(03), p.317. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029909004063.

Carroll, M.R.R., Seaman, H.E. & Halloran, S.P., 2014. Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clinical Biochemistry*, 47(10–11), pp.921–939. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000991201400188X.

Cascella, M. et al., 2018. Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): An overview on the current state of knowledge. *Infectious Agents and Cancer*, 13(1), pp.1–8.

Castiglione, F. et al., 2012. Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the "hygiene hypothesis": A case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. *Journal of Crohn's and Colitis*, 6(3), pp.324–329. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2011.09.003.

Catry, E. et al., 2018. Targeting the gut microbiota with inulin-type fructans: preclinical demonstration of a novel approach in the management of endothelial dysfunction. *Gut*, 67(2), pp.271–283. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28377388.

Celiberto, L.S. et al., 2017. Effect of a probiotic beverage consumption (Enterococcus

faecium CRL 183 and Bifidobacterium longum ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. *PloS one*, 12(4), p.e0175935. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28437455.

Cencic, A. & Chingwaru, W., 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2(6), pp.611–625.

Chamcheu, J.C. et al., 2015. Bilberries and their anthocyanins ameliorate experimental colitis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 86(4), pp.1724–1729. Available at: http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2015.0124.

Chan, D.S.M. et al., 2011. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies D. Tomé, ed. *PLoS ONE*, 6(6), p.e20456. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3108955.

Chaput, N. et al., 2017. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(6), pp.1368–1379. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28368458.

Chen, G.-L. et al., 2017. Partners of patients with ulcerative colitis exhibit a biologically relevant dysbiosis in fecal microbial metacommunities. *World journal of gastroenterology*, 23(25), pp.4624–4631. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28740351.

Chen, J. & Huang, X.F., 2009. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biology and Therapy*, 8(14), pp.1313–1317.

Chen, L. et al., 2018. Chemoprevention of colorectal cancer by black raspberry anthocyanins involved the modulation of gut microbiota and SFRP2 demethylation. *Carcinogenesis*, 39(3), pp.471–481. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29361151.

Chen, L.L. et al., 2009. Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice. *World journal of gastroenterology*, 15(3), pp.321–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19140231.

Chen, Q. et al., 2011. Dietary fructooligosaccharides and wheat bran elicit specific and dose-dependent gene expression profiles in the proximal colon epithelia of healthy Fischer

344 rats. *The Journal of nutrition*, 141(5), pp.790–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430247.

Chen, W. et al., 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS one*, 7(6), p.e39743. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761885.

Chen, X. et al., 2009. Saccharomyces boulardii Inhibits EGF Receptor Signaling and Intestinal Tumor Growth in Apcmin Mice. *Gastroenterology*, 137(3), pp.914–923. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508509008658.

Chen, Y. et al., 2017. Wuji Wan Formula Ameliorates Diarrhea and Disordered Colonic Motility in Post-inflammation Irritable Bowel Syndrome Rats by Modulating the Gut Microbiota. *Frontiers in microbiology*, 8, p.2307. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29218037.

Chong, E.S.L., 2014. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), pp.351–374. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11274-013-1499-6.

Choung, R.S. & Locke, G.R., 2011. Epidemiology of IBS. *Gastroenterology Clinics of North America*, 40(1), pp.1–10.

Christon, R.A., 2003. Mechanisms of action of dietary fatty acids in regulating the activation of vascular endothelial cells during atherogenesis. *Nutrition reviews*, 61(8), pp.272–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13677589.

Chua, H.-H. et al., 2018. Intestinal Dysbiosis Featuring Abundance of Ruminococcus gnavus Associates With Allergic Diseases in Infants. *Gastroenterology*, 154(1), pp.154–167. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28912020.

Ciorba, M.A., 2012. GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY A Gastroenterologist ' s Guide to Probiotics. *YJCGH*, 10(9), pp.960–968. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.03.024.

Citronberg, J.S. et al., 2018. Association of gut microbial communities with plasma lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in premenopausal women. *The ISME journal*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29434315.

Clauss, M. et al., 2003. The maximum attainable body size of herbivorous mammals: morphophysiological constraints on foregut, and adaptations of hindgut fermenters. *Oecologia*, 136(1), pp.14–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712314.

Cockburn, A. et al., 2013. Nitrite in feed: from animal health to human health. *Toxicology and applied pharmacology*, 270(3), pp.209–17. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21095201.

Constante, M. et al., 2017. Dietary Heme Induces Gut Dysbiosis, Aggravates Colitis, and Potentiates the Development of Adenomas in Mice. *Frontiers in microbiology*, 8, p.1809. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28983289.

Conte, M.P. et al., 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 55(12), pp.1760–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648155.

Cooke, D. et al., 2006. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc Min mouse model of intestinal carcinogenesis-Relationship with tissue anthocyanin levels. *International Journal of Cancer*, 119(9), pp.2213–2220. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22090.

Corzo, N. et al., 2015. [Prebiotics: Concept, Properties and Beneficial Effects.]. *Nutricion hospitalaria*, 31(s01), pp.99–118. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659062.

Coutinho, C.M.L.M. et al., 2017. Sulphate-reducing bacteria from ulcerative colitis patients induce apoptosis of gastrointestinal epithelial cells. *Microbial pathogenesis*, 112, pp.126–134. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28963010.

Cremonini, F. & Talley, N.J., 2005. Irritable bowel syndrome: Epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterology Clinics of North America*, 34(2 SPEC. ISS.), pp.189–204.

Crowder, C.D. et al., 2012. Serrated polyposis is an underdiagnosed and unclear syndrome: the surgical pathologist has a role in improving detection. *The American journal of surgical pathology*, 36(8), pp.1178–85. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790859.

Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. & Englyst, H.N., 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), p.415s–420s. Available at: https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/415s/4737572.

D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–42. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480022.

Dai, Z. et al., 2018. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome*, 6(1), p.70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29642940.

Damman, C.J. et al., 2012. The Microbiome and Inflammatory Bowel Disease: Is There a Therapeutic Role for Fecal Microbiota Transplantation? *The American Journal of Gastroenterology*, 107(10), pp.1452–1459. Available at: http://www.nature.com/articles/ajg201293.

David, L.A. et al., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), pp.559–63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336217.

Decendit, A. et al., 2013. Malvidin-3-O-β glucoside, major grape anthocyanin, inhibits human macrophage-derived inflammatory mediators and decreases clinical scores in arthritic rats. *Biochemical Pharmacology*, 86(10), pp.1461–1467. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000629521300381X.

Deng, Y.-F. et al., 2017. Efficacy and role of inulin in mitigation of enteric sulfur-containing odor in pigs. *Journal of the science of food and agriculture*, 97(8), pp.2382–2391. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664398.

Devkota, S. et al., 2012. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10-/- mice. *Nature*, 487(7405), pp.104–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722865.

Devkota, S. & Chang, E.B., 2015. Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive diseases (Basel,*

Switzerland), 33(3), pp.351–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045269.

Devkota, S. & Chang, E.B., 2015. Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive Diseases*, 33(3), pp.351–356. Available at: https://www.karger.com/Article/FullText/371687.

DiNicola, C.A., Zand, A. & Hommes, D.W., 2017. Autologous hematopoietic stem cells for refractory Crohn's disease. *Expert opinion on biological therapy*, 17(5), pp.555–564. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28326848.

Domènech, E., Mañosa, M. & Cabré, E., 2014. An overview of the natural history of inflammatory bowel diseases. *Digestive Diseases*, 32(4), pp.320–327.

Donohoe, D.R. et al., 2012. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Molecular Cell*, 48(4), pp.612–626. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276512007770.

Drost, J. et al., 2015. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 521(7550), pp.43–47. Available at: http://www.nature.com/articles/nature14415.

Duncan, S.H. et al., 2004. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *British Journal of Nutrition*, 91(06), p.915. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114504001126.

Dziarski, R. et al., 2016. Pglyrp-Regulated Gut Microflora Prevotella falsenii, Parabacteroides distasonis and Bacteroides eggerthii Enhance and Alistipes finegoldii Attenuates Colitis in Mice E. Mizoguchi, ed. *PLOS ONE*, 11(1), p.e0146162. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0146162.

Economou, M. & Pappas, G., 2008. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(5), pp.709–720.

Esteller, M. et al., 2000. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer research*, 60(16), pp.4366–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969779.

Eun, C.S. et al., 2014. Induction of bacterial antigen-specific colitis by a simplified human microbiota consortium in gnotobiotic interleukin-10-/- mice. *Infection and immunity*, 82(6), pp.2239–46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643531.

Fagunwa, I.O., Loughrey, M.B. & Coleman, H.G., 2017. Alcohol, smoking and the risk of premalignant and malignant colorectal neoplasms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(5), pp.561–568. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691817301075.

Fang, D.C. et al., 1999. Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *Journal of clinical pathology*, 52(7), pp.504–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605402.

Fazio, V. et al., 2011. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*, 10(1), p.9. Available at: http://www.carcinogenesis.com/text.asp?2011/10/1/9/78279.

Feagan, B.G. et al., 2008. Omega-3 Free Fatty Acids for the Maintenance of Remission in Crohn Disease. *JAMA*, 299(14), p.1690. Available at: http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.299.14.1690.

Feng, Z. et al., 2017. A human stool-derived Bilophila wadsworthia strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut pathogens*, 9, p.59. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29090023.

Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del-Río, I., Miguélez, E.M., et al., 2016a. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods*.

Fernández, J., Redondo-Blanco, S., M. Miguelez, E., et al., 2015. Healthy effects of prebiotics and their metabolites against intestinal diseases and colorectal cancer. *AIMS Microbiology*, 1(1), pp.48–71. Available at: http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2015.1.48.

Ferrario, C. et al., 2017. How to Feed the Mammalian Gut Microbiota: Bacterial and Metabolic Modulation by Dietary Fibers. *Frontiers in microbiology*, 8, p.1749.

Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28955319.

Fléjou, J.-F., 2011. *Classification OMS 2010 des tumeurs digestives : la quatrième édition*, Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778007.

Flemer, B. et al., 2018. Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota: Addendum. *Gut microbes*, pp.1–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29420132.

Fleming, S.E., Marthinsen, D. & Kuhnlein, H., 1983. Colonic function and fermentation in men consuming high fiber diets. *The Journal of nutrition*, 113(12), pp.2535–44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6317826.

Fleming, S.E., O'Donnell, A.U. & Perman, J.A., 1985. Influence of frequent and long-term bean consumption on colonic function and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 41(5), pp.909–918. Available at: https://academic.oup.com/ajcn/article/41/5/909/4691691.

Ford, A.C. et al., 2009. Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Gut*, 58(3), pp.367–378.

Freire, M.O. & Van Dyke, T.E., 2013. Natural resolution of inflammation. *Periodontology 2000*, 63(1), pp.149–164. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/prd.12034.

Frick, J.S. et al., 2007. Identification of commensal bacterial strains that modulate Yersinia enterocolitica and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics. *Infection and immunity*, 75(7), pp.3490–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485456.

García-Villalba, R. et al., 2012. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *Journal of Separation Science*, 35(15), pp.1906–1913. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201101121.

Geiersbach, K.B. & Samowitz, W.S., 2011. Microsatellite Instability and Colorectal Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(10), pp.1269–1277. Available at: http://www.archivesofpathology.org/doi/abs/10.5858/arpa.2011-0035-RA.

Gibson, G.R. et al., 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(1), pp.1–19.

Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), pp.1401–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782892.

Giovannucci, E. et al., 1993. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(11), pp.875–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8492316.

Giovannucci, E. et al., 1998. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Annals of internal medicine*, 129(7), pp.517–24. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9758570.

Goldberg, I.J., 2018. 2017 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(4), pp.700–706. Available at: http://atvb.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/ATVBAHA.117.309666.

Goodrich, J.K. et al., 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), pp.789–99. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25417156.

Gourineni, V.P. et al., 2011. Combinational Effects of Prebiotics and Soybean against Azoxymethane-Induced Colon Cancer In Vivo. *Journal of nutrition and metabolism*, 2011, p.868197. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961059.

Grau, M. V et al., 2003. Vitamin D, calcium supplementation, and colorectal adenomas: results of a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(23), pp.1765–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652238.

Grundmann, O. & Yoon, S.L., 2010. Irritable bowel syndrome: Epidemiology, diagnosis and treatment: An update for health-care practitioners. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 25(4), pp.691–699.

Guarner, F., Requena, T. & Marcos, A., 2010. Declaraciones consensuadas del workshop: Probióticos y salud: Evidencia científica. *Nutricion Hospitalaria*, 25(5), pp.700–704.

Gunstone, F.D., 1994. High resolution 13C NMR. A technique for the study of lipid structure

and composition. *Progress in lipid research*, 33(1–2), pp.19–28. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8190739.

Guslandi, M. et al., 2000. Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*, 45(7), pp.1462–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961730.

Gustavsson, B. et al., 2015. A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 14(1), pp.1–10. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1533002814001285.

Haenen, D. et al., 2013. A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine. *The Journal of nutrition*, 143(3), pp.274–83. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325922.

Hall, A.B. et al., 2017. A novel Ruminococcus gnavus clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome medicine*, 9(1), p.103. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29183332.

Hamer, H.M. et al., 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27(2), pp.104–19. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.

Han, Y.-M. et al., 2016. The ω-3 polyunsaturated fatty acids prevented colitis-associated carcinogenesis through blocking dissociation of β-catenin complex, inhibiting COX-2 through repressing NF-κB, and inducing 15-prostaglandin dehydrogenase. *Oncotarget*, 7(39), pp.63583–63595. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566583.

Harris, G.K. et al., 2001. Effects of Lyophilized Black Raspberries on Azoxymethane-Induced Colon Cancer and 8-Hydroxy-2′-Deoxyguanosine Levels in the Fischer 344 Rat. *Nutrition and Cancer*, 40(2), pp.125–133. Available at: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1207/S15327914NC402_8.

Harris, P.J. et al., 1996. The adsorption of heterocyclic aromatic amines by model dietary fibres with contrasting compositions. *Chemico-biological interactions*, 100(1), pp.13–25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599852.

Haskey, N. & Gibson, D.L., 2017. An Examination of Diet for the Maintenance of Remission in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*, 9(3). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28287412.

Heerdt, B.G., Houston, M.A. & Augenlicht, L.H., 1997. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8(5), pp.523–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9149903.

Hernández-Hernández, O. et al., 2011. Characterization of galactooligosaccharides derived from lactulose. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), pp.7691–7696. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311006571.

Hernández-Hernández, O. et al., 2012. Monomer and Linkage Type of Galacto-Oligosaccharides Affect Their Resistance to Ileal Digestion and Prebiotic Properties in Rats. *The Journal of Nutrition*, 142(7), pp.1232–1239. Available at: https://academic.oup.com/jn/article/142/7/1232/4630799.

Heylen, K. et al., 2006. The incidence of nirS and nirK and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 8(11), pp.2012–2021. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2006.01081.x.

Hill, C. et al., 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), pp.506–514.

Hinnebusch, B.F. et al., 2002. The Effects of Short-Chain Fatty Acids on Human Colon Cancer Cell Phenotype Are Associated with Histone Hyperacetylation. *The Journal of Nutrition*, 132(5), pp.1012–1017. Available at: https://academic.oup.com/jn/article/132/5/1012/4687296.

Hiranmayi, Kv. et al., 2017. Novel pathogens in periodontal microbiology. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 9(3), p.155. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28979069.

Hoffmann, R.M. & Kruis, W., 2004. Rare extraintestinal manifestations of inflammatory

bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 10(2), pp.140–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657857.

Hou, D.-X., 2003. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 25(1), pp.29–36. Available at: https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgg184.

Housman, G. et al., 2014. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), pp.1769–92. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25198391.

Hsu, C.-K. et al., 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *The Journal of nutrition*, 134(6), pp.1523–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173423.

Huang, T.-H. et al., 2017. The identification and validation of Trichosstatin A as a potential inhibitor of colon tumorigenesis and colon cancer stem-like cells. *American journal of cancer research*, 7(5), pp.1227–1237. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560069.

Huang, Y.-L. et al., 2015. Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. *Nature communications*, 6, p.8141. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26303108.

Hudcovic, T. et al., 2012. Protective effect of Clostridium tyrobutyricum in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor-α and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clinical & Experimental Immunology*, 167(2), pp.356–365. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2011.04498.x.

Huebner, C. et al., 2009. Genetic analysis of MDR1 and inflammatory bowel disease reveals protective effect of heterozygous variants for ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 15(12), pp.1784–93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19685447.

Humphries, A. & Wright, N. a, 2008. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature*

reviews. Cancer, 8(6), pp.415–424.

IARC, 2012. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx.

IJspeert, J.E.G., Medema, J.P. & Dekker, E., 2015. Colorectal neoplasia pathways: State of the art. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 25(2), pp.169–182. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.giec.2014.11.004.

Inohara, N., Ogura, Y. & Nuñez, G., 2002. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Current opinion in microbiology*, 5(1), pp.76–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834373.

Irving, A.A. et al., 2011. Supplementation by vitamin D compounds does not affect colonic tumor development in vitamin D sufficient murine models. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 515(1–2), pp.64–71. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986111002992.

Irving, A.A. et al., 2014a. The utility of *Apc* -mutant rats in modeling human colon cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 7(11), pp.1215–1225. Available at: http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.016980.

Irving, A.A. et al., 2014b. The utility of Apc -mutant rats in modeling human colon cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 7(11), pp.1215–1225. Available at: http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.016980.

J.A. Uranga, J.C. Cámara, E. Herradón, G. Vera, N. Jagerovic, E. Quesada, J. Fernández, F. Lombó, R.A., 2017. New Strategies for Treatment and Prevention of Colorectal Cancer. In *Gastrointestinal Cancers: Prevention, Detection and Treatment. Volume 1*. pp. 103–170.

Jacobs, E.J. et al., 2003. Multivitamin use and colorectal cancer incidence in a US cohort: does timing matter? *American journal of epidemiology*, 158(7), pp.621–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507597.

Jass, J.R., 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1), pp.113–130. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x.

Jelsig, A.M. et al., 2014. Hamartomatous polyposis syndromes: a review. *Orphanet journal of rare diseases*, 9, p.101. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25022750.

Jenq, R.R. et al., 2015. Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(8), pp.1373–1383. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879115002931.

Jeong, J.J. et al., 2015. The probiotic mixture IRT5 ameliorates age-dependent colitis in rats. *International Immunopharmacology*, 26(2), pp.416–422. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.021.

Jia, W. et al., 2012. Diversity and distribution of sulphate-reducing bacteria in human faeces from healthy subjects and patients with inflammatory bowel disease. *FEMS immunology and medical microbiology*, 65(1), pp.55–68. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309113.

Jikihara, H. et al., 2015. Aged garlic extract inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor development by suppressing cell proliferation. *Oncology reports*, 33(3), pp.1131–40. Available at: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2014.3705.

Johansson, M.E. V et al., 2010. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PloS one*, 5(8), p.e12238. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805871.

Joossens, M. et al., 2011. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60(5), pp.631–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209126.

Jowett, S.L. et al., 2004. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut*, 53(10), pp.1479–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361498.

Juretić, A., 2017. Colorectal cancer treatment: An introduction. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti*, 530(May), pp.47–54. Available at: http://dizbi.hazu.hr/object/32315.

Jurjus, A.R., Khoury, N.N. & Reimund, J.-M., 2004. Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 50(2), pp.81–92. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871903000959.

Kaakoush, N.O., 2015. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, p.84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636046.

Kahouli, I., Tomaro-Duchesneau, C. & Prakash, S., 2013. Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt_8), pp.1107–1123. Available at: http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.048975-0.

Kalra, E.K., 2003. Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS PharmSci*, 5(3), pp.27–28. Available at: http://link.springer.com/10.1208/ps050325.

Kanda, T. et al., 2016. Enterococcus durans TN-3 Induces Regulatory T Cells and Suppresses the Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Experimental Colitis U. P. Singh, ed. *PLOS ONE*, 11(7), p.e0159705. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0159705.

Kang, H.M. et al., 2015. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nature medicine*, 21(1), pp.37–46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25419705.

Kang, S.-Y. et al., 2003. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer letters*, 194(1), pp.13–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706854.

Kantor, M. et al., 2017. Hereditary Colorectal Tumors: A Literature Review on MUTYH-Associated Polyposis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2017, pp.1–4. Available at: https://www.hindawi.com/journals/grp/2017/8693182/.

Kelley, D., Adkins, Y. & Laugero, K., 2018. A Review of the Health Benefits of Cherries. *Nutrients*, 10(3), p.368. Available at: http://www.mdpi.com/2072-6643/10/3/368.

Khalili, H. et al., 2013. Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. *Gut*, 62(8), pp.1153–1159.

Kim, J.J. et al., 2012. Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *Journal of Visualized Experiments*, (60), pp.1–6. Available at: http://www.jove.com/video/3678/.

Kim, O.H. et al., 2004. Influence of p53 and p21Waf1 expression on G2/M phase arrest of colorectal carcinoma HCT116 cells to proteasome inhibitors. *International journal of oncology*, 24(4), pp.935–41. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010833.

Kim, S.W. et al., 2010. Bifidobacterium lactis inhibits NF-kappaB in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflammatory bowel diseases*, 16(9), pp.1514–25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20310012.

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), pp.159–70.

Klaring, K. et al., 2013. Intestinimonas butyriciproducens gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the mouse intestine. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 63(Pt 12), pp.4606–4612. Available at: http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.051441-0.

Kobaek-Larsen, M. et al., 2000. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp Med*, 50(1), pp.16–26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987662.

Koleva, P.T. et al., 2012. Inulin and fructo-oligosaccharides have divergent effects on colitis and commensal microbiota in HLA-B27 transgenic rats. *The British journal of nutrition*, 108(9), pp.1633–43. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22243836.

Kong, J.-M. et al., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), pp.923–33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561507.

Koushik, A. et al., 2007. Fruits, Vegetables, and Colon Cancer Risk in a Pooled Analysis of 14 Cohort Studies. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), pp.1471–

1483. Available at: https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djm155.

Kreutzer, C. et al., 2017. Hypothalamic Inflammation in Human Obesity Is Mediated by Environmental and Genetic Factors. *Diabetes*, 66(9), pp.2407–2415. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28576837.

Kuipers, E.J. et al., 2015. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 43(8), p.15065. Available at: http://www.nature.com/articles/nrdp201565.

Kumar, S. & Pandey, A.K., 2007. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 73, pp.637–670.

Kverka, M. et al., 2011. Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical and experimental immunology*, 163(2), pp.250–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087444.

Lacy, B.E. et al., 2016. Bowel disorders. *Gastroenterology*, 150(6), p.1393–1407e5. Available at: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.031.

Laparra, J.M. et al., 2013. Neoglycoconjugates of caseinomacropeptide and galactooligosaccharides modify adhesion of intestinal pathogens and inflammatory response(s) of intestinal (Caco-2) cells. *Food Research International*, 54(1), pp.1096–1102. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912004450.

Lee, D. et al., 2015. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 148(6), pp.1087–1106. Available at: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.007.

Lennon, G. et al., 2014. Correlations between colonic crypt mucin chemotype, inflammatory grade and Desulfovibrio species in ulcerative colitis. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 16(5), pp.O161-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345279.

León, I.E. et al., 2015. Oxidovanadium(IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological*

Inorganic Chemistry, 20(7), pp.1175–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26404080.

Ley, R.E. et al., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), pp.1022–3. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183309.

Ley, R.E. et al., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), pp.11070–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033867.

Li, J. et al., 2008. Differential effects of black raspberry and strawberry extracts on BaPDE-induced activation of transcription factors and their target genes. *Molecular carcinogenesis*, 47(4), pp.286–94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18085529.

Lin, B.-W. et al., 2017. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British journal of pharmacology*, 174(11), pp.1226–1243. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27646173.

Lin, L. et al., 2013. Effect of initial pH on mesophilic hydrolysis and acidification of swine manure. *Bioresource technology*, 136, pp.302–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567695.

Lippert, E. et al., 2017. Anthocyanins Prevent Colorectal Cancer Development in a Mouse Model. *Digestion*, 95(4), pp.275–280. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28494451.

Longstreth, G.F., 2005. Definition and classification of irritable bowel syndrome: Current consensus and controversies. *Gastroenterology Clinics of North America*, 34(2 SPEC. ISS.), pp.173–187.

Longstreth, G.F. et al., 2006. Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology*, 130(5), pp.1480–1491.

Lönnfors, S. et al., 2014. IBD and health-related quality of life - Discovering the true impact. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(10), pp.1281–1286.

López-Sanz, S. et al., 2015. Stability of oligosaccharides derived from lactulose during the processing of milk and apple juice. *Food Chemistry*, 183, pp.64–71. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615003714.

Lopez-Siles, M. et al., 2015. Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii phylotype richness is reduced in patients with inflammatory bowel disease. *Applied and environmental microbiology*, 81(21), pp.7582–92. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26296733.

López de Las Hazas, M.-C. et al., 2017. Exploring the Colonic Metabolism of Grape and Strawberry Anthocyanins and Their in Vitro Apoptotic Effects in HT-29 Colon Cancer Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), pp.6477–6487. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27790915.

de Lorgeril, M. & Salen, P., 2006. The Mediterranean-style diet for the prevention of cardiovascular diseases. *Public health nutrition*, 9(1A), pp.118–23. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16512958.

Louis, P. et al., 2010. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*, 12(2), pp.304–314. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x.

Louis, P. et al., 2004. Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *Journal of Bacteriology*, 186(7), pp.2099–2106. Available at: http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.186.7.2099-2106.2004.

Louis, P. & Flint, H.J., 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS microbiology letters*, 294(1), pp.1–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19222573.

Louis, P., Hold, G.L. & Flint, H.J., 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), pp.661–672. Available at: http://www.nature.com/articles/nrmicro3344.

Lu, J.N. et al., 2017. Anthocyanins from the Fruit of Vitis Coignetiae Pulliat Inhibit TNF-

Augmented Cancer Proliferation, Migration, and Invasion in A549 Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 18(11), pp.2919–2923. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29172259.

Lu, R. et al., 2014. Enteric bacterial protein AvrA promotes colonic tumorigenesis and activates colonic beta-catenin signaling pathway. *Oncogenesis*, 3(6), pp.e105–e105. Available at: http://www.nature.com/articles/oncsis201420.

Lynch, H. et al., 2009. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics*, 76(1), pp.1–18. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x.

Ma, H. et al., 2018. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*, 50(1), pp.49–59.

Macfarlane, G.T., Steed, H. & Macfarlane, S., 2007. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, p.070907095856003–??? Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x.

Maeda, S. et al., 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5710), pp.734–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692052.

Mahipal, A. & Grothey, A., 2016. Role of Biologics in First-Line Treatment of Colorectal Cancer. *Journal of Oncology Practice*, 12(12), pp.1219–1228. Available at: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JOP.2016.018382.

Mancabelli, L. et al., 2017. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS microbiology ecology*, 93(12). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126267.

Marchesi, J.R. et al., 2011. Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. *PLoS ONE*, 6(5), p.e20447. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020447.

Marin, J.J.G. et al., 2012. Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug metabolism reviews*, 44(2), pp.148–72. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22497631.

Marín, L. et al., 2015. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed research international*, 2015, p.905215. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802870.

Marín, L. et al., 2015. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 2015.

Marion-Letellier, R., Savoye, G. & Ghosh, S., 2015. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *IUBMB Life*, 67(9), pp.659–667.

Mashimo, T. et al., 2008. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nature Genetics*, 40(5), pp.514–515. Available at: http://www.nature.com/articles/ng0508-514.

Mearin, F. et al., 2001. Irritable bowel syndrome prevalence varies enormously depending on the employed diagnostic criteria: Comparison of Rome II versus previous criteria in a general population. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 36(11), pp.1155–1161.

Mishra, S. et al., 2014. Deoxynivalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279(2), pp.186–197. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X14002269.

Moayyedi, P. et al., 2010. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review. *Gut*, 59(3), pp.325–332.

Moen, B. et al., 2016. Effect of Dietary Fibers on Cecal Microbiota and Intestinal Tumorigenesis in Azoxymethane Treated A/J Min/+ Mice. *PloS one*, 11(5), p.e0155402. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27196124.

Moller, F.T. et al., 2015. Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(4), pp.564–571. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ajg.2015.50.

Molodecky, N.A. et al., 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), p.46–54.e42. Available at: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001.

Mundade, R. et al., 2014. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), p.400. Available at: http://impactjournals.com/oncoscience/index.php?abs=59.

Nagai, F. et al., 2010. Alistipes indistinctus sp. nov. and Odoribacter laneus sp. nov., common members of the human intestinal microbiota isolated from faeces. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 60(6), pp.1296–1302. Available at: http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.014571-0.

Nakase, H. et al., 2001. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 297(3), pp.1122–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356937.

Nanno, M. et al., Biological effects of probiotics: what impact does Lactobacillus casei shirota have on us? *International journal of immunopathology and pharmacology*, 24(1 Suppl), p.45S–50S. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21329565.

Neyrinck, A.M. et al., 2016. Intestinal Sucrase as a Novel Target Contributing to the Regulation of Glycemia by Prebiotics. *PloS one*, 11(8), p.e0160488. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27532866.

Noor, S.O. et al., 2010. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC gastroenterology*, 10, p.134. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073731.

O'Donnell, L.J.D., Virjee, J. & Heaton, K.W., 1990. Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. *British Medical Journal*, 300(February), pp.439–440.

O'Hara, A.M. & Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), pp.688–693.

O'Keefe, S.J.D. et al., 2015. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nature Communications*, 6.

Ogino, S. et al., 2007. 18q loss of heterozygosity in microsatellite stable colorectal cancer is

correlated with CpG island methylator phenotype-negative (CIMP-0) and inversely with CIMP-low and CIMP-high. *BMC Cancer*, 7(1), p.72. Available at: http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-7-72.

Olivares, A. et al., 2009. Interactions between genotype, dietary fat saturation and vitamin A concentration on intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. *Meat Science*, 82(1), pp.6–12. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174008003690.

Omori, M. et al., 2017. Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *The Journal of veterinary medical science*, 79(11), pp.1840–1847. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28993566.

Orel, R., 2014. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(33), p.11505. Available at: http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i33/11505.htm.

Ostanin, D. V et al., 2009. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 296(2), pp.G135-46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033538.

Österlund, P. et al., 2007. Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *British Journal of Cancer*, 97(8), pp.1028–1034. Available at: http://www.nature.com/articles/6603990.

Özen, H. et al., 2014. Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 66(8), pp.367–75. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947405.

Päivärinta, E. et al., 2016. Changes in intestinal immunity, gut microbiota, and expression of energy metabolism-related genes explain adenoma growth in bilberry and cloudberry-fed ApcMin mice. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 36(11), pp.1285–1297. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27865612.

Palaria, A., Johnson-Kanda, I. & O'Sullivan, D.J., 2012. Effect of a synbiotic yogurt on

levels of fecal bifidobacteria, clostridia, and enterobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 78(4), pp.933–40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101054.

Panesar, P.S. & Kumari, S., 2011. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.940–948. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011001406.

Patel, J.D. & Chang, K.J., 2016. The role of virtual colonoscopy in colorectal screening. *Clinical Imaging*, 40(2), pp.315–320. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899707115001680.

Paturi, G. et al., 2012. Influence of dietary blueberry and broccoli on cecal microbiota activity and colon morphology in mdr1a−/− mice, a model of inflammatory bowel diseases. *Nutrition*, 28(3), pp.324–330. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900711002516.

Paveljšek, D. et al., 2018. Lactobacillus fermentum L930BB and Bifidobacterium animalis subsp. animalis IM386 initiate signalling pathways involved in intestinal epithelial barrier protection. *Beneficial microbes*, 9(3), pp.515–525. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29633647.

Pereira, D.I.A. & Gibson, G.R., 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 37(4), pp.259–81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12236466.

Perše, M. & Cerar, A., 2011. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

Peters, U. et al., 2003. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *The Lancet*, 361(9368), pp.1491–1495. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360313173X.

Petersen, G.M., Slack, J. & Nakamura, Y., 1991a. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology*, 100(6),

pp.1658–64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1673441.

Petersen, G.M., Slack, J. & Nakamura, Y., 1991b. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology*, 100(6), pp.1658–64. Available at: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1224820.

Piberger, H. et al., 2011. Bilberries and their anthocyanins ameliorate experimental colitis. *Molecular nutrition & food research*, 55(11), pp.1724–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21957076.

Pierotti, M.A. et al., 2013. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene*, 32(12), pp.1475–1487. Available at: http://www.nature.com/articles/onc2012181.

Pimentel, M. et al., 2011. Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation. *New England Journal of Medicine*, 364(1), pp.22–32. Available at: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1004409.

Piñol, V. et al., 2004. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 16(1), pp.39–45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15095851.

Png, C.W. et al., 2010. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *The American journal of gastroenterology*, 105(11), pp.2420–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648002.

Polansky, O. et al., 2015. Important Metabolic Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 82(5), pp.1569–76. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712550.

Ponder, A. & Long, M.D., 2013. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clinical Epidemiology*, 5(1), pp.237–247.

Pritchard, R.S., Baron, J.A. & Gerhardsson de Verdier, M., 1996. Dietary calcium, vitamin D, and the risk of colorectal cancer in Stockholm, Sweden. *Cancer epidemiology*,

biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 5(11), pp.897–900. Available at: http://www.nature.com/articles/nrc3691.

Qamar, T.R. et al., 2016. Novel Combination of Prebiotics Galacto-Oligosaccharides and Inulin-Inhibited Aberrant Crypt Foci Formation and Biomarkers of Colon Cancer in Wistar Rats. *Nutrients*, 8(8). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27490566.

Qin, J. et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), pp.59–65. Available at: http://www.nature.com/articles/nature08821.

Rajilić-Stojanović, M. et al., 2015. Intestinal microbiota and diet in IBS: Causes, consequences, or epiphenomena? *American Journal of Gastroenterology*, 110(2), pp.278–287.

Rather, R.A. & Bhagat, M., 2018. Cancer Chemoprevention and Piperine: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, p.10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29497610.

Raz, I. et al., 2007. Isolation and characterisation of new putative probiotic bacteria from human colonic flora. *The British journal of nutrition*, 97(4), pp.725–34. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349085.

Reddivari, L. et al., 2007. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis*, 28(10), pp.2227–2235. Available at: https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgm117.

Reddy, K.V.K. & Naidu, K.A., 2016. Oleic acid, hydroxytyrosol and n-3 fatty acids collectively modulate colitis through reduction of oxidative stress and IL-8 synthesis; in vitro and in vivo studies. *International immunopharmacology*, 35, pp.29–42. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27016717.

Reichardt, N. et al., 2014. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME Journal*, 8(6), pp.1323–1335.

Available at: http://www.nature.com/articles/ismej201414.

Rennick, D.M., Fort, M.M. & Davidson, N.J., 1997. Studies with IL-10-/- mice: an overview. *Journal of leukocyte biology*, 61(4), pp.389–96. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103224.

Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), pp.1125–1131. Available at: http://www.nature.com/articles/nprot.2008.75.

Reygner, J. et al., 2016. Inulin Supplementation Lowered the Metabolic Defects of Prolonged Exposure to Chlorpyrifos from Gestation to Young Adult Stage in Offspring Rats. *PloS one*, 11(10), p.e0164614. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27760213.

Ribes, J. et al., 2009. Colorectal cancer mortality in Spain: trends and projections for 1985-2019. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 21(1), pp.92–100. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19011574.

Roller, M. et al., 2007. Consumption of prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis has minor effects on selected immune parameters in polypectomised and colon cancer patients. *British Journal of Nutrition*, 97(04), p.676. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114507450292.

Roller, M., Pietro Femia, A., et al., 2004. Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis. *The British journal of nutrition*, 92(6), pp.931–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613255.

Roller, M., Rechkemmer, G. & Watzl, B., 2004. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis modulates intestinal immune functions in rats. *The Journal of nutrition*, 134(1), pp.153–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704309.

Rosenberg, D.W., Giardina, C. & Tanaka, T., 2009. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 30(2), pp.183–196.

Rowan, F.E. et al., 2009. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *The British journal of surgery*, 96(2), pp.151–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19160346.

Ruemmele, F.M. et al., 2003. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut*, 52(1), pp.94–100. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477768.

Ruigómez, a et al., 1999. One-year follow-up of newly diagnosed irritable bowel syndrome patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 13(8), pp.1097–102. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468687.

Ryan-Harshman, M. & Aldoori, W., 2007. Diet and colorectal cancer: Review of the evidence. *Canadian family physician Médecin de famille canadien*, 53(11), pp.1913–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000268%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2231486.

Salaritabar, A. et al., 2017. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World Journal of Gastroenterology*, 23(28), p.5097. Available at: http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i28/5097.htm.

Sales-Campos, H. et al., 2013. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(2), pp.201–10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23278117.

Sanchez, M., Panahi, S. & Tremblay, A., 2014. Childhood obesity: a role for gut microbiota? *International journal of environmental research and public health*, 12(1), pp.162–75. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546278.

Satsangi, J. et al., 2006. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), pp.749–753.

Scaioli, E., Liverani, E. & Belluzzi, A., 2017. The imbalance between N-6/N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease: A comprehensive review and future therapeutic perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).

Schumacher, U.K., Eiring, P. & Häcker, F.-M., 1997. Incidence of Bilophila wadsworthia in appendiceal, peritoneal and fecal samples from children. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 3(1), pp.134–136. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11864089.

Schumann, C., 2002. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 41, pp.1–1. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s00394-002-1103-6.

Scoditti, E. et al., 2014. Vascular effects of the Mediterranean diet-part II: role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascular pharmacology*, 63(3), pp.127–34. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446163.

Scordo, K. & Pickett, K.A., 2017. CE: Triglycerides: Do They Matter? *The American journal of nursing*, 117(1), pp.24–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28030403.

Seeber, A. & Gastl, G., 2016. Targeted Therapy of Colorectal Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 39(12), pp.796–802.

Segura, J. & Lopez-Bote, C.J., 2014. A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis. *Food Chemistry*, 145, pp.821–825. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613012338.

Sehdev, A. et al., 2015. Metformin for primary colorectal cancer prevention in patients with diabetes: A case-control study in a US population. *Cancer*, 121(7), pp.1071–1078. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.29165.

Sehdev, A. & O'Neil, B.H., 2015. The Role of Aspirin, Vitamin D, Exercise, Diet, Statins, and Metformin in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 16(9).

Shih, P.-H., Yeh, C.-T. & Yen, G.-C., 2007. Anthocyanins Induce the Activation of Phase II Enzymes through the Antioxidant Response Element Pathway against Oxidative Stress-Induced Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), pp.9427–9435. Available at: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf071933i.

Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 56(8), pp.365–79. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442909.

Sivaprakasam, S. et al., 2016. An essential role of Ffar2 (Gpr43) in dietary fibre-mediated promotion of healthy composition of gut microbiota and suppression of intestinal carcinogenesis. *Oncogenesis*, 5(6), p.e238. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27348268.

Skibsted, L.H., 2011. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 24(4), pp.176–83. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605822.

Skovgaard, N., 1992. Microbiological aspects and technological need: Technological needs for nitrates and nitrites. *Food Additives and Contaminants*, 9(5), pp.391–397. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1298641.

Smith, R.A. et al., 2013. Cancer screening in the United States, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(2), pp.87–105. Available at: http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21174.

Snover, D.C., 2011. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathology*, 42(1), pp.1–10. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817710002066.

Sodagari, H.R. et al., 2015a. Dietary anthocyanins as a complementary medicinal approach for management of inflammatory bowel disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 9(6), pp.807–20.

Sodagari, H.R. et al., 2015b. Dietary anthocyanins as a complementary medicinal approach for management of inflammatory bowel disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 9(6), pp.807–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586636.

Sokol, H. et al., 2006. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 12(2), pp.106–11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432374.

Song, H. et al., 2018. Pretreatment with probiotic Bifico ameliorates colitis-associated cancer in mice: Transcriptome and gut flora profiling. *Cancer science*, 109(3), pp.666–677. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29288512.

Soubh, A.A., Abdallah, D.M. & El-Abhar, H.S., 2015. Geraniol ameliorates TNBS-induced colitis: Involvement of Wnt/β-catenin, p38MAPK, NFκB, and PPARγ signaling pathways. *Life sciences*, 136, pp.142–50. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26165751.

De Stefani, E. et al., 1997. Influence of dietary levels of fat, cholesterol, and calcium on colorectal cancer. *Nutrition and Cancer*, 29(1), pp.83–89. Available at: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635589709514606.

Stracci, F., Zorzi, M. & Grazzini, G., 2014. Colorectal Cancer Screening: Tests, Strategies, and Perspectives. *Frontiers in Public Health*, 2. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2014.00210/abstract.

Sun, J. & Kato, I., 2016. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Genes & diseases*, 3(2), pp.130–143. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28078319.

Sun, T. et al., 2017. Evolutionary biologic changes of gut microbiota in an "adenoma-carcinoma sequence" mouse colorectal cancer model induced by 1, 2-Dimethylhydrazine. *Oncotarget*, 8(1), pp.444–457. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27880935.

Sydora, B.C. et al., 2005. Association with Selected Bacteria Does Not Cause Enterocolitis in IL-10 Gene-Deficient Mice Despite a Systemic Immune Response. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(5), pp.905–913. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s10620-005-2663-0.

Sydora, B.C. et al., 2003. Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. *Inflammatory bowel diseases*, 9(2), pp.87–97. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769442.

Tack, J. et al., 2006. Systematic review: The efficacy of treatments for irritable bowel

syndrome - A European perspective. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(2), pp.183–205.

Takaishi, H. et al., 2008. Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 298(5–6), pp.463–72. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897884.

Taketo, M.M. & Edelmann, W., 2009. Mouse Models of Colon Cancer. *Gastroenterology*, 136(3), pp.780–798. Available at: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.049.

Tanaka, T. et al., 2009. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 177(2), pp.128–136. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279708005772.

Tannock, G.W. et al., 2014. RNA-stable-isotope probing shows utilization of carbon from inulin by specific bacterial populations in the rat large bowel. *Applied and environmental microbiology*, 80(7), pp.2240–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487527.

Tatsumi, Y. & Lichtenberger, L.M., 1996. Molecular association of trinitrobenzenesulfonic acid and surface phospholipids in the development of colitis in rats. *Gastroenterology*, 110(3), pp.780–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608888.

Terry, P. et al., 2001. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7), pp.525–33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287446.

Thomas, A.M. et al., 2016. Tissue-Associated Bacterial Alterations in Rectal Carcinoma Patients Revealed by 16S rRNA Community Profiling. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, p.179. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018861.

Toma, J. et al., 2008. Rates of New or Missed Colorectal Cancer After Barium Enema and Their Risk Factors: A Population-Based Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(12), pp.3142–3148. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1111/j.1572-0241.2008.02199.x.

Tomasello, G. et al., 2016. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 160(4), pp.461–466. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812084.

Tong, Y., Yang, W. & Koeffler, H.P., 2011. Mouse Models of colorectal cancer. *Chin J Cancer*, 30(7), pp.450–462.

Topcu-Tarladacalisir, Y. et al., 2013. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: the roles of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of medicinal food*, 16(4), pp.296–305. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566056.

Toscano, M. et al., 2017. Effect of Lactobacillus rhamnosus HN001 and Bifidobacterium longum BB536 on the healthy gut microbiota composition at phyla and species level: A preliminary study. *World journal of gastroenterology*, 23(15), pp.2696–2704. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28487606.

Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), pp.1231–1246.

Tsoi, K.K.F. et al., 2009. Cigarette Smoking and the Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(6), p.682–688.e5. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356509001396.

Uccello, M. et al., 2012. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surgery*, 12(Suppl 1), p.S35. Available at: http://bmcsurg.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2482-12-S1-S35.

Urbanska, A.M. et al., 2009. Estimation of the Potential Antitumor Activity of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus Yogurt Formulation in the Attenuation of Tumorigenesis in Apc(Min/+) Mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(2), pp.264–273. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s10620-008-0363-2.

Vainio, H., Kaaks, R. & Bianchini, F., 2002. Weight control and physical activity in cancer

prevention: international evaluation of the evidence. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 11 Suppl 2, pp.S94-100. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570341.

Vandeputte, D. et al., 2017. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut*, 66(11), pp.1968–1974. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28213610.

Veljacca, M., 2004. Inflammatory Bowel Disease: Diagnostic and Therapeutics. *Inflammation Research*, 53(3), pp.85–86.

Venancio, V.P. et al., 2017. Cocoplum (Chrysobalanus icaco L.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food & Function*, 8(1), pp.307–314. Available at: http://xlink.rsc.org/?DOI=C6FO01498D.

Vital, M., Howe, A.C. & Tiedje, J.M., 2014. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)genomic Data. *mBio*, 5(2), pp.e00889-14-e00889-14. Available at: http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00889-14.

Volf, J. et al., 2016. Transient and Prolonged Response of Chicken Cecum Mucosa to Colonization with Different Gut Microbiota B. A. Wilson, ed. *PLOS ONE*, 11(9), p.e0163932. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0163932.

Voreades, N., Kozil, A. & Weir, T.L., 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in microbiology*, 5, p.494. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25295033.

Waidmann, M. et al., 2003. Bacteroides vulgatus protects against escherichia coli-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*, 125(1), pp.162–177. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508503006723.

Wang, Y. et al., 2018. Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy. *Journal of Crohn's & colitis*, 12(3), pp.337–346. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29194468.

Wang, Y. et al., 2010. Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles*

County, Calif.), 26(3), pp.305–11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665870.

Watanabe, Y., Nagai, F. & Morotomi, M., 2012. Characterization of Phascolarctobacterium succinatutens sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), pp.511–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081579.

Weir, T.L. et al., 2013. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PloS one*, 8(8), p.e70803. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940645.

Whiting, C. V, Bland, P.W. & Tarlton, J.F., 2005. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 11(4), pp.340–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15803023.

van de Wiele, T. et al., 2007. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2). Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2006.03084.x.

Willing, B.P. et al., 2010. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*, 139(6), p.1844–1854.e1. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816835.

Winter, S.E. & Bäumler, A.J., 2014. Dysbiosis in the inflamed intestine. *Gut Microbes*, 5(1), pp.71–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637596.

Wollowski, I., Rechkemmer, G. & Pool-Zobel, B.L., 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2 Suppl), p.451S–455S. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157356.

Wong, J.M.W. et al., 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(3), pp.235–43. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633129.

Wu, S. et al., 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via

activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine*, 15(9), pp.1016–1022. Available at: http://www.nature.com/articles/nm.2015.

Xiao, J., Metzler-Zebeli, B. & Zebeli, Q., 2015. Gut Function-Enhancing Properties and Metabolic Effects of Dietary Indigestible Sugars in Rodents and Rabbits. *Nutrients*, 7(10), pp.8348–8365. Available at: http://www.mdpi.com/2072-6643/7/10/5397.

Xie, C. et al., 2011. Blueberries reduce pro-inflammatory cytokine TNF-α and IL-6 production in mouse macrophages by inhibiting NF-κB activation and the MAPK pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(10), pp.1587–1591. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201100344.

Xiong, H.Q. & Ajani, J.A., 2004. Treatment of colorectal cancer metastasis : The role of chemotherapy. , pp.145–163.

Yang, I. et al., 2013. Intestinal Microbiota Composition of Interleukin-10 Deficient C57BL/6J Mice and Susceptibility to Helicobacter hepaticus-Induced Colitis M. M. Heimesaat, ed. *PLoS ONE*, 8(8), p.e70783. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070783.

Yang, J. et al., 2013. In vitro characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe*, 23, pp.74–81. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996413001029.

Yang, J. & Yu, J., 2018. The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. *Protein & cell*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713943.

Yazici, C. et al., 2017. Race-dependent association of sulfidogenic bacteria with colorectal cancer. *Gut*, 66(11), pp.1983–1994. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28153960.

Yoshimi, K. et al., 2009. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat. *Cancer Science*, 100(11), pp.2022–2027. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2009.01287.x.

Yoshimi, K. et al., 2013. Tumor Suppressor APC Protein Is Essential in Mucosal Repair from Colonic Inflammation through Angiogenesis. *The American Journal of*

Pathology, 182(4), pp.1263–1274. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000294401300014X.

Zackular, J.P. et al., 2013. The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. *mBio*, 4(6), pp.e00692-13-e00692-13. Available at: http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00692-13.

Zeller, G. et al., 2014. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Molecular Systems Biology*, 10(11), pp.766–766. Available at: http://msb.embopress.org/cgi/doi/10.15252/msb.20145645.

Zeng, H. et al., 2017. Butyrate Inhibits Cancerous HCT116 Colon Cell Proliferation but to a Lesser Extent in Noncancerous NCM460 Colon Cells. *Nutrients*, 9(1). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045428.

Zhang, J. et al., 1998. Energy metabolism of rat colonocytes changes during the tumorigenic process and is dependent on diet and carcinogen. *The Journal of nutrition*, 128(8), pp.1262–1269. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687542.

Zhang, Q. et al., 2018. Inulin-type fructan improves diabetic phenotype and gut microbiota profiles in rats. *PeerJ*, 6, p.e4446. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29507837.

Zhang, S. et al., 2017. Dietary pomegranate extract and inulin affect gut microbiome differentially in mice fed an obesogenic diet. *Anaerobe*, 48, pp.184–193. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996417301786.

Zhang, W. et al., 2017. Oral Administration of a Select Mixture of Bacillus Probiotics Affects the Gut Microbiota and Goblet Cell Function following Escherichia coli Challenge in Newly Weaned Pigs of Genotype MUC4 That Are Supposed To Be Enterotoxigenic E. coli F4ab/ac Receptor. *Applied and environmental microbiology*, 83(3). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27881419.

Zhu, Q. et al., 2014. Analysis of the Intestinal Lumen Microbiota in an Animal Model of Colorectal Cancer G. L. Hold, ed. *PLoS ONE*, 9(3), p.e90849. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090849.