

University of Groningen

The intestinal short chain fatty acid production: its complexity and metabolic consequences

Rios Morales, Melany

DOI:
[10.33612/diss.210077485](https://doi.org/10.33612/diss.210077485)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2022

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Rios Morales, M. (2022). *The intestinal short chain fatty acid production: its complexity and metabolic consequences*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.210077485>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Appendices

Summary

Samenvatting

Resumen

Acknowledgements

Curriculum Vitae

List of publications

SUMMARY

In the complex ecosystem of the human body, the intestinal microbiota is in dynamic balance with the host and plays an irreplaceable role in nutrient metabolism. Increased availability of high-calorie food and the sedentary lifestyle society has adopted, have significantly increased the incidence of obesity and associated pathologies, as type 2 diabetes, during the past years. In this context, microbiota has a pivotal role influencing homeostatic mechanisms either to the benefit or detriment of host health. The extent of this effect and the complete mechanism are still not fully understood. A deeper insight into gut microbiota contribution to host pathophysiology will open new therapeutic opportunities to tackle the global obesity epidemic. Consumption of dietary fibers has been associated with improved systemic metabolic health, including decreased body weight and improved glucose control. Gut microbiota can use dietary fibers as a substrate for fermentation, resulting in the production of short chain fatty acids (SCFA), mainly acetate, propionate, and butyrate. These seem to be the link between diet and host health. Interesting, it has been shown in mice that not the SCFA gut concentrations, but their rate of uptake by the host correlates with the observed health improvement. This would indicate that SCFA exert their effect at least in part by affecting other tissues. Together with this, SCFA concentrations are often measured from fecal samples that represent the net result of SCFA production, absorption, metabolization, and final excretion, underestimating their complete contribution to host metabolism. The above highlights the importance to understand this complex process *in situ*. However, studying the inner world of gut microbiota fermentation and how its products, as SCFA, affect whole-body metabolism comes with major challenges.

Part I. Fermentation of non-digestible carbohydrates and production of short-chain fatty acids in the gut and the systemic metabolic fate of SCFA

In **chapter 2** we aimed to tackle this gap of knowledge by studying the acute fermentation of a mixture of the non-digestible carbohydrates (NDC) fructo-oligosaccharides (FOS) and galacto-oligosaccharides (GOS) *in vivo* by using as a sampling and delivery tool a naso-intestinal catheter. For this study the naso-intestinal catheter was positioned in the distal ileum or colon. At the start of the test day, all subjects consumed orally an NDC bolus with 5 g FOS and 5 g GOS. After 120 minutes, isotopically ¹³C-labeled acetate, propionate and butyrate were delivered directly in the intestinal lumen to assess SCFA kinetics. At baseline and after NDC consumption, intestinal content, blood, and breath samples were collected in a timed fashion. For the acute luminal kinetic study, most of the data is from the distal ileum due to difficulties in positioning or sampling in the colon. No changes were found in

FOS:GOS composition ratios in the distal ileum over time when compared to these ratios in the original bolus. The relative composition of microbiota changed rapidly during the test day. After isotope delivery, intraluminal SCFA enrichment patterns did not change significantly, and no bacterial SCFA cross-feeding was detected during the time the isotopes remained at the sampling location. These results would indicate that in the part of the human distal ileum which could be sampled, no fermentation of the selected NDC could be detected. Nevertheless, the FOS:GOS mix was most likely fermented more distal in the intestine, in the colon, as indicated by increased proxies for microbial fermentation.

FOS and GOS contain molecules of different sizes and linkages and knowledge about their digestibility throughout the small intestine in humans is scarce. From the same clinical study performed in chapter 2, in **chapter 3** we took a closer look at the breakdown of this selected NDC mix in the small intestine. Our findings show that FOS with a degree of polymerization (DP) equal or over 2 ($DP \geq 2$) and GOS of $DP \geq 3$ were not digested in the small intestine, while most of the GOS $DP=2$ fraction was hydrolyzed in a structure-dependent fashion. This knowledge helps the future development of a tailored GOS prebiotic that can reach the colon unaffected for microbial fermentation. After NDC are fermented, the microbial products, SCFA, can be taken up by the host. In **chapter 2** after measuring the ^{13}C incorporation from the delivered SCFA into host metabolites in plasma, our data indicate that SCFA were vividly taken up and metabolized by the host. Acetate and butyrate were substrates for citrate production and ^{13}C from all three SCFA were incorporated into glucose. Butyrate was the most efficient in label transfer to glucose followed by propionate, but only propionate can contribute to net glucose production. By our estimations, made through a computational model, 20% of the propionate delivered in the intestine ended up in glucose production. In all subjects, fasted during the measurements, the delivered ^{13}C -SCFA were rapidly oxidized, indicated by the immediate release of $^{13}\text{CO}_2$ in breath. No other major enrichments were found in other host metabolites in plasma.

To study colonic NDC fermentation in a less burdensome way for volunteers, new gastrointestinal capsules for luminal delivery and sampling are under development. They are taken in orally and leave the body by defecation. At a timed moment, samples can be delivered or taken. As a consequence, there is a delay in time of sampling and time of harvesting the capsule. The first challenge is to stabilize the sample within the capsule until it is excreted to avoid further fermentation. The second challenge is to optimize analytical protocols to the small sample volume in the presence of the preloaded volume of stabilizing reagent, such that as many analyses as possible can be performed from each capsule. To tackle this obstacles, in **chapter 4**



we developed a safe quenching reagent to be preloaded in gastrointestinal capsules that completely blocked FOS and GOS fermentation and SCFA production for up to 48 hours. Together with this, we present a complete workflow for analyzing NDC, microbiota and SCFA profile in the presence of such reagent in a mixed analytical protocol. This work is the basis for a more extensive analytical approach to also study other gut microbial processes. The toolbox develop in **chapter 4** helps prepare the road for the use of this novel technology in this rapidly developing research field.

Part II. Tissue-specific effects of butyrate on fuel handling

As stated above, SCFA can influence host health by a combination of their local effects in the gut and their effects on other organs after absorption into the body. In turn, the effect of SCFA on other organs can be through a direct effect on the tissue or an indirect effect due to inter-organ crosstalk. In **chapter 5** and **chapter 6** we focused on the direct effect of butyrate, the most studied SCFA, in liver and skeletal muscle metabolism, two important metabolic organs.

Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) is the hepatic manifestation of obesity, characterized by hepatic triglyceride accumulation (steatosis). In patients, reduced levels of butyrate are associated with more advance liver disease. In rodents, supplementation of butyrate or butyrate-producing bacteria decreases hepatic lipogenesis and increased liver β -oxidation. In **chapter 5**, we aimed to elucidate the direct effect of butyrate on the liver by using murine precision-cut liver slices (PCLSs), a promising tool that recapitulates the multicellular architecture of the liver. This *ex vivo* model was optimized to mimic early stage MAFLD by varying the concentrations of fructose, insulin, palmitic acid and oleic acid in the culture media. The selected condition showed increased fat accumulation without affecting the viability of the PCLSs. Butyrate did not prevent this steatosis, but rather had a tendency to increase the fat accumulation. Moreover, it lowered the expression of genes encoding for fatty acid oxidation and only increased butyrylcarnitine, which indicates that butyrate serves as a metabolic substrate. The fact that butyrate elicits a decrease in steatosis *in vivo*, but not in PCLSs, suggests that the regulatory role of butyrate can be a consequence of inter-organ crosstalk. However, as a direct hepatic effect, butyrate lowered the fibrotic response of PCLSs, as shown by reduced gene expression of fibronectin, alpha-smooth muscle actin and osteopontin, and protein levels of type I collagen. These results suggest that in the liver, butyrate alone does not increase lipid β -oxidation directly but might aid in the prevention of the transition of MAFLD to steatohepatitis.

After partial metabolization by the liver, a portion of the SCFA produced in the gut can reach peripheral organs. The skeletal muscle is a major site of insulin-stimulated glucose uptake and plays a critical role in glucose homeostasis. Insulin resistance is a key pathophysiological feature that precedes the development of type 2 diabetes, an obesity-associated pathology. Butyrate has been shown to prevent systemic insulin resistance, and this effect has been attributed to an HDAC-mediated transcription regulation and to activation of mitochondrial fatty-acid oxidation. In **chapter 6** we addressed the interplay between butyrate and the long-chain fatty acid palmitate and investigated how transcription, signalling and metabolism are integrated to result in the butyrate-induced skeletal muscle remodeling. Butyrate enhanced insulin sensitivity in palmitate-treated, insulin-resistant C2C12 cells without affecting long-chain fatty-acid oxidation capacity and other functional respiration parameters. Nonetheless, butyrate did upregulate mitochondrial proteins involved in its own oxidation, as well as concentrations of butyrylcarnitine and hydroxybutyrylcarnitine. By knocking down the gene encoding medium-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase (MCKAT, *Acaaz*), butyrate oxidation was inhibited, which amplified the effects of the SCFA on insulin sensitivity and glycolysis. This response was associated with enhanced HDAC inhibition, based on histone 3 acetylation levels. These led us to propose that butyrate catabolism functions as an escape valve that attenuates HDAC inhibition, thus, blocking butyrate oxidation indirectly prevents insulin resistance.

In **chapters 4** and **chapter 5** I described the different effects of butyrate in liver and skeletal muscle and contrary to earlier studies, butyrate did not regulate long-chain fatty acid oxidation. Instead, butyrate was actively metabolized in both organs. This suggests that enhanced energy expenditure observed in *in vivo* studies in humans and rodents might be indicative of increased butyrate oxidation. These counteracting effects of butyrate as a metabolic regulator and as metabolic substrate is of high interest for future studies. Understanding the interplay between the different butyrate intracellular roles needs to be taken in consideration when developing butyrate as an intervention for metabolic diseases.



SAMENVATTING

In het complexe ecosysteem van het menselijk lichaam is de microbiota in de darm in dynamisch evenwicht met de gastheer en speelt het een onvervangbare rol in het metabolisme van voedingsstoffen. De toegenomen beschikbaarheid van calorierijk voedsel en de sedentaire levensstijl in de samenleving hebben de incidentie van obesitas en bijbehorende pathologie, zoals diabetes type 2, de afgelopen jaren aanzienlijk verhoogd. In deze context speelt de microbiota een cruciale rol bij het beïnvloeden van homeostatische mechanismen, zowel ten voordele als ten nadele van de gezondheid van de gast. De omvang van dit effect en het mechanisme zijn nog steeds niet volledig begrepen. Een dieper inzicht in de bijdrage van de microbiota in de darm aan de pathofysiologie van de gast zal nieuwe therapeutische mogelijkheden bieden om de wereldwijde obesitas-epidemie aan te pakken. Consumptie van voedingsvezels wordt in verband gebracht met een verbeterde systemische metabole gezondheid van de gast, waaronder een verminderd lichaamsgewicht en verbeterde glucoseregulatie. De microbiota in de darm kan voedingsvezels gebruiken als substraat voor fermentatie, wat resulteert in de productie van korte keten vetzuren (short chain fatty acids, SCFA), voornamelijk acetaat, propionaat en butyraat. Deze lijken voeding en de gezondheid van de gast te verbinden. Interessant is dat bij muizen niet de SCFA concentraties in de darm, maar hun opnamesnelheid door de gast gecorreleerd is met de waargenomen gezondheidsverbetering. Dit wijst erop dat SCFA hun effect ten dele uitoefenen door andere weefsels te beïnvloeden. Het betekent dat metingen van SCFA-concentraties in fecale monsters geen duidelijkheid kunnen verschaffen over de bijdrage van SCFA aan het metabolisme van de gast omdat zij het nettoresultaat zijn van SCFA-productie, absorptie, metabolisatie en uiteindelijke uitscheiding. Het bovenstaande benadrukt het belang om dit complexe proces *in situ* te begrijpen. Het bestuderen van de fermentatie van voedingsvezels door de microbiota in de darm en hoe de producten het metabolisme van het gehele lichaam van de gast beïnvloeden, brengt grote uitdagingen met zich mee.

Deel I. Fermentatie van niet-verteerbare koolhydraten en productie van vetzuren met een korte keten in de darm en het systemische metabole bestemming van SCFA

In **hoofdstuk 2** wilden we deze kenniskloof aanpakken door de acute fermentatie van een mengsel van de niet-verteerbare koolhydraten (NDC) fructo-oligosachariden (FOS) en galacto-oligosachariden (GOS) *in vivo* te bestuderen door gebruik te maken van een darmsonde die via de neus kon worden ingebracht om in de darm ter plekke materiaal toe te dienen en monsters te nemen. Voor dit onderzoek werd de sonde in het distale ileum of colon geplaatst. Aan het begin van de testdag consumeerden alle proefpersonen, die overnacht gevast waren, een orale NDC-bolus met 5 g FOS

en 5 g GOS. De SCFA-kinetiek werd gemeten door 120 minuten na de NDC-bolus stabiel isotoop ^{13}C -gelabeld acetaat, propionaat en butyraat via de sonde in het darmlumen te infunderen. Voor en na NDC-consumptie werden op gezette tijden monsters genomen van de darminhoud, bloed en uitademingslucht. Voor het acute luminale kinetische onderzoek zijn de meeste gegevens afkomstig van het distale ileum vanwege problemen bij het positioneren of nemen van monsters in de dikke darm. Tijdens het 6 tot 8 uur durende experiment vonden er in het distale ileum geen veranderingen plaats in de verhouding en samenstelling van FOS:GOS mengsel in vergelijking met de oorspronkelijke bolus. De relatieve samenstelling van de microbiota veranderde snel tijdens de testdag. Na isotopeninfusie werden er geen significante veranderingen gevonden in de intraluminale SCFA-verrijkingsspatronen, en werden er geen aanwijzingen gevonden voor bacteriële SCFA-kruisvoeding. Deze resultaten zouden erop wijzen dat in het deel van het menselijke distale ileum dat bemonsterd kon worden, geen fermentatie van het geselecteerde NDC kon worden gedetecteerd. Desalniettemin werd de FOS:GOS-mix hoogstwaarschijnlijk meer distaal in de darm, in de dikke darm, gefermenteerd, zoals bleek uit de verhoogde inbouw van SCFA uit microbiële fermentatie in metaboliëten in de gast.

FOS en GOS bevatten moleculen van verschillende groottes en verbindingen en kennis over hun verteerbaarheid in de dunne darm bij mensen is schaars. Uit dezelfde klinische studie in hoofdstuk 2 hebben we in **hoofdstuk 3** de afbraak van deze geselecteerde NDC-mix in de dunne darm nader bekeken. Onze bevindingen tonen aan dat FOS met een polymerisatiegraad (degree of polymerization, DP) gelijk aan of hoger dan 2 ($\text{DP} \geq 2$) en GOS van $\text{DP} \geq 3$ niet verteerd werden in de dunne darm, terwijl het grootste deel van de GOS $\text{DP} = 2$ fractie gehydrolyseerd werd afhankelijk van de structuur. Deze kennis helpt de toekomstige ontwikkeling van een GOS-prebioticum op maat dat de dikke darm kan bereiken zonder dat dit wordt gefermenteerd door de microbiota in de dunne darm. Nadat NDC is gefermenteerd, kunnen de microbiële producten, SCFA, door de gast worden opgenomen. In **hoofdstuk 2**, na meting van de ^{13}C -inbouw uit geïnfundeerde SCFA in metaboliëten van de gast in plasma, bleek dat SCFA snel werd opgenomen en gemetaboliseerd door de gast. Acetaat en butyraat waren substraten voor de productie van citraat en ^{13}C van alle drie SCFA werden in glucose opgenomen. Butyraat was het meest efficiënt in labeloverdracht naar glucose, gevolgd door propionaat, maar alleen propionaat kan bijdragen aan de netto glucoseproductie. Volgens onze schattingen, gemaakt via een rekenmodel, werd 20% van het propionaat dat in de darm werd vrijgemaakt gebruikt voor de synthese van glucose. Bij alle proefpersonen, werden de geleverde ^{13}C SCFA snel geoxideerd, wat wordt aangegeven door de onmiddellijke afgifte van $^{13}\text{CO}_2$ in de adem. Er werden geen belangrijke verrijkingen gevonden in andere metaboliëten in plasma van de gast.



Om fermentatie van NDC in colon op een minder belastende manier in vrijwilligers te bestuderen, zijn nieuwe gastro-intestinale capsules voor luminale levering en bemonstering in ontwikkeling. Ze worden oraal ingenomen en verlaten het lichaam via de ontlasting. Monsternamen en materiaalinfusies kunnen via een externe controller getriggerd worden. Als gevolg hiervan is er een tijdsverschil tussen het tijdstip van bemonstering en het tijdstip van verzamelen van de capsules. De eerste uitdaging is om het monster in de capsule te stabiliseren om verdere fermentatie te voorkomen totdat de capsule wordt uitgescheiden. De tweede uitdaging is om analytische protocollen te optimaliseren voor het kleine monstervolume in aanwezigheid van het vooraf geladen volume stabilisatiereagens, zodat zoveel mogelijk analyses per capsule kunnen worden uitgevoerd. Om deze obstakels aan te pakken, hebben we in **hoofdstuk 4** een reagens ontwikkeld dat de reacties stopt en veilig is voor de proefpersoon en dat vooraf kan worden geladen in gastro-intestinale capsules zodanig dat de fermentatie van FOS- en GOS en productie van SCFA tot 48 uur na monsternamen volledig geblokkeerd is. Daarnaast wordt in een analytisch protocol een complete workflow gepresenteerd voor het analyseren van NDC, microbiota en SCFA-profiel in zeer kleine volumina in aanwezigheid van een dergelijk reagens. Dit werk vormt de basis voor een meer uitgebreide analytische benadering om ook andere microbiële processen in de darm te bestuderen. De toolbox die in **hoofdstuk 4** werd ontwikkeld, helpt bij het in gebruik nemen van deze nieuwe technologie in dit zich snel ontwikkelende onderzoeksgebied.

Deel II. Weefsel-specifieke effecten van butyraat op de omgang met brandstof

Zoals hierboven vermeld, kan SCFA de gezondheid van de gast beïnvloeden door een combinatie van hun lokale effecten in de darm en hun effecten op andere organen na opname door de gast. Het effect van SCFA op andere organen kan een direct effect zijn op het weefsel of een indirect effect als gevolg van interorgaanrelaties. In **hoofdstuk 5** en **hoofdstuk 6** hebben we ons gericht op het directe effect van butyraat, het meest bestudeerde SCFA, op het metabolisme van de lever en skeletspier, twee belangrijke metabole organen.

Metabool geassocieerde leververvetting (MAFLD) is de hepatische manifestatie van obesitas, gekenmerkt door stapeling van triglyceriden in de lever (hepatosteatose). Bij patiënten worden verlaagde niveaus van butyraat geassocieerd met gevorderde leverziekte. Suppletie van butyraat of butyraat-producerende bacteriën bij knaagdieren vermindert de vetzuursynthese en verhoogt de vetzuuroxidatie in de lever. In **hoofdstuk 5** wilden we het directe effect van butyraat op de lever ophelderen door gebruik te maken van precisie gesneden leverschijfjes (PCLS's), een veelbelovend hulpmiddel dat de multicellulaire architectuur van de lever

behoudt. Dit *ex vivo*-model is geoptimaliseerd om MAFLD in een vroeg stadium na te bootsen door de concentraties fructose, insuline, palmitinezuur en oliezuur in de kweekmedia te variëren. De geselecteerde conditie vertoonde verhoogde vetophoping zonder de levensvatbaarheid van de PCLS's te beïnvloeden. Butyraat verhinderde de vetophoping niet, maar had eerder de neiging om deze te verhogen. Bovendien verlaagde het de expressie van genen die coderen voor vetzuuroxidatie en verhoogde het alleen butyrylcarnitine, wat aangaf dat butyraat diende als een metabool substraat. Het feit dat butyraat een afname van de steatose *in vivo* veroorzaakt, maar niet in PCLS's, suggereert dat de regulerende rol van butyraat een gevolg kan zijn van metabole interorgaan relaties. Als een direct effect op de lever verlaagde butyraat echter de fibrotische respons van PCLS's, zoals bleek uit de verminderde genexpressie van fibronectine, alfa-gladde spier actine en osteopontine, en eiwitniveaus van type I collageen. Deze resultaten suggereren dat in de lever butyraat alleen de vetzuuroxidatie niet direct verhoogt, maar kan helpen bij het voorkomen van de overgang van MAFLD naar steatohepatitis.

Na gedeeltelijke metabolisatie door de lever, kan een deel van de SCFA die in de darm wordt geproduceerd, perifere organen bereiken. De skeletspier is een belangrijke plaats van insuline-gestimuleerde glucoseopname en speelt een cruciale rol bij de glucosehomeostase. Insulineresistentie is een belangrijk pathofysiologisch kenmerk dat voorafgaat aan de ontwikkeling van type 2 diabetes, een met obesitas geassocieerde pathologie. Van butyraat is aangetoond dat het systemische insulineresistentie voorkomt, en dit effect is toegeschreven aan een HDAC-gemedieerde transcriptieregulatie en aan activering van mitochondriale vetzuuroxidatie. In **hoofdstuk 6** hebben we het samenspel tussen butyraat en het lange-keten vetzuur palmitine zuur besproken en onderzocht hoe transcriptie, signalering en metabolisme zijn geïntegreerd om te resulteren in de door butyraat geïnduceerde remodellering van het metabolisme van de skeletspier. Butyraat verhoogde de insulinegevoeligheid in met palmitaat behandelde, insulineresistente C2C12-cellen zonder de oxidatiecapaciteit van lange ketens en andere functionele ademhalingsparameters te beïnvloeden. Desalniettemin reguleerde butyraat mitochondriale eiwitten die betrokken zijn bij zijn eigen oxidatie, evenals concentraties van butyrylcarnitine en hydroxybutyrylcarnitine. Door de expressie van het gen te blokkeren dat codeert voor 3-ketoacyl-CoA-thiolase voor middellange keten (MCKAT, *Acaa2*), werd de oxidatie van butyraat geremd, wat de effecten van SCFA op insulinegevoeligheid en glycolyse versterkte. Deze respons was geassocieerd met verhoogde HDAC-remming, gebaseerd op het niveau van de histon 3-acetylering. Dit bracht ons ertoe te suggereren dat butyraat katabolisme functioneert als een uitlaatklep die HDAC-remming verzwakt, waardoor de blokkade van butyraatoxidatie indirect insulineresistentie voorkomt.



In **hoofdstuk 4** en **hoofdstuk 5** heb ik de verschillende effecten van butyraat in lever en skeletspieren beschreven en in tegenstelling tot eerdere studies reguleerde butyraat de lange-keten vetzuuroxidatie niet. In plaats daarvan werd butyraat actief gemetaboliseerd in beide organen. Dit suggereert dat een verhoogd energieverbruik, waargenomen in *in vivo* studies bij mensen en knaagdieren, een aanwijzing kan zijn voor verhoogde butyraatoxidatie. Deze tegenwerkende effecten van butyraat als metabole regulator en als metabool substraat zijn van groot belang voor toekomstige studies. Het begrijpen van de wisselwerking tussen de verschillende intracellulaire rollen van butyraat moet in overweging worden genomen bij het ontwikkelen van butyraat als een interventie voor metabole ziekten.



RESUMEN

En el complejo ecosistema del cuerpo humano, la microbiota intestinal está en equilibrio dinámico con el huésped y juega un papel insustituible en el metabolismo de nutrientes. La mayor disponibilidad de alimentos hipercalóricos y el estilo de vida sedentario que ha adoptado la sociedad, han incrementado significativamente la incidencia de obesidad y patologías asociadas, como diabetes tipo 2, durante los últimos años. En este contexto, la microbiota tiene un papel fundamental en los mecanismos homeostáticos, ya sea en beneficio o en deterioro de la salud del huésped. El alcance de este efecto y su mecanismo aún no se comprende completamente. Una visión más profunda de la contribución de la microbiota intestinal a la fisiopatología del huésped abrirá nuevas oportunidades terapéuticas para combatir la epidemia mundial de obesidad. El consumo de fibras dietéticas se ha asociado con una mejor salud a nivel sistémico, incluyendo disminución del peso corporal y un mejor control de los niveles de glucosa. La microbiota intestinal puede usar fibras dietéticas como sustrato de fermentación, lo que resulta en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato. Estos AGCC parecen ser el vínculo entre la dieta y la salud del huésped. Interesantemente, se ha demostrado en ratones que no las concentraciones intestinales de AGCC, sino que su tasa de absorción por parte del huésped se correlaciona con la observada mejora de salud. Esto indicaría que los AGCC ejercen su efecto, al menos en parte, afectando a otros tejidos. Junto con esto, las concentraciones de AGCC a menudo se miden a partir de muestras fecales que representan el resultado neto de la producción, absorción, metabolización y excreción final de AGCC, subestimando su contribución completa al metabolismo del huésped. Lo anterior destaca la importancia de entender este complejo proceso *in situ*. Sin embargo, estudiar el mundo interno de la fermentación de la microbiota intestinal y cómo sus productos, AGCC, afectan el metabolismo de todo el cuerpo presenta grandes desafíos.

Parte I. Fermentación de carbohidratos no digeribles y producción de ácidos grasos de cadena corta en el intestino y el destino metabólico sistémico de AGCC

En el **capítulo 2**, nuestro objetivo fue abordar esta brecha de conocimiento mediante el estudio de la fermentación aguda de una mezcla de carbohidratos no digeribles (CND), fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS) *in vivo* utilizando un catéter naso-intestinal como herramienta de entrega y muestreo. Para este estudio se colocó el catéter naso-intestinal en la parte más distal del íleon distal o en el colon. Al comienzo del día de prueba, todos los sujetos consumieron por vía oral un bolo de CND con 5 g de FOS y 5 g de GOS. Después de 120 minutos, se administró directamente en el intestino acetato, propionato y butirato marcados isotópicamente

con ^{13}C para evaluar la cinética de los AGCC. Al inicio del estudio y después del consumo de CND, se recolectaron muestras de contenido intestinal, sangre y aliento de manera cronometrada. Para el estudio de la cinética de fermentación, la mayoría de los datos provienen del íleon distal debido a las dificultades de posicionamiento o muestreo en el colon. No se encontraron cambios en las proporciones de composición de FOS:GOS en el íleon distal a lo largo del tiempo en comparación con estas proporciones en el bolo original. La composición relativa de la microbiota cambió rápidamente durante el día de la prueba. Después de la administración de isótopos, los patrones de enriquecimiento de AGCC en el lumen intestinal no cambiaron significativamente y no se detectó ninguna interconversión bacteriana de AGCC durante el tiempo que los isótopos permanecieron en el lugar de muestreo. Estos resultados indicarían que en la parte del íleon distal que se pudo muestrear, no se pudo detectar fermentación de la mezcla de CND seleccionada. Sin embargo, la mezcla de FOS:GOS probablemente se fermentó más distalmente en el intestino, en el colon, como lo indica el aumento de los indicadores indirectos de fermentación microbiana.

FOS y GOS contienen moléculas de diferentes tamaños y enlaces, y el conocimiento sobre su digestibilidad a lo largo del intestino delgado en humanos es escaso. Del mismo estudio clínico presentado en el capítulo 2, en el **capítulo 3** miramos más de cerca la degradación de estos CND en el intestino delgado. Nuestros hallazgos muestran que los FOS con un grado de polimerización (GP) igual o superior a 2 ($\text{GP} \geq 2$) y los GOS de $\text{GP} \geq 3$ no fueron digeridos en el intestino delgado, mientras que la mayor parte de la fracción de GOS $\text{GP} = 2$ fue hidrolizada de manera dependiente a su estructura. Este conocimiento ayudará al desarrollo personalizado de GOS como prebiótico que pueda llegar al colon sin verse afectado previo a la fermentación microbiana. Después de que los CND se fermentan, los productos de este proceso microbiano, los AGCC, pueden ser absorbidos por el huésped. En el **capítulo 2**, después de medir la incorporación de ^{13}C de los AGCC administrados directamente en el lumen intestinal, en los metabolitos del huésped en el plasma, nuestros datos indican que los AGCC fueron absorbidos y metabolizados intensamente. El acetato y el butirato fueron sustratos para la producción de citrato y los ^{13}C de los tres AGCC se incorporaron en las moléculas de glucosa. El butirato fue el más eficaz en la transferencia de marca a la glucosa, seguido del propionato, pero solo el propionato puede contribuir a la producción neta de glucosa. Según nuestras estimaciones realizadas a través de un modelo computacional, el 20% del propionato entregado en el intestino terminó en la síntesis de glucosa. En todos los sujetos (en ayunas durante las mediciones) los ^{13}C -AGCC suministrados se oxidaron rápidamente, indicado por la liberación inmediata de $^{13}\text{CO}_2$ en el aliento. No se encontraron otros enriquecimientos importantes en otros metabolitos en las muestras de plasma.



Para estudiar la fermentación de los CND en el colon de una manera menos invasiva para los voluntarios, se están desarrollando nuevas cápsulas gastrointestinales para la administración y el muestreo del lumen intestinal. Se toman por vía oral y abandonan el cuerpo por defecación. En un momento cronometrado, se pueden entregar o tomar muestras. Como consecuencia, hay un retraso en el tiempo de muestreo y en el tiempo de recolección de la muestra de la cápsula. El primer desafío es estabilizar la muestra dentro de la cápsula hasta que se excrete para evitar que la fermentación continúe. El segundo desafío es optimizar los protocolos analíticos para poder ser usados utilizando el mínimo volumen de muestra en presencia del volumen precargado de reactivo estabilizador, así se pueden ampliar la cantidad de análisis posibles con cada cápsula. Para abordar estos obstáculos, en el **capítulo 4** desarrollamos un reactivo estabilizador seguro para humanos para ser precargado en cápsulas gastrointestinales que bloquearon completamente la fermentación de FOS y GOS y la producción de AGCC por hasta 48 horas. Junto con esto, presentamos un esquema de trabajo para analizar el perfil de los CND, la microbiota y los AGCC en presencia de dicho reactivo en un protocolo analítico sin necesidad de dividir la muestra. Este trabajo es la base para un enfoque analítico más extenso para estudiar también otros procesos microbianos intestinales. La caja de herramientas desarrollada en el **capítulo 4** ayuda a preparar el camino para el uso de esta nueva tecnología en este campo de investigación en rápido desarrollo.

Parte II. Efectos directos del butirato en el metabolismo de manera tejido específica

Como se indicó anteriormente, los AGCC pueden influir en la salud del huésped mediante una combinación de sus efectos locales, en el intestino, y sus efectos en otros órganos después de su absorción. A su vez, el efecto de esto AGCC sobre otros órganos puede ser a través de un efecto directo sobre el tejido o un efecto indirecto debido a la comunicación entre órganos. En el **capítulos 5** y el **capítulo 6** nos centramos en el efecto directo del butirato, el AGCC más estudiado, en el metabolismo del hígado y del músculo esquelético, dos importantes órganos metabólicos.

La enfermedad del hígado graso asociado al metabolismo (MAFLD, por sus siglas en inglés de metabolic associated fatty liver disease) es la manifestación hepática de la obesidad, caracterizada por la acumulación de triglicéridos en el hígado (esteatosis). En pacientes, los niveles reducidos de butirato se asocian con una enfermedad hepática más avanzada. En roedores, la suplementación con butirato o bacterias productoras de butirato disminuye la lipogénesis hepática y aumenta la β -oxidación en el hígado. En el **capítulo 5**, nuestro objetivo era dilucidar el efecto directo del butirato en el hígado mediante el uso de cortes de hígado murino en

forma de rodajas (PCLS, por sus siglas en inglés de precision-cut liver slices), una herramienta prometedora que recapitula la arquitectura multicelular del hígado. Este modelo *ex vivo* se optimizó para imitar la etapa temprana de MAFLD variando las concentraciones de fructosa, insulina, ácido palmítico y ácido oleico en los medios de cultivo. La condición seleccionada mostró una mayor acumulación de grasa sin afectar la viabilidad de las PCLS. El butirato no impidió la esteatosis, sino que tendió a aumentar la acumulación de grasa. Además, redujo la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos y aumentó la butirilcarnitina, lo que indica que el butirato sirve mayoritariamente como sustrato metabólico. El hecho de que el butirato provoque una disminución de la esteatosis *in vivo*, pero no en las PCLS, sugiere que el papel regulador del butirato puede ser una consecuencia de la comunicación entre órganos. Sin embargo, como efecto hepático directo, el butirato redujo la respuesta fibrótica de las PCLS, como lo demuestra la reducción de la expresión del gen para fibronectina, la actina de músculo liso, y para osteopontina. Además disminuyó los niveles de colágeno tipo I. Estos resultados sugieren que en el hígado, el butirato no aumenta directamente la β -oxidación de lípidos, pero podría ayudar a prevenir la transición de MAFLD a esteatohepatitis.

Después de la metabolización parcial por parte del hígado, una parte de los AGCC producidos en el intestino puede llegar a órganos periféricos. El músculo esquelético es un importante captador de glucosa estimulada por insulina y desempeña un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa. La resistencia a la insulina es una característica fisiopatológica clave que precede al desarrollo de la diabetes tipo 2, una patología asociada a la obesidad. Se ha demostrado que el butirato previene la resistencia a la insulina de manera sistémica, y este efecto se ha atribuido a una regulación de la transcripción mediada por HDAC y a la activación de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria. En el **capítulo 6** abordamos la interacción entre el butirato y el ácido graso de cadena larga palmitato e investigamos cómo se integran la transcripción, transducción de señales y el metabolismo para dar como resultado la remodelación del músculo esquelético inducida por butirato. El butirato aumentó la sensibilidad a la insulina en células C2C12 resistentes a la insulina tratadas con palmitato sin afectar la capacidad de oxidación de ácidos grasos de cadena larga y otros parámetros de respiración celular. No obstante, el butirato aumentó la expresión de las proteínas mitocondriales involucradas en su propia oxidación, así como las concentraciones de butirilcarnitina e hidroxibutirilcarnitina. Tras *knocking down* el gen que codifica la 3-cetoacil-CoA tiolasa de cadena media (MCKAT, Acaa2), se inhibió la oxidación del butirato, y esto amplificó los efectos de los AGCC en la sensibilidad a la insulina y la glicólisis. Esta respuesta se asoció con una mayor inhibición de HDAC, según los niveles de acetilación de la histona 3. Esto nos llevó



a proponer que el catabolismo del butirato funciona como una válvula de escape que atenúa la inhibición de la HDAC, por lo que el bloqueo de la oxidación del butirato previene indirectamente la resistencia a la insulina.

En los **capítulos 4 y 5** describí los diferentes efectos del butirato en el hígado y el músculo esquelético y, contrariamente a estudios anteriores, el butirato no reguló la oxidación de ácidos grasos de cadena larga. En cambio, el butirato se metabolizó activamente en ambos órganos. Esto sugiere que el mayor gasto de energía observado en estudios *in vivo* en humanos y roedores podría ser indicativo de una mayor oxidación de butirato. Estos efectos opuestos del butirato como regulador metabólico y como sustrato metabólico son de gran interés para futuros estudios. Es necesario tener en cuenta la interacción entre las diferentes funciones intracelulares del butirato al desarrollar el butirato como una intervención para enfermedades metabólicas.



ACKNOWLEDGEMENTS / AGRADECIMIENTOS

As this journey ends, I would like to thank to all the people that help me make this thesis possible and supported me in and out of the lab through the biggest adventure of my life (so far).

Dear **Albert**, of course I would start with you. I think that thank you doesn't begin to cover how important you were in my life. You are an absolute great scientist and friend. You always took me out of my comfort zone to learn new things, but you always had my back. Thank you for being there for me every step of the way in all the funny and excitement moments, but also in the not so good ones. I knew I could always go to you, and that meant everything to me. Alberto, thank you from the bottom of my heart, and I'm sorry if I continue bothering you even if I'm not in Barbara's group hahaha. Pineapple!!!

Dear Barbara and Dirk-Jan, first of all thank you so much for giving me the opportunity to be part of your research group, you've no idea how exciting was to receive the *job offer* email back in 2017. Dear **Barbara**, you are for me the greatest example of women in science! I will always be impressed by your passion for science, your intelligence, your management/organizational skills and your work ethic. I think that the Melany that started the PhD is definitely not the same Melany that finished it, and I thank you for helping me build my confidence, for guiding me, for all the scientific discussion, the manuscript feedback and always always pushing me to do the things that scared me the most. You have help me grow into the scientist I am today. Thank you for all the support and for always caring. Dear **Dirk-Jan**, you have been my mentor through this complete thesis. Your love for science combined with your sense of humor were the perfect mix for my daily supervisor. I loved how comfortable it was to talk to you, I loved that I could go to you and ask you the same thing over and over again until I understood it. Probably that wasn't so fun for you ahahaha but you were always there through all my frustration telling me *Melany, you'll get it*. This was invaluable. Thank you for always making the time to help me with the presentations, for all the scientific feedback, for being with me through all the different road trips for the CCC meetings and all the ups and downs of the human study. *You can only see the tail of the cow once the cow has passed in front of you, that's how you learn*, Thank you Dirk-Jan!

I would also like to extend my deepest gratitude to all members of the PhD committee **Prof. Ronald Wanders, Prof. Folkert Kuipers, Prof. Max Nieuwdorp, Dr. Elaine Vaughan, Dr. Rebecca HeinerFokkema** and **Prof Jingyuan YangFu** for taking the time to evaluate this thesis and joining my PhD defense.

I would also like to thank all **co-authors** and **collaborators** for all your valuable contributions to the manuscripts presented in this thesis. Thank you to all the researchers and industrial partners involved in the **CarboKinetics** consortium for all the scientific feedback and fruitful meetings. Especially to my WUR team: **Guido** and Mara, I'm very happy we did this project together! Thank you for all the scientific input and also the good times during the human study and all the CCC meetings. **Mara**, my person for most of my thesis, I'm so happy we got to do all of this challenge together. You are such an incredible scientist, I have learned so much from you! And on top of that you are this super cool, fun person with a great style! Thank you for all your support when things were difficult, for sharing with me the frustration moments, but also thank you for celebrating with me when things worked out! I remember when we published our first paper, we were so nervous during submission!, but then when it was done I received in my house a colorful hand written letter from you celebrating our achievement. That's the type of person that you are, and I'm beyond happy to have you as my paranymp in this special day. Also thank you to all the people that helped to successfully finish the human study at Wageningen University and the **Ziekenhuis Gelderse Valley**. Furthermore, thank you to all my collaborators at RUG and UMCG, especially to **Peter Olinga, Gerian Prins, Rebecca Heiner-Fokkema, Theo Boer and Martijn Koehorst**. Thank you for your enthusiasm and all your help during this thesis. It wouldn't have been possible without all of you!

Dear **Barbara's group**, The Barbies!, I think that my whole experience in Groningen was as amazing as it was because I ended up with you. During my first year, 2 of the most amazing persons joined Barbara's group. Little I knew how important this 2 brilliant scientists with completely different souls but with the same huge heart were going to be with me for the rest of this ride! **Marcel**, my paranymp, my friend, my neighbor, my scientific partner, I cannot thank enough that life put you in my path. Marceu, you have been, with no doubt, my safe space, and the greatest friend I could ask for. I love that you are so many different persons wrapped in one tall person, I love I got to know all of your sides! You are as fun, and caring as you are Intelligent, efficient and organized. It has been a real pleasure to have learn with and from you! Thank you for always been there for drinks, food, Eurovisions, frustrations, sport attempts, attempts of you trying to make me like Ru Paul, dancing, westernblotting, custom parties all in!, eating my leftovers, taking me to get vaccinations, and overall taking care of each other. **Bernard**, uuuuf if the closet behind us could talk!!!! (well, is not that we were not loud enough for people to hear us hahaha). Cutie, you are by far my inner animal hahaha, and I hope it goes without saying how much I admire you not only for your amazing scientific skills but your completely out of this world creative way of thinking! Thank you for understanding me, for being so authentic



and allow me to be authentic as well. Thank you for all your advices, for never judging, and for always making me laugh! You (and mama xD) got me through so much! Thank you cuties! And remember... *we will always have Bergen*. As my PhD journey continue with this 2 characters, in our third year 3 more baby PhD joined the group. Little **José**, you are the sweetest person ever! Even though I understand half of what you say in Spanish you seem very nice in English hahaha. Josecito, thank you for always be willing to help, for your easy-going spirit and always making me laugh! I wish in your future you buy normal clothes to go to work. **Ligia**, bit by bit I got to know you and I'm very thankful I did! You are an incredibly thoughtful person and very fun to be around! Thank you for always joining and organizing things to do! **Christoff**, the Cady Heron to my Regina George. You have one of the most fun and peculiar sense of humor I have ever known (and too many cow T-shirts). Thank you for all the fun coffees in the lab, for all the dinner you hosted or joined, all the day (and night) drinking we did, for helping me with the human study and for laughing of my *I should've read the audience better* jokes so it wasn't so uncomfortable. Obviously to the 3 of you, thank you for all your scientific input! You are great! **Karen**, I remember my first day at ERIBA, I didn't know what to do or where to go, but from moment one you cared that I felt included, thank you for that and all your help during my PhD! Dear **Miriam**, thank you for all your help in the lab, for collaborating in this thesis and all the fun coffees and lunches. **Chris**, you were my first Dutch friend and I'm beyond grateful to have had you by my side during my first year of the PhD. Thank you for introducing me to the *ijwit(s)*, but not for letting me figure out by myself that the beer in The Netherlands was stronger than in Chile hahaha. Overall thank for all the fun moments Caracol! **Emmalie**, we only shared a short period together in the lab, but it was always fun! Thank you for being such a cheerful person! Dear **Fentaw**, thank you for collaborating with me in the building of the SCFA model, you were always patient and willing to teach me, and I really appreciated that. Overall, thank you to all present and former members of Barbara's group for contributing to my work in one way or another.

I would also like to thank to the **Pediatrics department at the UMCG** for sharing their knowledge and expertise, and for all the insightful questions and suggestions during my PhD. Special thanks to all the people in **E4** for all the help, and for making my day to day easier and fun! **Kishore** and **Martijn** thank you so much for all your patience and good humor! You were the best desk mates ever! **Venetia** and **Natalia**, thank you for all the conversations, and fun moments! I'm really happy I met you! **Marti** y **Ailine**, amiguitos, aunque ninguno de los dos estuvo conmigo durante todo el PhD ambos dejaron su huella en mi corazoncito. Gracias por su linda amistad y todos los recuerdos creados. **Alfredo**, amiguito te conocí cuando llegaste como plus one a una fiesta en mi casa hahaha, mira todo lo que hemos recorrido desde ese día! Gracias

por siempre estar ahí para mí y por toda tu ayuda (y obviamente, por todos los jueves de shopping) Te quiero!. **Yannick**, thank you for all the times you cooked for us and all the fun drinks! You could definitely be part of my Kibbutz! **Patricia**, amiga, pensar que nos íbamos a hacer así de cercanas después de que te fueras del lab hahaha!! Amiguita, conocerte a ti fue uno de los highlights de mi vida en Groningen. Gracias por escucharme, aconsejarme y por todo lo que hemos pasado juntas!

As I made a lot of good friends at work, I also found incredible people outside of it (most of them scientists anyway ahahahah) that made this journey the best *leap of faith* I have ever take. **Rodri y Feli**, en este momento estoy haciendo una ráfaga mental de nuestros momentos juntos y que exótico ha sido todo! Definitivamente los tiempos de corona no hubiesen sido lo mismo sin ustedes. Rodri, tu amistad fue un linda sorpresa que me entregó Groningen. En poco tiempo sentí contigo un cariño que parecía había estado por años, y es así de cómoda, escuchada y aconsejada me he sentido. Gracias por todo tu apoyo! Feli, creo que contigo no hay momento aburrido, amo tu sentido del humor, todas tus historias, que siempre te guste mi comida y lo transparente que eres! Los quiero! **Vichito**, amigo querido, me encanta que nuestra amistad haya perdurado y madurado en todos estos años. Siento que a pesar de ambos tener diferentes visiones de la vida, lo que nos conecta no ha cambiado. Gracias por tu amistad, tu cariño y por siempre estar presente de una manera u otra. Amo tenerte cerca! **Pancha y Tavo**, nuestros fieles compañeros de viajes, cabros son una pareja bacán y aunque nuestra cercanía actual haya sido por comodidad geográfica hahaha, la paso la raja con ustedes! Creo que nuestro click es bacán, amo que el Tavo avise cuando tiene hambre y que no diga *me da los mismo, lo que uds quieran* hahaha, y que la Pancha sea tan motivada y relajada a la vez. Espero se vengan más oportunidades de rotar Europa xD! Enormous thanks to all of Ale's friends who over time became my friends too. Especially to **Gate and Fermin, Milos and Jasna, Nikola and Lur, Simone and Ivana, Max and Cora, Elvira and Gutie**. Guys, you were such an important part of our life in Groningen. I loved that within your lab group, since we were mostly foreign, you always took care of each other. Thank you for all the fun moments and for always caring about us! I'm very happy I met you all! Also Thank you to my neighbors **Bert and Janny** for all the fun coffees that turned into wine evenings! And for tolerating all the parties we hosted! I think a lot of people in this list would want to thank you as well hahaha!. Also to my downstairs neighbor, **Luca**, for all the fun times! And pink drinks!

During this years I also dared to do something I never thought I would do, I joined a music band! To the members of the band (and my friends) **Misun, Nikk, Ilias and Friso**, I'm so thankful that we got to do this, and even though this was in corona times and we didn't get to play live, I loved to go every Wednesday to rehearsal (and to



eat KFC hahaha) with you. Thank you guys for the good vibe, and all the fun moments in and out of Het Viadukt! Also, thank you to my singer teacher for preparing me for the new challenge that singing was for me. Thank you **Stefano** for all the lessons, the patience and the support!

I would also extend my gratitude to my family in Chile. **Granes**, me incorporaron en su familia hace más de 10 años ya, y estoy infinitamente agradecida de que sean parte de mi vida. Gracias por apoyarme, quererme, retarme ahahaha, y celebrar conmigo todos mis logros!. Me encanta que sean una familia tan numerosa, y que siga y siga creciendo! **Tiita** y **Tio**, gracias por hacerme sentir como una hija más, por haberme visto crecer y por siempre apoyarnos, aunque significaba que estaríamos lejos. **Pelao**, **Pau**, **Lolo**, **Fran**, **Bubu**, **Geri**, y **Pia**, ustedes son sin duda alguna los mejor cuñados y cuñadas que me podrían haber tocado, son una red de apoyo invaluable, gracias por su infinito cariño, por su increíble disposición y por sobre todo por lo divertido que son! No hay nada mejor que una junta Gran (aunque sea para puro ver trailers ahaha)! Y a mis sobrinitos y sobrinitas por extensión, **Trini**, **Polli**, **Gaspi**, **Facuki** y **Rafiki**, gracias por existir y traer más y más cariño a esta numerosa familia. Gracias Granes, los amo!

En las últimas líneas de estos agradecimientos quiero agradecerles a las personas más importantes de mi vida y quienes empezaron conmigo esta aventura que muchísimos años antes de empezar el doctorado. **Papá** y **Mamá**, esto lo comenzamos juntos, y no se imaginan como agradezco que aun yo siendo pequeña cuando les dije que quería ser científica, ustedes se subieran conmigo a mi sueño y dieran hasta lo que no tenían para que yo estuviera donde estoy ahora. Siempre me hicieron sentir que podía ser lo que quisiera ser en esta vida. Gracias por siempre estar presente, por apoyarme y escucharme cuando las cosas se me ponían difíciles y por no dejar que me rindiera jamás. Gracias por abrir todas las puertas a su alcance para que yo siguiera avanzando y por siempre confiar en mí y en mis decisiones. Ahora que somos los 3 adultos, amo la relación que tenemos y que fuimos construyendo. Los amo con todo mi corazón feliz! **Sapito** y **Salchichita**, yo creo que lo mejor que me ha pasado en la vida fue tener hermanas, ustedes dos construyeron mi carácter, y me roban el corazón. Gracias a las dos por en su propia manera amarme, acompañarme, hacerme reír y por siempre siempre siempre *protegerme la espalda*. Gracias por la ayuda directa que me dan al preocuparse por mí (*y del ale, más del ale, olviden a la Mel*), pero también por la ayuda indirecta que me dan al estar en Chile preocupadas por los papás mientras yo estoy acá. Las amo y admiro a más no poder! Soy.. *un Dios con suerte!* **Weli Pati**, le agradezco a ud, y a mi Tata a través de ud, desde el fondo de mi

corazón por todo su cariño y su preocupación por mi educación. **Mami Paula**, gracias por todo tu amor, tu apoyo y por las casi 20 hrs que viajaste en avión para compartir este día conmigo. Las amo infinito.

Ale, a pesar de que todos dicen que sus parejas son las mejores del mundo, yo creo que nadie tiene una mejor que yo. Cora, gracias por embarcarte en esta aventura conmigo, haz sido un apoyo incondicional en todos los pasos que he dado durante mi doctorado, ya sea escuchándome, aconsejándome, trasnochando conmigo, yéndome a buscar al colegio, preparándome los mejores baños de tina, compartiendo infinitas risas de Patán, o simplemente regaloneándome cuando el estrés atacaba y me llenaba de pulgas. Gracias por compartir conmigo todo lo que nuestra aventura en Holanda a significado, los éxitos y las alegrías, pero también las frustraciones y las penitas. Eres mi mejor amigo en el mundo entero, y a nuestra propia manera hemos crecido y construido nuestra increíble vida juntos. Gracias por creer en mi cuando yo no lo hacía. Te amo como el palillo a la lana.



Thank you!

CURRICULUM VITAE

Born on the 14th of September, in Curacaví (Chile), Melany Rios Morales started her science career by pursuing a bachelor degree in Biochemistry at the University of Chile with a special focus in basic research. She continued her specialization by doing a Master degree in Clinical Biochemistry at the same university in the laboratory of Cellular Metabolism and Bioenergetics. For her MSc. thesis she studied the *α -Ketoglutarate dehydrogenase as a key regulator in the maintenance of cancer metabolism*. During this time she was awarded the graduate school scholarship for research abroad, giving her the opportunity to do an internship at the University of Pennsylvania (Philadelphia, USA) where she studied the *effect of α -ketoglutarate dehydrogenase inhibition on cellular invasion and metastasis in a three dimensional skin model*. Soon after that, she moved to Groningen (The Netherlands) to start as a PhD student in the Systems Medicine of Metabolism and Signaling group in the University of Groningen under the supervision of Prof. Barbara Bakker and Prof. Dirk-Jan Reijngoud. This research was supported by grants of NWO-Carbohydrate Competence Center (NWO-CCC) and the UMCG Hereditary Metabolic Diseases Fund. She also successfully applied for the De Cock-Hadders grant for financial support for scientific research in 2020. This multidisciplinary scientific environment got her involved in many fruitful collaborations that resulted in the present thesis focused on *the effects of the gut microbiota fermentation products, short chain fatty acids, on host metabolism*. During her PhD project she participated in national and international conferences and was awarded the Rudy Rabbinge Award for the best pitch presentation in the yearly Carbohydrate Competence Center symposium in 2018 and 2019, together with her research partner Mara van Trijp, and the 3rd prize best pitch presentation in the Dutch Liver Retreat 2019. Currently, she continued her scientific career in the field of gut-host interaction as a postdoctoral researcher in the group of Prof. Max Nieuwdorp at Amsterdam UMC.



LIST OF PUBLICATIONS

Rios-Morales, M.*, van Trijp, M.P.H.* , Witteman, B., Abegaz, F., Gerding, A., An R., Koehorst, M., Evers, B., van Dongen, K., Zoetendal, E., Schols, H., Afman, L., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M.# & Hooiveld, G. J.# Intra-intestinal degradation kinetics of non-digestible carbohydrates and the fate of short-chain fatty acids in human subjects. *Manuscript in preparation*.

van Trijp, M.P.H., **Rios-Morales, M.**, Logtenberg, M., Keshtkar, S., Afman, L., Witteman, B., Bakker, B.M., Reijngoud, D.J., Schols, H. & Hooiveld, G.J. Detailed analysis of the digestibility of prebiotic fructo- and galacto-oligosaccharides in the human small intestine. *Manuscript in preparation*.

Rios-Morales, M.*, Vieira-Lara, M.* , Homan, E., Langelaar-Makkinje, M., Gerding, A., Li, Z., Rensen, P.C.N., Huijkman, N., Wolters, J.C., Reijngoud, D.J. & Bakker, B.M. **2022**. Butyrate oxidation attenuates the butyrate-induced improvement of insulin sensitivity in myotubes. *Submitted to Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*.

Rios-Morales, M.*, van Trijp, M.P.H.* , Rösch, C., An, R., Boer, T., Gerding, A., de Ruiter, N., Koehorst, M., Heiner-Fokkema, M.R., Schols, H.A., Reijngoud, D.J., Hooiveld, G.J.# & Bakker, B.M.#, **2021**. A toolbox for the comprehensive analysis of small volume human intestinal samples that can be used with gastrointestinal sampling capsules. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.

Rios-Morales, M.*, Prins, G.H.* , Gerding, A., Reijngoud, D.J., Olinga, P.# & Bakker, B.M.#, **2021**. The effects of butyrate on induced metabolic-associated fatty liver disease in precision-cut liver slices. *Nutrients*, 13(12), 4203.

van Trijp, M.P.H., Wilms, E., **Rios-Morales, M.**, Masclee, A.A., Brummer, R.J., Witteman, B.J., Troost, F.J. & Hooiveld, G.J., **2021**. Using naso-and oro-intestinal catheters in physiological research for intestinal delivery and sampling in vivo: practical and technical aspects to be considered. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 114(3), 843-861.

Abegaz, F., Martines, A.C.M., Vieira-Lara, M.A., **Rios-Morales, M.**, Reijngoud, D.J., Wit, E.C. & Bakker, B.M., **2021**. Bistability in fatty-acid oxidation resulting from substrate inhibition. *PLoS Computational Biology*, 17(8), e1009259.

Cardenas, C., Lovy, A., Silva-Pavez, E., Urra, F., Mizzoni, C., Ahumada-Castro, U., Bustos, G., Jaña, F., Cruz, P., Farias, P., Mendoza, E., Huerta, H., Murgas, P., Hunter, M., **Rios-Morales, M.**, Cerda, O., Georgakoudi, I., Zakarian, A., Molgó, J. & Foscett, K., **2020**. Cancer cells with defective oxidative phosphorylation require endoplasmic reticulum-to-mitochondria Ca^{2+} transfer for survival. *Science Signaling*, 13(640), eaay1212.

Jaña, F., Bustos, G., Rivas, J., Cruz, P., Urra, F., Basualto-Alarcón, C., Sagredo, E., **Rios-Morales, M.**, Lovy, A., Dong, Z., Cerda, O., Madesh, M. & Cardenas, C., **2019**. Complex I and II are required for normal mitochondrial Ca^{2+} homeostasis. *Mitochondrion*, 49, 73-82.

Brandsma, E., Kloosterhuis, N.J., Koster, M., Dekker, D.C., Gijbels, M.J., van Der Velden, S., **Rios-Morales, M.**, van Faassen, M.J., Loreti, M.G., De Bruin, A., Fu, J., Kuipers, F., Bakker, B.M., Westerterp, M., Winther, M., Hofker, M., van de Sluis, B. & Koonen, D.P., **2019**. A proinflammatory gut microbiota increases systemic inflammation and accelerates atherosclerosis. *Circulation Research*, 124(1), 94-100.

Urra, F.A., Muñoz, F., Córdova-Delgado, M., Ramírez, M.P., Peña-Ahumada, B., **Rios-Morales, M.**, Cruz, P., Ahumada-Castro, U., Bustos, G., Silva-Pavez, E., Pulgar, R., Morales, D., Varela, D., Millas-Vargas, J., Retamal, E., Ramírez-Rodríguez, O., Pessoa-Mahana, H., Pavani, M., Ferreira, J., Cárdenas, C. & Araya-Maturana, R., **2018**. FR58P1a; a new uncoupler of OXPHOS that inhibits migration in triple-negative breast cancer cells via Sirt1/AMPK/ β 1-integrin pathway. *Scientific Reports*, 8(1), 1-16.

*# *Equal contribution*

