



MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL EN CONDICIONANTES GENETICOS, NUTRICIONALES Y AMBIENTALES DEL CRECIMIENTO Y EL DESARROLLO (NUTRENVIGEN G+D FACTORS)

# TRABAJO FIN DE MÁSTER

---

Interacción entre el consumo de carne y la microbiota intestinal y su relación con el perfil de ácidos grasos: un ensayo clínico aleatorizado

## Autor

Ana Pardo Cabello

## Directores

Dra. Alba María Santaliestra Pasías

Dr. Feliciano Ramos Fuentes

Zaragoza septiembre 2022



**Universidad**  
Zaragoza

1542



1542

**GENUD Research Group**  
Growth, Exercise, NUtrition and Development  
**Universidad Zaragoza**

## **Título**

**Interacción entre el consumo de carne y la microbiota intestinal y su relación con el perfil de ácidos grasos: un ensayo clínico aleatorizado**

## **Autor**

Ana Pardo Cabello **DNI:** 16626970V

## **Tutores académicos**

Dra. Alba María Santaliestra Pasías **DNI:** 73207777L

Dr. Feliciano Ramos Fuentes **DNI:** 08795117D

## **Línea de investigación:**

Microbiota y salud

## **Proyecto en el que se enmarca el trabajo:**

Innovaciones aplicadas a la cadena productiva pirenaica de vacuno para valorizar una carne identificable por el consumidor.

- DietaPYR2 -

## **Centro en el que se ha realizado el trabajo:**

Growth, Exercise, Nutrition and Development (GENUD)

Dra. Alba María Santaliestra Pasías y Dr. Feliciano Ramos Fuentes CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo Final de Máster titulado: “Interacción entre el consumo de carne y la microbiota intestinal y su relación con la producción de ácidos grasos: un ensayo clínico aleatorizado”, que presenta Ana Pardo Cabello al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Zaragoza, ha sido realizado bajo nuestra dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora en condiciones tan aventajadas que la hacen merecedora del Título de Máster, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

## Índice

1. Resumen .....	1
2. Palabras clave .....	1
3. Glosario .....	2
4. Introducción .....	3
4.1 Definición .....	3
4.2 Composición.....	3
4.3 Variabilidad y disbiosis .....	4
4.4 Estudio de la microbiota .....	5
4.5 Funciones de la microbiota.....	6
4.5.1 Funciones protectora e inmunológica.....	6
4.5.2 Funciones metabólicas .....	7
4.6 Ácidos grasos y microbiota intestinal.....	9
5. Objetivos e hipótesis.....	9
6. Material y métodos.....	12
6.1 Diseño del estudio .....	12
6.2. Participantes.....	14
6.3. Mediciones .....	14
6.4. Intervención.....	15
6.5. Análisis de laboratorio .....	15
6.6. Análisis de la microbiota intestinal .....	15
6.7. Análisis bioinformático de la microbiota intestinal .....	16
6.8. Análisis estadísticos .....	16
7. Resultados.....	17
8. Discusión .....	28
8.1 Ácidos grasos.....	28
8.2 Microbiota.....	30
8.3 Interacción entre la microbiota y ácidos grasos .....	32

8.4 Fortalezas y debilidades del estudio.....	34
9. Conclusiones .....	35
10. Bibliografía.....	36

## 1. Resumen

El presente estudio evalúa el efecto de dos tipos de dietas diferentes en el tipo de carne principal (ternera del Pirineo versus pollo) sobre la composición de la microbiota intestinal y los niveles de ácidos grasos séricos. Se realizó un ensayo clínico cruzado y aleatorizado con dos períodos experimentales de 8 semanas con un período de lavado de 5 semanas. Diecisiete participantes fueron asignados aleatoriamente al grupo intervención (ternera de los Pirineos), o al grupo control (pollo convencional) durante el primer periodo del estudio, y en el contrario en la segunda fase. Se tomaron muestras de sangre y heces al inicio y al final de cada periodo. El grupo control presentó una disminución de los niveles séricos de PUFA omega-6 y de la abundancia de *Chloroflexi* y *Synergistetes*, mientras que en el grupo intervención disminuyó Proteobacteria ( $p < 0,05$ ). Encontramos asociaciones lineales negativas en Actinobacteria del grupo intervención para el ácido behénico y en *Chloroflexi* del grupo control para PUFA omega-6, y positivas en Firmicutes del grupo intervención para el ácido behénico y del grupo control para los PUFA totales ( $p < 0,05$ ). Estos resultados preliminares sugieren que la carne de ternera procedente de ganadería extensiva podría ser igual de beneficiosa que la de pollo, en cuanto a las concentraciones séricas de ácidos grasos y la abundancia de filos de la microbiota intestinal, y puede ser incluida dentro de una dieta equilibrada.

### **Abstract**

This study evaluates the effect of two different types of diets in the main type of meat (Pyrenean beef versus chicken) on the composition of the gut microbiota and serum fatty acid levels. A randomized crossover clinical trial was conducted with two 8-week experimental periods with a 5-week washout period. Seventeen participants were randomly assigned to the intervention group (Pyrenan veal), or to the control group (conventional chicken) during the first period of the study, and the opposite in the second phase. Blood and stool samples were taken at the beginning and at the end of each period. The control group presented a decrease in the serum levels of omega-6 PUFA and in the abundance of *Chloroflexi* and *Synergistetes*, while in the intervention group Proteobacteria decreased ( $p < 0.05$ ). We found negative linear associations in Actinobacteria from the intervention group for behenic acid and in *Chloroflexi* from the control group for omega-6 PUFA, and positive in Firmicutes from the intervention group for behenic acid and from the control group for total PUFA ( $p < 0.05$ ). These preliminary results suggest that beef from extensive farming may be just as beneficial as chicken, in terms of serum concentrations of fatty acids and the abundance of phyla in the intestinal microbiota, and can be included in a balanced diet.

## 2. Palabras clave

Microbiota intestinal, ácidos grasos, carne, ternera, pollo.

Gut microbiota, fatty acids, meat, beef, chicken.

### **3. Glosario**

AA: ácido araquidónico

AG: ácidos grasos

ALA:  $\alpha$ -linolenic acid (ácido  $\alpha$ -linolénico)

CLA: conjugated linoleic acid (ácido linoleico conjugado)

DHA: ácido docosahexaenoico

DUFAs: doble-unsaturated fatty acids (ácidos grasos diinsaturados)

EPA: ácido eicosapentaenoico

HYA: 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico

iAGT: ácidos grasos trans de origen industrial

IMC: índice de masa corporal

LA: linoleic acid (ácido linoleico)

MetaHIT: Metagenomics of the Human Intestinal Tract (metagenómica del tracto intestinal humano)

MUFAs: Mono-Unsaturated Fatty Acids (ácidos grasos monoinsaturados)

nAGT: ácidos grasos trans de origen natural

PUFAs: poly-unsaturated fatty acids (ácidos grasos poliinsaturados)

PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6

PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3

SFAs: saturated fatty acids (ácidos grasos saturados)

TMA: trimetilamina

TMAO: óxido de trimetilamina

UFAs: unsaturated fatty acids (ácidos grasos insaturados)

UI: Unsaturation Index (Índice de insaturación)

## 4. Introducción

### 4.1 Definición

La microbiota intestinal se define como el conjunto de microorganismos que habitan en el aparato gastrointestinal humano, encontrándose la mayoría de ellos a nivel del colon; es por ello que comúnmente se usan como sinónimos el término microbiota intestinal y microbiota colónica (1).

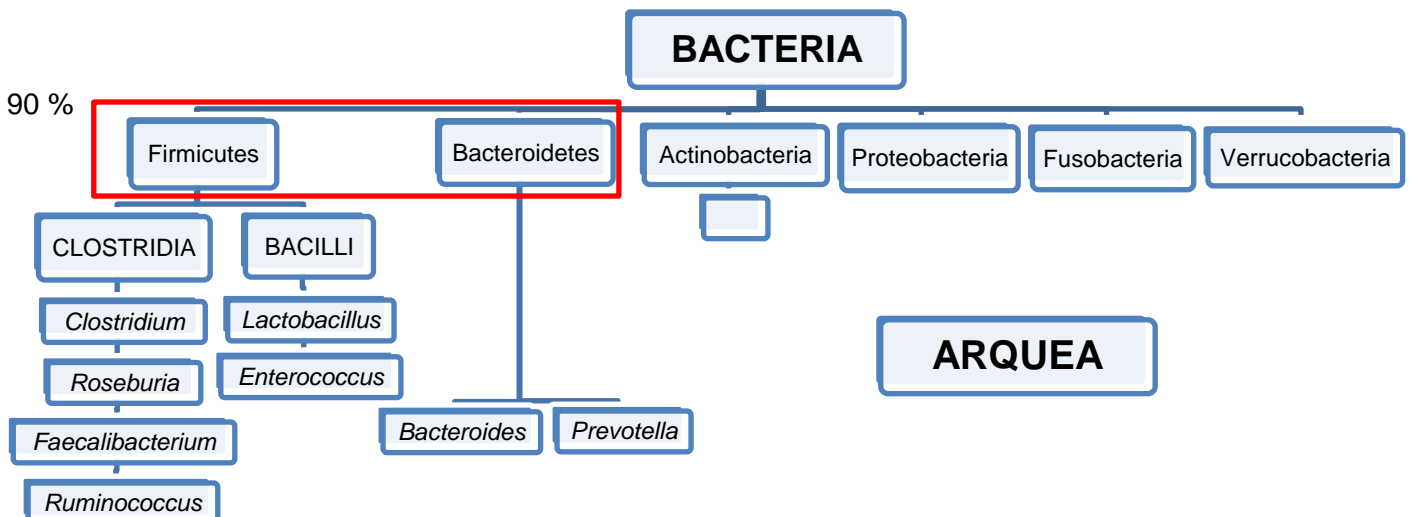
El papel de esta microbiota es fundamental para el correcto funcionamiento del cuerpo humano. Gracias a una íntima relación de mutualismo/simbiosis del conjunto de seres vivos que componen la microbiota con el intestino del huésped humano, se regulan prácticamente todos los procesos fisiológicos de este órgano, incluido el metabolismo de los nutrientes, el aprovechamiento de la energía, la desintoxicación, la función de barrera o la inmunidad (2).

### 4.2 Composición

La microbiota humana se compone de más de 100 billones de microorganismos, la mayoría de los cuales pertenecen al Dominio Bacteria; sin embargo, según el proyecto MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract), financiado por la Comisión Europea, un 1-2% de estos microorganismos se corresponderían con virus (en su mayor parte bacteriófagos) u hongos (3,4).

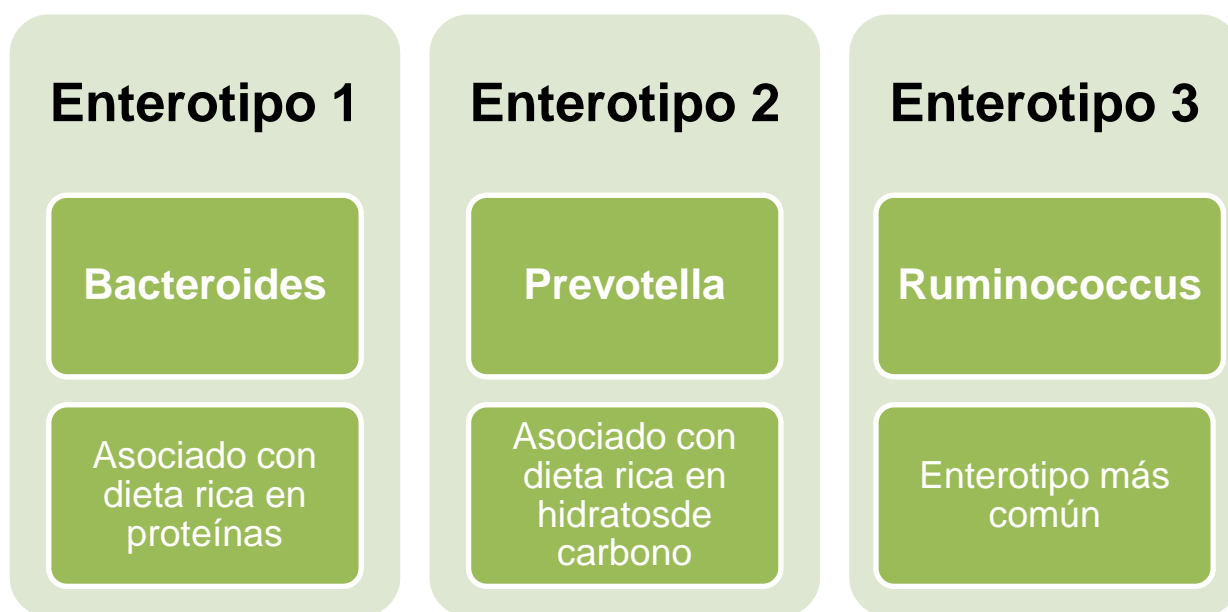
Dado que dentro del conjunto de microorganismos que componen la microbiota intestinal la mayoría son bacterias, en este trabajo nos vamos a centrar exclusivamente en la composición bacteriana de la microbiota.

Tal como se muestra en la **Figura 1**, el 90 % de la microbiota colónica se compone, dentro del Dominio Bacteria, de los filos Bacteroidetes (destacando los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*) y Firmicutes (destacando los géneros *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Clostridium* y *Ruminococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*) (1). El 10 % restante lo completan los filos Proteobacteria, Actinobacteria (siendo el género *Bifidobacterium* el más representativo), Fusobacteria y Verrucobacteria, junto con unas pocas especies del Dominio *Arquea* (4–6).





En la **Figura 2** se muestra otra forma de catalogar la microbiota intestinal, propuesta por el proyecto MetaHIT (7), que tras observar composiciones microbianas intestinales claramente similares en ciertas poblaciones, define el concepto de enterotipo, el cual clasifica la microbiota en torno a tres grupos de acuerdo a la abundancia relativa de tres Géneros: Bacteroides (enterotipo 1), Prevotella (enterotipo 2) y Ruminococcus (enterotipo 3) (5,6);. El concepto de enterotipo sugiere que el ecosistema microbiano en el intestino humano forma diferentes estados de simbiosis entre los distintos miembros de la comunidad microbiana, probablemente determinados por las redes metabólicas en las que se agrupan; de esta manera, al igual que se tiene un grupo sanguíneo, cada persona presenta un tipo de microbiota intestinal o enterotipo (4,8,9).



**Figura 2:** Tipos de enterotipos según el proyecto MetaHIT

#### 4.3 Variabilidad y disbiosis

Como se ha indicado, el intestino contiene la mayor cantidad de microorganismos en el organismo humano, y además presenta una importante variabilidad intra- e interindividual. Los componentes de variabilidad incluyen la genética y factores ambientales, como la exposición microbiana, la dieta o los antibióticos (10). Si bien la microbiota presenta resistencia a los cambios ambientales, varios factores como el estrés, la infección por patógenos u otras condiciones patológicas, pueden conducir a una interrupción de la homeostasis de la microbiota intestinal, lo que conocemos como "disbiosis" (5,10,11), la cual está fuertemente correlacionada con enfermedades no solo gastrointestinales, sino también con enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia o el trastorno del espectro autista (12) o con enfermedades crónicas como diabetes, cáncer y asma (13).

La identificación y prevención de estos factores son fundamentales para el manejo terapéutico de la disbiosis y la prevención de sus correlatos clínicos, incluidos la obesidad y el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y los procesos neurodegenerativos (10,14).

#### 4.4 Estudio de la microbiota

La técnica ideal o "*gold standard*" para estudiar la microbiota es la biopsia intestinal; sin embargo se trata de un método muy invasivo y poco práctico a la hora de realizarlo en una muestra representativa de la población (2).

En su lugar la opción más extendida es el análisis de muestras de heces (2). Después de la recolección, las muestras fecales se congelan y almacenan inmediatamente, tras lo cual se extrae el ADN mediante el uso de reactivos y centrifugación. Después de esto, el ADN resultante se amplifica y analiza utilizando diferentes técnicas (9).

Tradicionalmente los métodos de estudio de la microbiota se realizaban mediante cultivos bacterianos convencionales, lo cual conlleva un problema, y es que la gran mayoría de las bacterias de la microbiota intestinal son anaerobias estrictas, por lo que su cultivo es extremadamente complicado. Por lo tanto los resultados de estos estudios solo permitían aislar entre 10-25 % de las bacterias que componen la microbiota, aportándonos una visión sesgada de la composición de la misma (6,8).

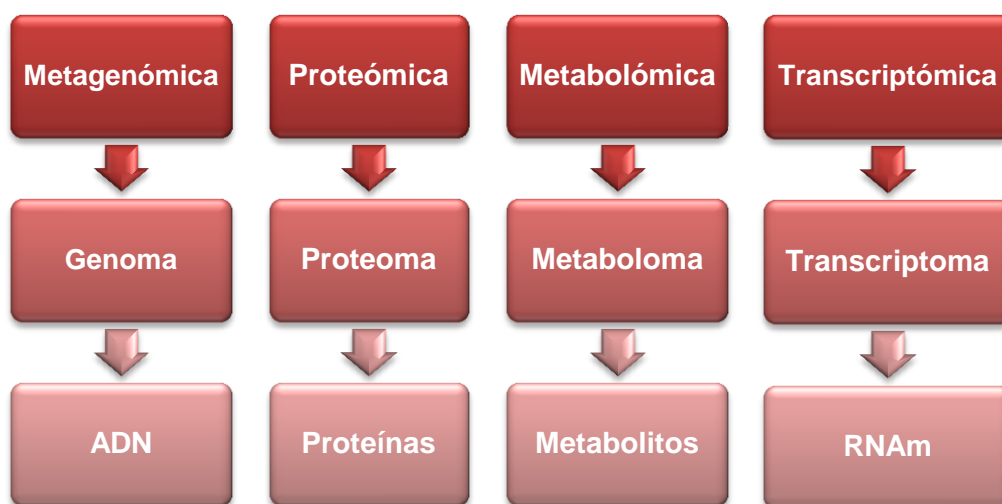
En la actualidad, el rápido desarrollo de las tecnologías moleculares de secuenciación masiva de alto rendimiento, juntos con los avances en bioinformática, ha revolucionado en pocos años el estudio de la microbiota. Por lo general, estos métodos implican la amplificación y secuenciación de regiones de ADN microbiano específicas, en su mayor parte, a través del ADN que codifica el ARN ribosomal 16S. La región 16S del gen bacteriano es pequeña y está muy conservada, y presenta 9 sitios hipervariables que difieren entre las diferentes especies bacterianas. Estos procesos son seguidos de un análisis estadístico de la identidad y diversidad microbiana en función de la similitud de secuencias y comparaciones con bases de datos genómicos microbianos de referencia (2,4,6,15).

En la **Figura 3** se muestran los diferentes tipos de estudios aplicables a la microbiota intestinal.

- La metagenómica realiza una secuenciación de ADN de la microbiota intestinal completa y clasifica y resume sus funciones genéticas mediante una base de datos (2,4,6).
- La proteómica secuencía la estructura proteica del huésped o de las células bacterianas intestinales para obtener datos del metabolismo celular, y mide directamente la actividad de las enzimas (2).
- La metabolómica evalúa los metabolitos producto de las reacciones enzimáticas resultantes de la interrelación del metabolismo bacteriano-huésped, los cuales pueden detectarse en

diferentes muestras biológicas del cuerpo humano (2,4,14). La metabolómica combinada con la metagenómica se puede utilizar para descubrir vías relevantes en el metabolismo microbiano, exponiendo su función fisiológica (2).

- La transcriptómica estudia las moléculas de ARN de la microbiota intestinal, mide la expresión dinámica de las moléculas de ARN en diferentes condiciones genómicas y revela el genotipo de la microbiota intestinal en condiciones de enfermedad (2).



**Figura 3:** Tipos de estudios de la microbiota intestinal

## 4.5 Funciones de la microbiota

### 4.5.1 Funciones protectora e inmunológica

El tracto digestivo está continuamente expuesto a agentes externos, por lo que no es sorprendente la estrecha relación de la microbiota intestinal y el sistema inmunológico.

La microbiota intestinal desempeña una función fundamental en la regulación de diversos aspectos de la inmunidad innata y adquirida, a través de su interacción con el epitelio intestinal y el sistema linfático asociado al intestino (GALT) contribuyendo a regular la adhesión, colonización e invasión microbiana gracias a diferentes mecanismos (11).

1. Inducción de péptidos antimicrobianos, de la síntesis de IgA secretora (11), por parte de las bacterias Gram-negativas mediante la estimulación de las células dendríticas y de la mucina, esta última a través de la regulación de la expresión de los genes que la codifican (*MUC-2*, *MUC-3*) y modifican su patrón de glicosilación (4,6).
2. Efecto trófico, influyendo en la proliferación de las células epiteliales y el mantenimiento de las uniones intercelulares estrechas y, de este modo, contribuyendo a fortalecer la función del epitelio como barrera física frente a la entrada de agentes exógenos (4,6).

3. Regulación del equilibrio de las subpoblaciones linfocitarias Th1 y Th2, asociadas al desarrollo de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (enfermedad de Crohn y enfermedad celíaca) y alergias (4,6).
4. Favorecimiento del desarrollo de tolerancia inmunológica y reducción de las reacciones de hipersensibilidad, mediante la inducción de la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias y linfocitos T reguladores (Tregs) (4,6,11,16).

#### 4.5.2 Funciones metabólicas

La microbiota intestinal ejerce un papel clave en el proceso de digestión de los nutrientes y en la regulación metabólica de su huésped.

El proceso más común y más estudiado es el de la fermentación de hidratos de carbono complejos no digeribles, la fibra que contienen los alimentos de origen vegetal, por parte de *Bacteroides*, *Roseburia*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium* entre otros, generando así ácidos grasos de cadena corta, principalmente ácido butírico, propiónico y acético, que son utilizados por los enterocitos del colon como fuente de energía, además de entrar en el torrente sanguíneo para ejercer efectos epigenéticos e inmunomoduladores en otros órganos del cuerpo (13,17–20).

La microbiota intestinal también interviene en la metabolización de proteínas a través de diferentes proteinasas y peptidasas microbianas. Varios transportadores de aminoácidos en la pared celular bacteriana facilitan la entrada de aminoácidos desde la luz intestinal a la bacteria, donde los aminoácidos se convierten en pequeñas moléculas de señalización y péptidos antimicrobianos (bacteriocinas). Ejemplos importantes de este proceso son la conversión de L-histidina en histamina por la enzima bacteriana histamina descarboxilasa, y la transformación de glutamato a ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) por la glutamato descarboxilasas (6).

La síntesis de vitamina K y varios componentes de la vitamina B es otra función metabólica importante de la microbiota intestinal (15).

La microbiota intestinal humana también está involucrada en la descomposición de polifenoles que se consumen en la dieta, en su mayor parte procedentes de alimentos vegetales y derivados, como el té, el cacao o el vino; de estos, los flavonoides son los que absorben con mayor frecuencia en el intestino. La microbiota intestinal transforma estos compuestos dietéticos inactivos en moléculas bioactivas, siendo el mejor ejemplo la conversión de isoflavonas inactivas en aglicón y equol, que tienen efectos antiandrogénicos e hipolipidémicos (15).

La microbiota también puede generar compuestos potencialmente tóxicos, como la formación de trimetilamina (TMA) a partir de colina y carnitina presentes principalmente en los productos cárnicos. La TMA, que se absorbe y se transforma en óxido de trimetilamina (TMAO) en el hígado, es factor de riesgo de enfermedad cardiovascular (13,17,20,21).

Por último la microbiota también regula el almacenamiento de lípidos; sin embargo, mientras que el metabolismo microbiano de los carbohidratos y las proteínas en el intestino ha sido bien estudiado, llegándose a dilucidar muchos de los componentes que influyen en el proceso, incluyendo las reacciones bioquímicas, las enzimas, los factores genéticos y los microorganismos implicados, la interacción entre la microbiota intestinal humana y las grasas de la dieta aún requiere más investigación, dado que la mayoría de estos procesos no han sido aclarados (22).

Actualmente el principal objeto de investigación en este campo es a propósito de las grasas, la microbiota y la relación de ambas con la obesidad y el síndrome metabólico, encontrando en este ámbito numerosos estudios, tanto en humanos como en ratones. Por ejemplo, encontramos diferentes estudios en ratones han demostrado que el trasplante fecal de ratones con obesidad a ratones con peso normal es capaz de transferir el fenotipo, haciendo que los últimos ganen más peso y almacenen más grasa (4).

En el estudio de Fava et al, en el que se investigaba específicamente los efectos de grasas en la dieta sobre la microbiota intestinal humana, los autores concluyeron que en el consumo de una dieta baja en grasas había una mayor abundancia de *Bifidobacterium*, y que en la dieta alta en grasas saturadas aumentó la proporción relativa de *Faecalibacterium prausnitzii*, mientras que en los sujetos con un alto consumo de grasas monoinsaturadas no experimentaron cambios en la abundancia relativa de ningún género bacteriano (23). Acorde con estos hallazgos, un estudio que analiza el efecto del consumo de salmón en la microbiota (el cual tiene un alto contenido de grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas) refiere que el consumo de este no altera la composición de la microbiota fecal en 123 sujetos (24).

Otros estudios en ratas han demostrado que la ingesta de una dieta alta en grasas da como resultado una cantidad considerablemente menor de *Lactobacillus intestinalis* y un aumento de especies productoras de propionato y acetato, como Clostridiales, Bacteroides y Enterobacteriales (25) .

#### 4.6 Ácidos grasos y microbiota intestinal



**Figura 4:** Clasificación de ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) son los componentes principales de los triacilgliceroles que se encuentran en los aceites y grasas. Presentan diferentes funciones; proporcionan energía (9 kcal/g) transportan vitaminas liposolubles (A, D, E y K), constituyen los fosfolípidos de la membrana celular y participan en sus procesos de señalización, regulan del sistema inmunitario, la coagulación sanguínea y el metabolismo del colesterol (26); es por ello que existen muchos ácidos grasos que promueven la salud, siendo cruciales para aliviar el riesgo de enfermedades crónicas (27).

Sin embargo el consumo de dietas ricas en AG saturados y *trans* se ha relacionado ampliamente con el aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares debido a múltiples factores, como el aumento de colesterol total y LDL en la sangre; además, estas disfunciones pueden estar asociadas con la disbiosis en la microbiota intestinal del huésped (27).

Los AG se pueden clasificar según la presencia de dobles enlaces en sus cadenas laterales (clasificación que se resume en la **Figura 4**) o en función de la longitud de su cadena de carbono (28).

A continuación, se procede a describir las características de los tipos de ácidos grasos más comunes.

- Los AG saturados (SFA) se componen de cadenas lineales de carbono e hidrogeno unidos por enlaces sencillos, sin dobles enlaces entre ellos. El 80-90% de la ingesta total de ácidos grasos saturados lo componen los AG de cadena larga (que presentan de 13 a 18 carbonos saturados), como el ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) (26).
- Los AG insaturados (UFAs) son aquellos que tienen dobles enlaces entre sus carbonos y dependiendo de la orientación en el espacio de estos dobles enlaces se diferencian dos configuraciones: *cis* y *trans* (29).
- Los AG monoinsaturados (MUFAs) son un grupo insaturado con un doble enlace en sus estructuras, siendo el ácido oleico el más representativo; el consumo de MUFA se asocia con la reducción de la obesidad y sus síndromes metabólicos asociados (26).
- Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son un grupo insaturado que presenta desde dos a seis enlaces dobles en sus estructuras (26). Los PUFA son AG esenciales, debido al hecho de que las células humanas no tienen suficiente actividad desaturasa para introducir los dobles enlaces omega-3 y omega-6 en los precursores de los ácidos grasos, por lo cual deben obtenerse a través de la dieta (10,30).

Dentro de familia de los PUFA omega-3 el más representativo es el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), mientras que en la familia de los PUFA omega-6 es el ácido linoleico (LA).

En el cuerpo, el ALA se convierte en ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) a través de una serie de reacciones de desaturación y elongación, y presenta efectos antiinflamatorios, vasodilatadores y de antiagregación plaquetaria (26); acorde a estos datos, diversos estudios asocian las dietas ricas en PUFA omega-3 con la reducción de enfermedades cardiovasculares, cáncer, y con la disminución o prevención de enfermedades crónicas y metabólicas como la diabetes, la obesidad, la osteoporosis, la degeneración neurológica y las fracturas óseas (26,28).

El LA sigue las mismas vías y enzimas que los PUFA omega-3, se convierte en ácido araquidónico (AA) y presenta un efecto antagonista a del ALA, asociándose con la inflamación, la vasoconstricción y la agregación plaquetaria. Estas respuestas inflamatorias agudas tienen efectos beneficiosos sobre el cuerpo al protegerlo contra infecciones y lesiones, pero el exceso de estímulos inflamatorios puede ser tener consecuencias negativas para el organismo; las investigaciones actuales asocian una dieta rica en PUFAs omega-6 con el síndrome metabólico, las enfermedades inflamatorias del intestino, la esteatohepatitis no alcohólica, procesos tumorales y las enfermedades cardiovasculares (26,28).

En este contexto, la evidencia experimental indica que la relación óptima entre los PUFA omega-6 y omega-3 debe ser cercana a 4:1-5:1, y no debe exceder 10:1 (31).

- Los AG trans son un grupo de insaturado que presenta una cadena hidrocarbonada con un doble enlace en configuración *trans*. Los AG *trans* de origen industrial (iAGT) se fabrican sintéticamente a través de la hidrogenación parcial de aceites vegetales y se utilizan para la producción industrial de alimentos (29). Por otra parte, los AG *trans* de origen natural (nAGT) son producidos en el rumen de animales como la ternera gracias a su microbiota intestinal (*Butyrivibrio fibrisolvens* y *Propionibacterium acnes*) a través de la biohidrogenación parcial de los PUFA; el isómero *trans* más abundante en la carne y los productos lácteos es el ácido vaccénico (AV) (32).

Todos estos ácidos grasos son metabolizados no solo por el organismo humano sino también por su microbiota intestinal. El metabolismo de saturación de los PUFA los transforma en AG libres menos tóxicos mediante un proceso desintoxicante por parte de las bacterias anaerobias, siendo las organismos más representativas de este proceso las bacterias productoras de ácido láctico, los *Lactobacillus*, pero también pudiéndolo llevar a cabo diferentes cepas de Bifidobacterias y Propionibacterias (30,32). Este metabolismo genera diferentes tipos de AG, como AG hidroxilo, AG oxo, AG conjugados y AG *trans* (33).

El término “Ácido graso conjugado” hace referencia a isómeros posicionales y geométricos de ácidos grasos con dobles enlaces conjugados. En particular, los ácidos linoleicos conjugados (CLA), como *cis*-9,*trans*-11-CLA y *trans*-10,*cis*-12-CLA (32), han demostrado reducir la carcinogénesis, la aterosclerosis y la grasa corporal, llegándose incluso a comercializarse como un suplemento adelgazante en Estados Unidos y algunos países europeos (29).

Además, durante la isomerización del LA por parte de la microbiota intestinal se producen los AG intermedios hidroxilo y oxo, como 10-hidroxilo-*cis*-12-10-hidroxilo-*cis*-12-octadecenoico (HYA), 10-oxo-*cis*-12-octadecenoico (KetoA) y 10-oxo-*cis*-9,*trans*-11-octadecenoico (KetoC), los cuales se han asociado a efectos beneficiosos para el organismo, mejorando las defensas antioxidantes y desintoxicantes (34), frenando la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica (35) induciendo la activación de la adipogénesis (36), contribuyendo a mejorar los tratamientos para el trastorno del metabolismo de la glucosa (37), las enfermedades cardiovasculares y la dislipemia (38,39) y previniendo trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (40).

Los efectos biológicos del CLA se han atribuido a dos posibles mecanismos de acción:

- 1) el CLA desplaza el AA de los fosfolípidos de la membrana celular, lo que disminuye la síntesis de eicosanoides derivados del ácido araquidónico, como las prostaglandinas y los leucotrienos implicados en los procesos proinflamatorios (41).
- 2) el CLA media en la activación de factores de transcripción como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), que afectan procesos celulares como el metabolismo de los lípidos, la apoptosis y la función inmunitaria (41).



A raíz de estos hallazgos, estudios en ratones han demostrado que el metabolismo de los ácidos grasos por parte de la microbiota intestinal modifica la composición de ácidos grasos de su huésped (33). Por lo tanto, las investigaciones del metabolismo de los lípidos por parte de la microbiota intestinal pueden proporcionar nuevos métodos para mejorar nuestra salud al alterar el metabolismo de los lípidos relacionado con la aparición del síndrome metabólico.

## **5. Objetivos e hipótesis**

El objetivo general de este estudio consiste en evaluar el efecto de dos tipos de dietas diferentes en cuanto al tipo de carne principal (ternera en contraposición al pollo) sobre la composición de la microbiota intestinal y los niveles de ácidos grasos.

Los objetivos específicos son:

- 1) Evaluar el efecto de los dos tipos de dieta sobre los niveles de ácidos grasos de los participantes del estudio.
- 2) Evaluar el efecto de los dos tipos de dieta sobre la relación entre la variabilidad de la abundancia de la microbiota intestinal y los niveles de ácidos grasos sanguíneos.

La hipótesis del presente estudio se basa en la no inferioridad de una intervención nutricional realizada con carne de ternera del Pirineo en comparación con carne de pollo convencional en la concentración de ácidos grasos según las modificaciones de la microbiota intestinal de los individuos aragoneses.

## **6. Material y métodos**

### **6.1 Diseño del estudio**

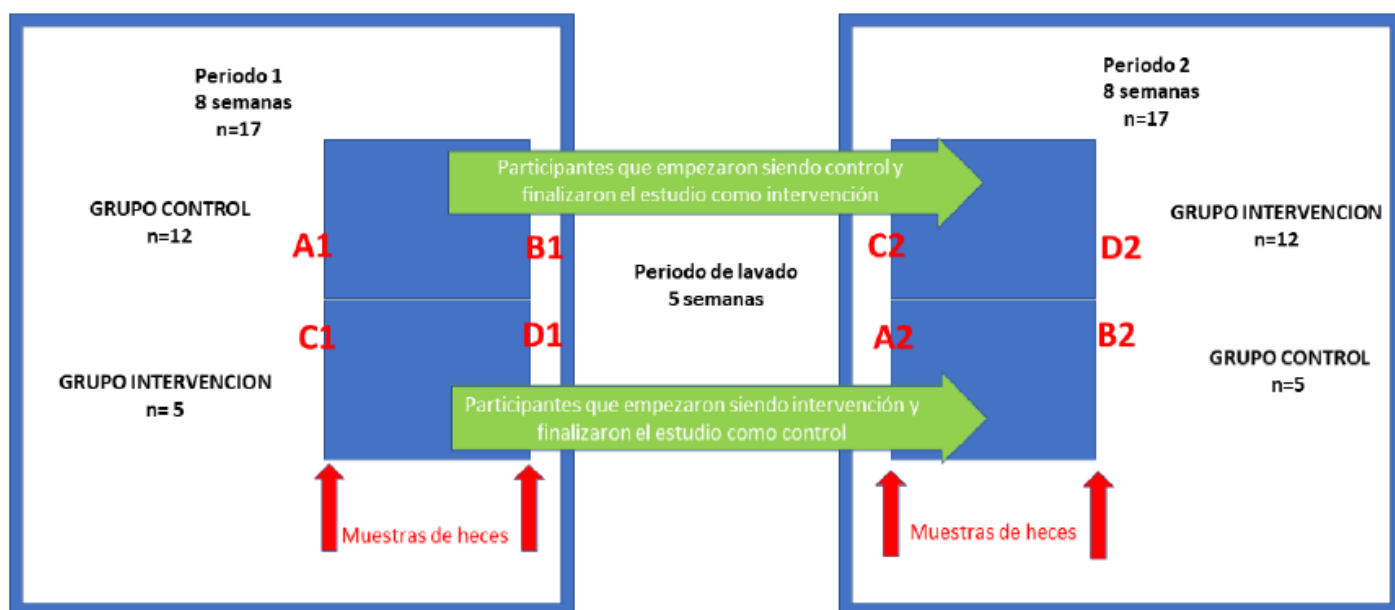
El presente estudio es un ensayo clínico controlado aleatorio y cruzado desarrollado en tres residencias universitarias, una en la ciudad de Zaragoza y dos en la ciudad de Huesca (Aragón, España). El estudio consistió en 2 periodos experimentales de 8 semanas de duración cada uno, con un período de lavado entre ellos de 5 semanas.

Los participantes fueron asignados aleatoriamente a un grupo que consumía carne de ternera (grupo de carne de ternera de los Pirineos), o a un grupo que consumía carne de pollo convencional. El periodo de lavado se realizó para eliminar los posibles efectos residuales de la dieta experimental anterior, sobre las diferentes variables analizadas. Se instruyó a los participantes para que mantuvieran una dieta saludable, y se les pidió que no cambiaran sus hábitos de alimentación o de actividad física durante toda la duración del estudio.

El diseño del estudio se presenta en la **Figura 5**. La primera visita se programó la tarde anterior al inicio de la intervención, en la que se registró la información sobre la historia clínica, variables sociodemográficas y de estilo de vida, además de asignar a cada participante al grupo control o

intervención y de tomarse las medidas antropométricas, de presión arterial (sistólica y diastólica) y de frecuencia cardíaca. El día posterior, tras un ayuno nocturno de 12 horas, se realizó una primera extracción de sangre para evaluar el perfil cardiovascular, la hematología, el metabolismo del hierro, otros minerales (calcio, magnesio y zinc), las apolipoproteínas (A1 y B), la proteína C reactiva y el perfil de ácidos grasos. También se recogieron muestras de heces.

Tras finalizar el primer periodo de 8 semanas se volvió a evaluar a los participantes, realizando de nuevo todas las mediciones, cuestionarios y toma de muestras biológicas (sangre y recogida de muestras de heces). Siguiendo el diseño cruzado, en el segundo periodo los participantes cambiaron el tipo de carne asignado, los que habían comenzado siendo intervención (consumo de carne de ternera de los Pirineos) en el primer periodo pasaron a ser control (consumo de carne de pollo) en el segundo periodo, y viceversa. Al igual que en el primer periodo se volvieron a realizar todas las evaluaciones descritas a los participantes, tanto al inicio como al final del segundo periodo.



#### Grupos de los gráficos y análisis subsecuentes

- 1 => Periodo 1
- 2 => Periodo 2
- A => Muestras al inicio del grupo control
- B => Muestras al final del grupo control
- C => Muestras al inicio del grupo intervención
- D => Muestras al final del grupo intervención

Figura 5: Diseño del ensayo clínico

## 6.2. Participantes

Se reclutaron participantes mayores de 18 años (rango de edad: 18,1 a 27,5 años). De los 52 participantes que aceptaron participar en el estudio, 2 se negaron a realizarlo antes de empezar el primer periodo y 3 no aceptaron participar en el segundo. Se recogieron muestras de heces para la evaluación de la microbiota de 17 participantes, que fueron los que se incluyeron finalmente en el estudio (65% varones). Los criterios de inclusión fueron no padecer ninguna enfermedad crónica, metabólica, endocrina o relacionada con la nutrición. Se pidió a los participantes que informaran del tratamiento médico en la historia clínica.

Se obtuvo la autorización del Comité de Ética de la Investigación del Gobierno de Aragón (España) (Nº 17/2018), y cada participante dio su consentimiento informado por escrito. El estudio se realizó siguiendo las directrices éticas de la revisión de Edimburgo de la Declaración de Helsinki de 1964 (2000).

## 6.3. Mediciones

Las mediciones antropométricas fueron obtenidas siempre por el mismo investigador capacitado. El peso corporal (kg) se midió con una báscula electrónica (Tanita BC 418 MA, Tanita Europe GmbH, Sindelfingen, Alemania). El participante se puso de pie en la plataforma de la báscula sin apoyo, con el peso corporal distribuido uniformemente entre ambos pies. Se llevaba ropa ligera de interior, excluyendo zapatos, pantalones largos y jersey.

La altura (en centímetros) se obtuvo con un estadiómetro de precisión (SECA 225), con una precisión de 0,1 cm y un rango de 70-200 cm. El participante se colocó en posición erguida: pies juntos, rodillas rectas y los tobillos, las nalgas y la espalda tocando directamente la parte posterior del estadiómetro. La cabeza se colocó en el plano de Frankfurt. Los brazos colgaban relajados a los lados del cuerpo, con la parte interna de la mano orientada hacia el muslo. La parte móvil y horizontal del estadiómetro tocaba la cabeza del participante, con una ligera presión sobre el cabello.

La masa grasa se obtuvo mediante un análisis de impedancia bioeléctrica (Tanita BC 418 MA, Tanita Europe GmbH, Sindelfingen, Alemania). Se calculó el índice de masa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) y el índice de masa grasa ( $\text{kg de masa grasa}/\text{m}^2$ ).

Para evaluar el cumplimiento de la dieta, se pidió a los participantes que rellenaran 4 cuestionarios para conocer sus estilos de vida, tanto la alimentación, como la actividad física y las conductas sedentarias, al principio y al final de cada período de 8 semanas. El cuestionario fue validado previamente (42).

#### **6.4. Intervención**

El valor nutricional de las dietas basadas en la carne de pollo y en la ternera de los Pirineos fue similar, incluyendo las fuentes de proteínas y grasas de la dieta. Los participantes en el estudio fueron instruidos para consumir 150 gramos (g) de carne de pollo o de ternera sin hueso (200 g con hueso) 3 veces por semana.

La carne de ternera de los Pirineos procedía de terneras de menos de 12 meses de edad criadas mediante ganadería extensiva. Para garantizar la armonización, se sirvieron los productos control e intervención durante la hora de la comida y se dieron instrucciones sobre los métodos de preparación a cada cocinero de las residencias universitarias.

#### **6.5. Análisis de laboratorio**

Las muestras de sangre (total: 4 muestras de sangre por cada participante) se extrajeron mediante venopunción tras 12 horas de ayuno nocturno. Se procesaron las muestras y el perfil de ácidos grasos se analizó en la Universidad de Granada mediante cromatografía de gases-líquidos acoplada a la detección por espectrometría de masas (GS-MS).

#### **6.6. Análisis de la microbiota intestinal**

Las muestras de heces fueron entregadas por cada uno de los participantes del estudio en los tiempos asignados en el diseño experimental. La extracción de ADN genómico se realizó mediante el método CTAB/SDS (por sus siglas en inglés de *Cetyl Tri-methyl Ammonium Bromide/Sodium dodecyl sulfate*). La concentración y la pureza del ADN se validaron mediante geles de agarosa al 1%. Según la concentración, el ADN se diluyó a 1ng/μL utilizando agua estéril.

A continuación se realizó la generación de amplicones y para ello se amplificaron mediante PCR los genes 16S rRNA/18SrRNA/ITS de distintas regiones (16SV4/16SV3/16SV3-V4/16SV4-V5, 18S V4/18S V9, ITS1/ITS2, Arc V4) utilizando cebadores específicos (por ejemplo, 16S V4: 515F-806R, 18S V4: 528F-706R, 18S V9: 1380F-1510R). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). Posteriormente se cuantificaron los productos de PCR obtenidos. Se mezcló el mismo volumen de tampón de carga 1X con los productos de la PCR y se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2% para su detección. Las muestras con un valor de amplicón de pares de bases (pb) entre 400-450 pb fueron elegidas para los experimentos posteriores. Dichos productos de PCR se mezclaron en proporciones de igual densidad. Los productos de PCR mezclados se purificaron con el kit de extracción de gel Qiagen (Qiagen, Alemania). Las bibliotecas se generaron con NEBNext® UltraTM DNA Library Prep Kit de Illumina y fueron cuantificadas mediante Qubit y Q-PCR. Finalmente, se secuenciaron utilizando la plataforma MiSeq de Illumina.

## 6.7. Análisis bioinformático de la microbiota intestinal

Las secuencias resultantes se dividieron teniendo en cuenta los códigos de barras introducidos durante el proceso de PCR. Las lecturas de los archivos R1 y R2 se introdujeron en el software de código abierto QIIME 2 2020.8 (43) utilizando el formato de entrada con el script `q2-tools-import` a través de `CasavaOneEightSingleLanePerSampleDirFmt`. Las lecturas se crearon utilizando la secuenciación V3-V4 del ARNr 16S. Se utilizó DADA2 (44) para el *denoising*, operando un modelo de calidad de Illumina para los errores de amplicón con la idea de obtener una distribución de abundancia de las varianzas de la secuencia, que difieren de un solo nucleótido. Tras seleccionar los resultados de calidad, se empleó el script `q2-dada2-denoise` para truncar las lecturas forward en la posición 289 y recortar en la posición 6. En el caso de las lecturas inversas, éstas se truncaron en la posición 220 y se recortaron en la posición 7. La eliminación de las quimeras se realizó con el filtro "*consensus*" mediante `q2-dada2-denoise` en el que se identifican las quimeras en muestras individuales. Se empleó MAFFT (45) para alinear las variantes de la secuencia del amplicón (ASVs) vía `q2-` alineación y FASTTREE2 (vía `q2-` filogenia) (46) para construir la filogenia. Se empleó el clasificador de taxonomía Sklearn naive Bayes (vía `q2-feature-classifier`) (47) para crear la taxonomía de las ASVs usando la base SILVA 16S V3-V4 v132\_99 (48). Se excluyeron las muestras con menos de 10.000 lecturas.

## 6.8. Análisis estadísticos

Las pruebas estadísticas se han realizado utilizando el paquete estadístico Jamovi (versión 2.2.5 solid para Windows; AGPL3 licens).

Se realizó una comparación de medias para muestras relacionadas con el test no paramétrico Wilconson, en función del grupo (control/intervención) para analizar la abundancia de los diferentes filos de la microbiota y los niveles séricos de ácidos grasos.

Para analizar la asociación entre la abundancia de microbiota y los niveles séricos de ácidos grasos se usó la regresión lineal simple y múltiple ajustada en función de las variables de confusión edad, sexo e índice de masa corporal.

Para todas las pruebas se ha establecido un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados

Las características de los participantes se muestran en la **Tabla 1**, en función del género, la edad, el IMC y el tipo de educación de sus progenitores. No se observan diferencias significativas en las características de los participantes del estudio más que en la variable género ( $p < 0,001$ ); un 35% (N=6) pertenece al género femenino y un 65% (N=11) al masculino.

**Tabla 1:** Características principales de los participantes del estudio

	<b>Muestra total n=17</b>	<b>Muestras inicio como control (n=12)</b>	<b>Muestras inicio como intervención (n=5)</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Género n (%)</b> Femenino Masculino	6 (35%) 11 (65%)	1 11	5 0	13	<0,001
Edad $\pm$ DE (años)	20,1 $\pm$ 2,36	19,6 $\pm$ 1,72	21 $\pm$ 3,31	12,0	0,064
Índice de masa corporal $\pm$ DE(kg/m <sup>2</sup> )	24,3 $\pm$ 4,23	23,2 $\pm$ 3,97	27 $\pm$ 3,92	15,5	0,140
<b>Educación de la madre n(%)</b> Básica Media Superior	1 (6%) 10 (59%) 6 (35%)	0 (0%) 5 (41,67 %) 7 (58,33 %)	1 (20 %) 3 (60 %) 1 (20 %)	5,92	0,314
<b>Educación del padre n (%)</b> Básica Media Superior	3 (18%) 10 (59%) 4 (23%)	1 (8,33%) 6 (50 %) 5 (41,67%)	1 (20 %) 4 (80 %) 0 (0 %)	5,12	0,529

media, DE: desviación estándar

En la **Tabla 2** se muestran las medias de los AG por grupo de intervención y control, al inicio y al final de ambos periodos, así como las diferencias de las medias en el tiempo entre ambos grupos en la muestra total. Observamos en el grupo control (dieta de pollo convencional) una disminución significativa de las medias del ácido linoleico ( $p=0,045$ ), del ácido araquidónico ( $p= 0,031$ ), DUFA ( $p= 0,045$ ), PUFA n6 ( $p=0,011$ ) y PUFA >18C n6 ( $p=0,031$ ). No se observan diferencias significativas en las medias del grupo intervención en ningún AG. Solamente se observaron diferencias significativas entre las diferencias de medias del grupo control e intervención para DHA.

La **Tabla 3** presenta la descripción de la abundancia relativa para los filios más importantes detectados en las muestras. Tanto el grupo control como el grupo intervención presentan un porcentaje de abundancia superior al 93% de Firmicutes, seguido por Actinobacteria con porcentajes variables entre 2-3 % y el resto de filios con porcentajes inferiores al 2%. Atendiendo al cambio de abundancias en el momento final respecto al inicial para cada grupo, varios filios muestran cambios significativos. El grupo control presenta una disminución significativa en la abundancia de los filios *Chloroflexi* ( $p \leq 0,003$ ) y Synergistetes ( $p \leq 0,003$ ), mientras que el grupo intervención muestra una disminución significativa de la abundancia de Proteobacteria ( $p = 0,021$ ). Solamente se observaron diferencias significativas entre las diferencias de medias del grupo control e intervención para el filo Synergistetes.

**Tabla 2:** Medias  $\pm$  desviación estándar de los AG por grupo de intervención y control: antes, después y diferencias medias en el tiempo entre ambos grupos en la muestra total

	CONTROL (n=17)				INTERVENCIÓN (n=17)				Diferencias de medias entre el principio y el final entre ambos grupos (n=17)			
	INICIO	FINAL	F	P	INICIO	FINAL	F	P	Diferencias de medias	IC	F	P
Ácido palmítico (%)	22,568 $\pm$ 3,58	22,752 $\pm$ 3,23	77,5	0,981	21,608 $\pm$ 2,07	21,463 $\pm$ 1,95	77,0	1,000	0,157	-1,515;2,24	72	0,856
Ácido esteárico (%)	7,392 $\pm$ 1,042	7,599 $\pm$ 0,708	68,0	0,712	7,194 $\pm$ 0,778	7,041 $\pm$ 0,892	100,0	0,284	0,405	-0,605;1,345	100	0,284
Ácido oleico (%)	19,129 $\pm$ 3,31	19,568 $\pm$ 2,55	71,0	0,813	19,088 $\pm$ 2,73	19,616 $\pm$ 2,71	68,0	0,712	-0,005	-2,86;2,65	75,0	0,963
Ácido linoleico (LA) (%)	40,018 $\pm$ 5,46	38,621 $\pm$ 4,22	119,0	<b>0,045*</b>	39,430 $\pm$ 4,54	39,156 $\pm$ 3,60	82,0	0,818	-1,465	4,155;1,49	55,0	0,329
Acido araquidónico (AA) (%)	7,719 $\pm$ 2,09	7,105 $\pm$ 1,99	122,0	<b>0,031*</b>	7,405 $\pm$ 1,38	7,138 $\pm$ 1,02	89,0	0,579	-0,370	-1,290;0,605	62,0	0,517
Ácido behénico (%)	0,304 $\pm$ 0,464	0,387 $\pm$ 0,441	15,0	0,726	0,632 $\pm$ 0,384	0,571 $\pm$ 0,353	79,0	0,103	0,115	-0,080;0,375	92,0	0,478
Ácido eicosapentaenoico (EPA) (%)	0,000 $\pm$ 0,000	0,027 $\pm$ 0,112	0,00	1,00	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,00	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
Ácido tricosanoico (%)	0,397 $\pm$ 0,648	0,677 $\pm$ 0,797	8,00	0,183	1,085 $\pm$ 0,869	1,218 $\pm$ 0,910	40,00	0,451	0,210	-0,430;0,785	90,00	0,548
Ácido lignocérico (%)	0,404 $\pm$ 0,486	0,491 $\pm$ 0,506	29,0	0,756	0,570 $\pm$ 0,457	0,761 $\pm$ 0,363	43,0	0,205	-0,115	-0,395;0,220	56,0	0,353
Ácido nervónico (%)	0,748 $\pm$ 0,864	0,798 $\pm$ 0,856	34,0	0,965	1,301 $\pm$ 0,826	1,215 $\pm$ 0,711	81,0	0,518	0,090	-0,415;0,820	86,0	0,678
Ácido docosahexaenoico (DHA) (%)	1,323 $\pm$ 0,904	1,979 $\pm$ 2,706	59,0	0,977	1,686 $\pm$ 0,634	1,818 $\pm$ 0,519	73,5	0,906	1,725	1,315;2,675	150,0	<b>&lt;,001*</b>
SFA (%)	31,063 $\pm$ 4,03	31,904 $\pm$ 3,21	62,0	0,517	31,091 $\pm$ 2,07	31,055 $\pm$ 2,23	80,0	0,890	0,720	-1,28;3,210	95,0	0,404
UFA (%)	68,937 $\pm$ 4,03	68,096 $\pm$ 3,21	91,0	0,517	68,909 $\pm$ 2,07	68,945 $\pm$ 2,23	73,0	0,890	-0,720	-3,210;1,27	57,0	0,378
MUFA (%)	19,876 $\pm$ 3,70	20,365 $\pm$ 2,95	76,0	1,000	20,389 $\pm$ 2,86	20,829 $\pm$ 2,62	66,0	0,644	0,200	-2,83;2,94	79,0	0,927
DUFA (%)	40,18 $\pm$ 5,46	38,621 $\pm$ 4,22	119,0	<b>0,045*</b>	39,430 $\pm$ 4,54	39,156 $\pm$ 3,60	82,0	0,818	-1,465	-4,155;1,49	55,0	0,329
MUFA/DUFA (%)	0,510 $\pm$ 0,139	0,537 $\pm$ 0,113	64,0	0,570	0,531 $\pm$ 0,130	0,541 $\pm$ 0,109	74,5	0,943	0,02	-0,08;0,11	90,0	0,538
PUFA (%)	49,059 $\pm$ 4,16	47,732 $\pm$ 3,70	113,5	0,084	48,520 $\pm$ 4,39	48,116 $\pm$ 3,56	84,0	0,747	-0,930	-4,110;2,09	64,0	0,579
MUFA/PUFA (%)	0,411 $\pm$ 0,100	0,432 $\pm$ 0,087	75,0	0,962	0,428 $\pm$ 0,0946	0,437 $\pm$ 0,0849	71,0	0,813	0,016	-0,10;0,1051	73,5	0,796
PUFA n6 (%)	45,308 $\pm$ 10,44	43,544 $\pm$ 10,29	131,0	<b>0,011*</b>	46,835 $\pm$ 4,24	46,297 $\pm$ 3,65	86,0	0,678	-1,405	-4,195;1,65	56,0	0,353
PUFA n3 (%)	1,323 $\pm$ 0,904	2,006 $\pm$ 2,710	57,0	0,887	1,686 $\pm$ 0,634	1,818 $\pm$ 0,519	73,5	0,906	-0,030	-0,975;0,595	75,0	0,963
PUFA > 18C n6 (%)	7,719 $\pm$ 2,09	7,105 $\pm$ 1,99	122,0	<b>0,031*</b>	7,405 $\pm$ 1,38	7,138 $\pm$ 1,02	89,0	0,579	-0,370	-1,290;0,605	62,0	0,517
PUFA > 18C n3 (%)	1,323 $\pm$ 0,904	2,006 $\pm$ 2,710	57,0	0,887	1,686 $\pm$ 0,634	1,818 $\pm$ 0,519	73,5	0,906	0,0300	-0,595;0,975	78,0	0,963
UI	4,286 $\pm$ 0,664	4,0553 $\pm$ 0,631	113,5	0,084	4,1741 $\pm$ 0,469	4,1441 $\pm$ 0,491	72,0	0,856	-0,1600	-0,7000;0,250	58,0	0,404
SFA/MUFA (%)	1,646 $\pm$ 0,567	1,6041 $\pm$ 0,322	71,0	0,813	1,5482 $\pm$ 0,192	1,5118 $\pm$ 0,206	84,0	0,740	0,0650	-0,2549;0,325	84,0	0,740
PUFA n6/PUFA n3 (%)	28,6 $\pm$ 9,70	33,8 $\pm$ 27	30	0,519	28,3 $\pm$ 8,08	27,2 $\pm$ 6,61	88	0,323	1,01	-4,34;21,53	43,0	0,791

El símbolo \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de ácidos grasos dentro del grupo control e intervención en comparación con los niveles iniciales. Las siglas NaN (*not-a-number*) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. IC: intervalo de confianza, AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, DUFA: ácido graso diinsaturado, EPA: ácido eicosapentaenoico, LA: ácido linoleico, MUFA: ácido graso monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6, PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3, SFA: ácido graso saturado, UFA: ácidos graso insaturado, UI: índice de insaturación



**Tabla 3.** Abundancias relativas (%) de bacterias en la microbiota fecal de los participantes estudiados a nivel de filos por grupo y momento.

	CONTROL (n=17)				INTERVENCIÓN (n=17)				Diferencias de medias entre el principio y el final entre ambos grupos (n=17)			
	INICIO	FINAL	F	P	INICIO	FINAL	F	P	Diferencia de medias	IC	F	P
<b>Actinobacteria</b>	3,1855±1,443	2,8439±2,8439	91,0	0,517	2,0729±0,948	2,0482±0,648	76,0	1,000	-0,3104	-1,9227;1,275	67,0	0,678
<b>Bacteroidetes</b>	0,1178±0,1274	0,0854±0,1195	105,5	0,177	0,1315±0,2679	0,0373±0,0499	106,0	0,052	0,03330	-0,0583;0,1666	92,0	0,487
<b>Chloroflexi</b>	0,907±0,710	0,183±0,384	77,0	<b>0,003*</b>	0,423±0,725	0,000±0,000	15,0	0,059	-0,328	-1,145;0,341	57,0	0,378
<b>Firmicutes</b>	93,15±3,040	95,11±3,901	44,0	0,132	96,05±3,097	97,56±0,970	59,0	0,431	0,0528	-3,09;5,185	77,0	1,000
<b>Proteobacteria</b>	0,734±0,606	1,171±2,161	76,0	1,000	0,464±0,535	0,119±0,200	113,0	<b>0,021*</b>	0,433	-0,3829;1,768	100,0	0,284
<b>Synergistetes</b>	1,406±1,091	0,250±0,738	78,00	<b>0,003*</b>	0,539±0,954	0,000±0,000	15,00	0,059	-1,70	-2,102;-1,33	0,00	<b>&lt;,001*</b>

Los datos se presentan como medias ± desviación estándar. La tabla solo muestra las abundancias de los filos más importantes. Control: sujetos con dieta a base de carne de pollo; intervención: sujetos con dieta a base de carne de ternera. Las comparaciones entre las abundancias relativas al inicio y después de la ingesta de cada tipo de dieta se analizaron mediante comparación de medias para muestras apareadas. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en abundancia relativa dentro del grupo control e intervención en comparación con la abundancia relativa inicial. IC: intervalo de confianza.

En las **tablas 4.1, 4.2 y 4.3** se muestra el modelo 0, que analiza mediante una regresión lineal simple los niveles de ácidos grasos (variable dependiente) en función de la abundancia relativa de los filos, separados por grupo intervención y control. Se muestran los coeficientes de regresión o valores  $\beta$  (*estimate*), los intervalos de confianza (IC) y la significación estadística (p) para cada filo.

Se han encontrado asociaciones lineales negativas en el filo Actinobacteria del grupo intervención para el ácido behénico ( $\beta=-0,20$ , IC=-0,31;-0,09,  $p=0,002$ ), en el filo Chloroflexi del grupo intervención para MUFA ( $\beta= -2,41$ , IC=-4,57;-0,26  $p=0,031$ ), MUFA/DUFA ( $\beta=-0,10$ , IC=-0,19;-0,01  $p= 0,035$ ) y MUFA/PUFA ( $\beta=-0,07$ , IC=-0,14;-0,003  $p= 0,043$ ), en el filo Proteobacteria del grupo intervención para el ácido behénico ( $\beta=-0,36$ , IC=-0,64;-0,08  $p=0,014$ ) y en el filo Synergistetes del grupo control para PUFA ( $\beta=-1,53$ , IC=-3,02;-0,03,  $p=0,046$ ), mientras que se han observado asociaciones lineales positivas con significación estadística en el filo Firmicutes del grupo intervención para el ácido behénico ( $\beta=0,07$ , IC= 0,03;0,11,  $p= 0,004$ ), MUFA ( $\beta=0,48$ , IC=0,03;0,93  $p=0,04$ ) y MUFA/DUFA ( $\beta=0,02$ , IC=0,002;0,04  $p=0,036$ ), y en el filo Proteobacteria del grupo control para PUFAn6/PUFAn6 ( $\beta=5,57$ , IC=1,14;10,0  $p=0,019$ ).

En las **tablas 5.1, 5.2, 5.3** se muestra el modelo ajustado, una regresión lineal múltiple entre ácidos grasos (variable dependiente) y la abundancia relativa de los filos por grupo intervención y control, ajustado en función de las variables de confusión sexo, edad e IMC. Se muestran los coeficientes de regresión o valores  $\beta$  (*estimate*), los intervalos de confianza (IC) y la significación estadística (p) para cada filo.

Se han encontrado asociaciones lineales negativas en el filo Actinobacteria del grupo intervención para el ácido behénico ( $\beta=-0,23$ , IC=-0,37;-0,08,  $p=0,005$ ), en el filo Chloroflexi del grupo control para PUFAn6 ( $\beta -2,90$ , IC=-5,56;-0,24,  $p=0,035$ ). Se han observado asociaciones lineales positivas con significación estadística en el filo Firmicutes del grupo intervención para el ácido behénico ( $\beta=0,13$ , IC=0,06;0,20,  $p=0,001$ ) y en el filo Firmicutes del grupo control para PUFA ( $\beta=0,26$ , IC=-4,42;0,52,  $p=0,050$ ). No se han encontrado asociaciones significativas en más filos.

Por tanto, tras ajustar el modelo según los factores de confusión, desaparecen las asociaciones lineales significativas de los filos Proteobacteria y Synergistetes, mientras que se mantienen las de los filos Actinobacteria y Firmicutes para el ácido behénico. Por otra parte, desaparece la asociación negativa de filo *Chloroflexi* con MUFA y aparece con PUFA n6, y también desaparece la asociación positiva del filo Firmicutes con MUFA, apareciendo en su lugar con PUFA.

**Tabla 4.1:** Regresión lineal simple entre ácidos grasos (variable dependiente) y la abundancia relativa de los filos Actinobacteria y Bacteroidetes por grupo (variable independiente), modelo sin ajustar.

	ACTINOBACTERIA						BACTEROIDETES					
	CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)			CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)		
	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p
<b>Ácido palmítico (%)</b>	0,08	-0,59;0,74	0,804	0,04	-0,91;1,00	0,923	1,22	-7,37;9,82	0,766	-0,22	-4,59;4,15	0,916
<b>Ácido esteárico (%)</b>	0,16	-0,07;0,39	0,151	0,14	-0,27;0,55	0,476	-0,33	-3,51;2,85	0,828	1,33	-0,44;3,01	0,129
<b>Ácido oleico (%)</b>	0,11	-0,61;0,83	0,748	-0,88	-2,22;0,45	0,178	6,14	-2,55;14,8	0,153	-1,82	-8,23;4,59	0,553
<b>Ácido linoleico (LA) (%)</b>	-0,57	-1,21;0,07	0,075	1,53	-0,12;3,18	0,066	-7,69	-15,92;0,53	0,065	1,25	-7,17;9,67	0,756
<b>Ácido araquidónico (AA) (%)</b>	0,21	-0,04;0,45	0,090	-0,163	-0,73;0,40	0,548	-0,21	-3,68;3,26	0,897	-0,49	-3,09;2,11	0,694
<b>Ácido behénico (%)</b>	0,03	-0,06;0,12	0,507	-0,20	-0,31;-0,09	<b>0,002*</b>	0,17	-0,99;1,32	0,764	-0,09	-0,81;0,63	0,788
<b>Ácido eicosapentaenoico EPA (%)</b>	-0,01	-0,03;0,02	0,703	NaN	NaN	NaN	-0,07	-0,40;0,26	0,651	NaN	NaN	NaN
<b>Ácido tricosanoico (%)</b>	0,03	-0,15;0,21	0,715	-0,10	-0,45;0,26	0,569	0,95	-1,28;3,19	0,378	0,37	-1,24;1,98	0,633
<b>Ácido lignocérico (%)</b>	-0,02	-0,13;0,08	0,634	-0,08	-0,28;0,12	0,422	-0,98	-2,24;0,29	0,120	-0,06	-0,10;0,88	0,892
<b>Ácido nervónico (%)</b>	-0,02	-0,21;0,17	0,803	-0,25	-0,60;0,12	0,176	0,03	-2,43;2,49	0,979	-0,68	-2,45;1,09	0,426
<b>Ácido docosahexaenoico DHA (%)</b>	0,01	-0,62;0,64	0,970	-0,05	-0,32;0,23	0,706	0,78	-7,34;8,89	0,841	0,42	-0,84;1,68	0,488
<b>SFA (%)</b>	0,28	-0,42;0,97	0,411	-0,19	-1,30;0,93	0,727	1,04	-8,14;10,23	0,812	1,33	-3,74;6,41	0,584
<b>UFA (%)</b>	-0,28	-0,97;0,42	0,411	0,19	-0,93;1,3	0,727	-1,04	-10,23;8,14	0,812	-1,33	-6,41;3,74	0,584
<b>MUFA (%)</b>	0,09	-0,69;0,86	0,814	-1,13	-2,43;0,17	0,083	6,16	-3,30;15,62	0,185	-2,50	-8,93;3,94	0,421
<b>DUFA (%)</b>	-0,57	-1,21;0,07	0,075	1,53	-0,12; 3,18	0,066	-7,69	-15,92;0,53	0,065	1,25	-7,17;9,67	0,756
<b>MUFA/DUFA (%)</b>	0,01	-0,02;0,03	0,480	-0,05	-0,10;0,01	0,057	0,21	-0,07;0,49	0,123	-0,08	-0,35;0,19	0,547
<b>PUFA (%)</b>	-0,36	-1,05;0,32	0,280	1,32	-0,46;3,09	0,134	-7,19	-15,54;1,15	0,086	1,18	-7,56;9,91	0,778
<b>MUFA/PUFA (%)</b>	0,01	-0,02;0,03	0,689	-0,04	-0,08;0,01	0,091	0,18	-0,08;0,43	0,166	-0,05	-0,25;0,16	0,629
<b>PUFA n6 (%)</b>	-0,25	0,93;0,44	0,454	1,37	-0,26;3,00	0,093	-7,40	-15,47;0,66	0,069	0,75	-7,43;8,93	0,847
<b>PUFA n3 (%)</b>	0,01	-0,62;0,63	0,982	-0,05	-0,33;-0,33	0,706	0,71	-7,38;8,79	0,855	0,42	-0,84;1,68	0,488
<b>PUFA &gt; 18C n6 (%)</b>	0,21	-0,04;0,45	0,090	-0,16	-0,73;0,40	0,548	-0,21	-3,68;3,26	0,897	-0,49	-3,09;2,11	0,694
<b>PUFA &gt; 18C n3 (%)</b>	0,01	-0,62;0,63	0,982	-0,05	-0,33;0,23	0,706	0,71	-7,38;8,79	0,855	0,42	-0,84;1,68	0,488
<b>UI</b>	-0,07	-0,23;0,10	0,404	0,08	-0,17;0,33	0,494	-0,80	-2,89;1,29	0,428	-0,26	-1,41;0,90	0,645
<b>SFA/MUFA (%)</b>	0,06	-0,05;0,16	0,262	0,07	-0,03;0,18	0,167	-0,46	-1,87;0,96	0,502	0,38	-0,10;0,86	0,112
<b>PUFA n6/PUFA n3 (%)</b>	3,33	-3,58;10,3	0,308	-0,38	-2,98;2,22	0,758	-5,37	-89,1;78,4	0,889	-4,52	-14,62;5,58	0,353

El símbolo \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de ácidos grasos dentro del grupo control e intervención en comparación con los niveles iniciales. Las siglas NaN (*not-a-number*) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. Estimate: coeficientes de regresión o valor  $\beta$ , IC: intervalos de confianza, p: significación estadística, AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, DUFA: ácido graso diinsaturado, EPA: ácido eicosapentaenoico, LA: ácido linoleico, MUFA: ácido graso monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6, PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3, SFA: ácido graso saturado, UFA: ácidos graso insaturado, UI: índice de insaturación

**Tabla 4.2:** Regresión lineal simple entre ácidos grasos (variable dependiente) y la abundancia relativa de los filos Chloroflexi y Firmicutes por grupo (variable independiente), modelo sin ajustar.

	CHLOROFLEXI						FIRMICUTES					
	CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)			CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)		
	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p
Ácido palmítico (%)	0,86	-1,43;3,14	0,438	-0,27	-1,95;1,41	0,735	0,04	-0,34;0,26	0,791	-0,02	-0,37;0,32	0,887
Ácido esteárico (%)	0,10	-0,76;0,97	0,802	0,55	-0,12;1,22	0,101	-0,07	-0,17;0,04	0,181	-0,12	-0,26;0,02	0,090
Ácido oleico (%)	1,00	-1,46;3,46	0,401	-2,06	-4,28;0,17	0,068	-0,14	-0,46;0,18	0,373	0,37	-0,10;0,85	0,112
Ácido linoleico (LA) (%)	-2,13	-4,34;0,09	0,059	2,63	-0,28;5,54	0,073	0,20	-0,11;0,50	0,190	-0,54	-1,14;0,06	0,074
Ácido araquidónico (AA) (%)	-0,11	-1,04;0,83	0,814	0,09	-0,92;1,09	0,860	-0,06	-0,18;0,05	0,272	0,01	-0,20;0,22	0,938
Ácido behénico (%)	0,01	-0,30;0,33	0,923	-0,22	-0,47;0,03	0,075	-0,01	-0,04;0,04	0,865	0,07	0,03;0,11	<b>0,004*</b>
Ácido eicosapentaenoico EPA (%)	-0,03	0,15;0,06	0,534	NaN	NaN	NaN	0,01	-0,01;0,02	0,597	NaN	NaN	NaN
Ácido tricosenoico (%)	0,32	-0,27;0,92	0,267	-0,31	-0,91;0,29	0,289	-0,02	-0,10;0,06	0,662	0,074	-0,05;0,20	0,214
Ácido lignocérico (%)	-0,13	-0,49;0,24	0,477	0,01	-0,35;0,37	0,952	0,02	-0,03;0,07	0,340	0,03	-0,05;0,10	0,455
Ácido nervónico (%)	-0,20	-0,86;0,46	0,520	-0,35	-1,02;0,32	0,277	0,02	-0,07;0,10	0,677	0,10	-0,03;0,21	0,115
Ácido docosahexaenoico DHA (%)	0,30	-1,89;2,50	0,774	-0,06	-0,55;0,43	0,798	0,09	-0,19;0,37	0,520	0,03	-0,07;0,13	0,553
SFA (%)	1,17	-1,24;3,58	0,318	-0,24	-2,21;1,72	0,795	-0,11	-0,42;0,21	0,491	0,03	-0,38;0,44	0,886
UFA (%)	-1,17	-3,58;1,24	0,318	0,24	-1,72;2,21	0,795	0,11	-0,21;0,42	0,491	-0,03	-0,44;0,38	0,886
MUFA (%)	0,80	-1,89;3,49	0,536	-2,41	-4,57;-0,26	<b>0,031*</b>	-0,12	-0,47;0,23	0,472	0,48	0,03;0,93	<b>0,039*</b>
DUFA (%)	-2,13	-4,34;0,09	0,059	2,63	-0,28;5,54	0,073	0,20	-0,11;0,50	0,190	-0,54	-1,14;0,06	0,074
MUFA/DUFA (%)	0,04	-0,034;0,12	0,247	-0,10	-0,19;-0,01	<b>0,035*</b>	-0,01	-0,02;0,01	0,340	0,02	0,01;0,04	<b>0,036*</b>
PUFA (%)	-1,96	-4,22;0,30	0,084	2,66	-0,381;5,69	0,082	0,22	-0,08;0,52	0,132	-0,51	-1,14;0,13	0,112
MUFA/PUFA (%)	0,03	-0,04;0,11	0,333	-0,072	-0,14;-0,01	<b>0,043*</b>	-0,01	-0,01;0,01	0,367	0,01	-2,36;0,03	0,053
PUFA n6 (%)	-1,82	-4,05;0,41	0,103	2,72	-0,06;5,49	0,054	0,09	-0,22;0,40	0,548	-0,53	-1,12;0,05	0,069
PUFA n3 (%)	0,28	-1,91;2,46	0,793	-0,06	-0,55;0,43	0,798	0,09	-0,19;0,37	0,503	0,30	-0,07;0,13	0,553
PUFA > 18C n6 (%)	-0,11	-1,04;0,83	0,814	0,09	-0,92;1,09	0,860	-0,06	-0,18;0,05	0,272	0,10	-0,20;0,22	0,938
PUFA > 18C n3 (%)	0,28	-1,91;2,46	0,793	-0,06	-0,55;0,43	0,798	0,09	-0,19;0,37	0,503	0,03	-0,07;0,13	0,553
UI	-0,35	-0,90;0,19	0,186	0,16	-0,28;0,60	0,446	0,02	-0,05;0,10	0,503	-0,03	-0,12;0,07	0,543
SFA/MUFA (%)	0,08	-0,30;0,47	0,651	0,17	-0,01;0,35	0,062	-0,02	-0,07;0,04	0,531	-0,04	-0,07;0,01	0,065
PUFA n6/PUFA n3 (%)	-7,18	-29,9;15,6	0,498	-0,74	-4,95;3,47	0,711	-1,62	-4,27;1,02	0,201	0,17	-0,77;1,12	0,702

El símbolo \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de ácidos grasos dentro del grupo control e intervención en comparación con los niveles iniciales. Las siglas NaN (*not-a-number*) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. Estimate: coeficientes de regresión o valor  $\beta$ , IC: intervalos de confianza, p: significación estadística, AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, DUFA: ácido graso diinsaturado, EPA: ácido eicosapentaenoico, LA: ácido linoleico, MUFA: ácido graso monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6, PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3, SFA: ácido graso saturado, UFA: ácidos graso insaturado, UI: índice de insaturación

**Tabla 4.3:** Regresión lineal simple entre ácidos grasos (variable dependiente) y la abundancia relativa de los filos Proteobacteria y Synergistetes por grupo (variable independiente), modelo sin ajustar.

	PROTEOBACTERIA						SYNERGISTETES					
	CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)			CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)		
	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p
Ácido palmítico (%)	-0,06	-0,77;0,65	0,864	0,417	-1,65;2,49	0,674	0,67	-0,89;2,23	0,374	NaN	NaN	NaN
Ácido esteárico (%)	0,18	-0,07;0,42	0,147	0,48	-0,39;1,35	0,257	-0,10	-0,69;0,49	0,724	NaN	NaN	NaN
Ácido oleico (%)	0,30	-0,45;1,05	0,406	-1,21	-4,22;1,81	0,407	0,75	-0,94;2,43	0,359	NaN	NaN	NaN
Ácido linoleico (LA) (%)	0,05	-0,71;0,82	0,888	2,63	-1,13;6,38	0,157	-1,05	-2,67;0,561	0,184	NaN	NaN	NaN
Acido araquidónico (AA) (%)	0,11	-0,17;0,39	0,420	-0,09	-1,33;1,15	0,877	-0,13	-0,77;0,51	0,673	NaN	NaN	NaN
Ácido behénico (%)	-0,02	-0,12;0,07	0,596	-0,36	-0,64;-0,08	<b>0,014*</b>	0,07	-0,14;0,28	0,504	NaN	NaN	NaN
Ácido eicosapentaenoico EPA (%)	-0,01	-0,03;0,02	0,651	NaN	NaN	NaN	-0,01	-0,07;0,05	0,707	NaN	NaN	NaN
Ácido tricosenoico (%)	-0,04	-0,23;0,15	0,656	-0,65	-1,34;0,029	0,059	0,32	-0,06;0,71	0,095	NaN	NaN	NaN
Ácido lignocérico (%)	-0,05	-0,16;0,06	0,353	-0,27	-0,69;0,15	0,194	-0,07	-0,32;0,18	0,573	NaN	NaN	NaN
Ácido nervónico (%)	-0,03	-0,23;0,18	0,787	-0,57	-1,38;0,23	0,149	-0,11	-0,56;0,35	0,621	NaN	NaN	NaN
Ácido docosahexaenoico DHA (%)	-0,43	-1,06;0,20	0,164	-0,37	-0,95;0,20	0,189	-0,33	-1,83;1,17	0,644	NaN	NaN	NaN
SFA (%)	0,003	-0,76;0,76	0,993	-0,39	-2,82;2,05	0,741	0,89	-0,75;2,53	0,265	NaN	NaN	NaN
UFA (%)	-0,003	-0,76;0,76	0,993	0,36	-2,05;2,82	0,741	-0,89	-2,53;0,75	0,265	NaN	NaN	NaN
MUFA (%)	0,28	-0,54;1,09	0,483	-1,78	-4,76;1,19	0,221	0,64	-1,19;2,47	0,468	NaN	NaN	NaN
DUFA (%)	0,05	-0,712;0,815	0,888	2,63	-1,13;6,38	0,157	-1,05	-2,67;0,56	0,184	NaN	NaN	NaN
MUFA/DUFA (%)	0,01	-0,02;0,03	0,644	-0,09	-0,21;0,04	0,150	0,03	-0,03;0,08	0,334	NaN	NaN	NaN
PUFA (%)	-0,28	-1,02;0,47	0,444	2,17	-1,83;6,16	0,265	-1,53	-3,02;-0,032	<b>0,046*</b>	NaN	NaN	NaN
MUFA/PUFA (%)	0,01	-0,02;0,03	0,468	-0,06	-0,15;0,04	0,204	0,03	-0,02;0,08	0,297	NaN	NaN	NaN
PUFA n6 (%)	0,15	-0,59;0,89	0,674	2,54	-1,10;6,18	0,158	-0,87	-2,48;0,74	0,266	NaN	NaN	NaN
PUFA n3 (%)	-0,44	-1,06;0,19	0,156	-0,37	-0,95;0,20	0,189	-0,34	-1,83;1,15	0,631	NaN	NaN	NaN
PUFA > 18C n6 (%)	0,11	-0,17;0,39	0,420	-0,09	-1,33;1,15	0,877	-0,13	-0,77;0,51	0,673	NaN	NaN	NaN
PUFA > 18C n3 (%)	-0,44	-1,06;0,19	0,156	-0,37	-0,95;0,20	0,189	-0,34	-1,83;1,15	0,631	NaN	NaN	NaN
UI	0,01	-0,16;0,19	0,869	0,18	-0,37;0,72	0,497	-0,21	-0,59;0,17	0,249	NaN	NaN	NaN
SFA/MUFA (%)	0,01	-0,11;0,12	0,927	0,10	-0,14;0,35	0,374	0,02	-0,25;0,28	0,900	NaN	NaN	NaN
PUFA n6/PUFA n3 (%)	<b>5,57</b>	<b>1,14;10,0</b>	<b>0,019*</b>	0,83	-5,30;6,97	0,775	-2,88	-18,0;12,2	0,681	NaN	NaN	NaN

El símbolo \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de ácidos grasos dentro del grupo control e intervención en comparación con los niveles iniciales. Las siglas NaN (*not-a-number*) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. Estimate: coeficientes de regresión o valor  $\beta$ , IC: intervalos de confianza, p: significación estadística, AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, DUFA: ácido graso diinsaturado, EPA: ácido eicosapentaenoico, LA: ácido linoleico, MUFA: ácido graso monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6, PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3, SFA: ácido graso saturado, UFA: ácidos graso insaturado, UI: índice de insaturación

**Tabla 5.1:** Regresión lineal múltiple entre ácidos grasos (variable dependiente) y la abundancia relativa de los filos Actinobacteria y Bacteroidetes por grupo, modelo ajustado en función del sexo, edad e IMC.

	ACTINOBACTERIA						BACTEROIDETES					
	CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)			CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)		
	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p
Ácido palmítico (%)	0,05	-0,71;0,81	0,885	0,28	-1,03;1,59	0,651	2,16	-8,73; 13,04	0,673	0,52	-5,15;6,18	0,846
Ácido esteárico (%)	0,08	-0,15;0,31	0,457	-0,14	-0,63;0,35	0,555	1,61	-1,57;4,78	0,292	0,74	-1,35;2,82	0,457
Ácido oleico (%)	0,27	-0,50;1,05	0,456	-0,50	-2,29;1,29	0,558	4,55	-6,48;15,59	0,386	-0,11	-7,92;7,70	0,976
Ácido linoleico (LA) (%)	-0,72	-1,33;-0,12	<b>0,024<sup>^</sup></b>	1,11	-1,08;3,30	0,292	-0,12	-18,37;0,21	0,055	-1,47	-11,31;8,37	0,750
Ácido araquidónico (AA) (%)	0,16	-0,08;0,40	0,174	-0,06	-0,79;0,68	0,874	1,54	-2,10;5,17	0,375	0,08	-3,08;3,24	0,957
Ácido behénico (%)	0,03	-0,07;0,13	0,495	-0,23	-0,37;-0,08	<b>0,005*</b>	0,19	-1,27;1,65	0,782	0,03	-0,85;0,90	0,946
Ácido eicosapentaenoico EPA (%)	-0,01	-0,04;0,02	0,572	NaN	NaN	NaN	-0,06	-0,49;0,36	0,749	NaN	NaN	NaN
Ácido tricosanoico (%)	0,06	-0,12;0,23	0,515	-0,10	-0,50;0,29	0,583	0,09	-2,51;2,69	0,941	0,51	-1,9;2,21	0,525
Ácido lignocérico (%)	-0,01	-0,13;0,12	0,918	-0,09	-0,35;0,18	0,493	-1,68	-3,08;-0,28	<b>0,023<sup>^</sup></b>	-0,12	-1,29;1,05	0,826
Ácido nervónico (%)	0,02	-0,20;0,23	0,855	-0,27	-0,76;0,2	0,258	-0,83	-3,86;2,20	0,561	-0,69	-2,89;1,51	0,508
Ácido docosahexaenoico DHA (%)	0,07	-0,66;0,80	0,842	-0,14	-0,50;0,21	0,399	1,52	-8,95;11,98	0,757	0,19	-1,39;1,77	0,795
SFA (%)	0,21	-0,55;0,97	0,554	-0,27	-1,82;1,23	0,709	2,37	-8,60;13,33	0,647	1,68	-4,94;8,30	0,591
UFA (%)	-0,21	-0,97;0,55	0,554	0,27	-1,28;1,82	0,709	-2,37	-13,33; 8,60	0,647	-1,68	-8,30;4,94	0,591
MUFA (%)	0,29	-0,53;1,12	0,457	-0,77	-2,47;0,92	0,347	3,71	-8,20;15,63	0,510	-0,79	-8,39;6,81	0,825
DUFA (%)	-0,72	-1,33;-0,12	<b>0,024<sup>^</sup></b>	1,11	-1,08;3,30	0,292	-9,07	-18,37;0,23	0,055	-1,47	-11,31;8,37	0,750
MUFA/DUFA (%)	0,01	-0,01;0,04	0,210	-0,04	-0,11;0,03	0,262	0,18	-0,16;0,52	0,265	0,01	-0,31;0,31	0,986
PUFA (%)	-0,50	-1,07;0,07	0,078	1,04	-1,39;3,47	0,371	-6,06	-14,55;2,43	0,146	-0,88	-11,69;9,92	0,862
MUFA/PUFA (%)	0,01	-0,01;0,03	0,345	-0,03	-0,08;0,03	0,314	0,11	0,20;0,42	0,451	0,01	-0,24;0,25	0,981
PUFA n6 (%)	-0,41	-1,03;0,22	0,185	1,05	-1,14;3,25	0,317	-7,80	-16,21;0,61	0,066	-1,40	-11,22;8,41	0,761
PUFA n3 (%)	0,06	-0,67;0,79	0,859	-0,02	-0,36;0,32	0,916	1,45	-8,98;11,89	0,767	0,52	-0,90;1,94	0,443
PUFA > 18C n6 (%)	0,16	-0,08;0,40	0,174	-0,06	-0,79;0,68	0,874	1,54	-2,10; 5,20	0,375	0,08	-3,08;3,24	0,957
PUFA > 18C n3 (%)	0,06	-0,67;0,79	0,859	-0,02	-0,36;0,32	0,916	1,45	-8,98;11,89	0,767	0,52	-0,90;1,94	0,443
UI	-0,08	-0,24;0,08	0,303	0,08	-0,26;0,43	0,605	-0,89	-3,23;1,46	0,426	-0,39	-1,88;-1,88	0,575
SFA/MUFA (%)	0,01	-0,09;0,14	0,598	0,71	-0,10;0,18	0,569	0,06	-1,60;1,72	0,935	0,28	-0,31;0,87	0,317
PUFA n6/PUFA n3 (%)	3,37	-5,90;12,63	0,419	-0,55	-4,25;3,15	0,749	1,25	-108,90;111,40	0,979	-5,89	-19,24;7,47	0,353

El símbolo \* indica una asociación lineal significativa ( $p < 0,05$ ) entre ácidos grasos y microbiota intestinal dentro del grupo control o intervención. Las siglas NaN (not-a-number) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. El símbolo <sup>^</sup> indica un coeficiente de regresión cuyo intervalo de confianza no incluye 0, pero dentro de un modelo que ajustado en función de los factores de confusión no tiene significación estadística. Las siglas NaN (*not-a-number*) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. Estimate: coeficientes de regresión o valor  $\beta$ , IC: intervalos de confianza, p: significación estadística, AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, DUFA: ácido graso diinsaturado, EPA: ácido eicosapentaenoico, LA: ácido linoleico, MUFA: ácido graso monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6, PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3, SFA: ácido graso saturado, UFA: ácidos graso insaturado, UI: índice de insaturación

**Tabla 5.2:** Regresión lineal múltiple entre ácidos grasos (variable dependiente) y la abundancia relativa de los filos Chloroflexi y Firmicutes por grupo, modelo ajustado en función del sexo, edad e IMC.

	CHLOROFLEXI						FIRMICUTES					
	CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)			CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)		
	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p
Ácido palmítico (%)	0,49	-3,13;4,11	0,774	0,23	-3,80;4,26	0,904	-0,01	-0,37;0,36	0,935	-0,25	-0,91;0,42	0,434
Ácido esteárico (%)	-0,25	-1,34;0,85	0,631	-0,21	-1,71;1,30	0,771	-0,04	-0,14;0,07	0,495	-0,01	-0,26;0,25	0,979
Ácido oleico (%)	1,46	-2,21;5,12	0,403	-3,60	-8,66;1,46	0,147	-0,21	-0,56;0,14	0,213	0,38	-0,53;1,29	0,380
Ácido linoleico (LA) (%)	-3,43	-6,33;-0,53	<b>0,024<sup>^</sup></b>	3,80	-2,80;10,39	0,233	0,26	-0,05;0,58	0,095	-0,56	-1,69;0,58	0,306
Ácido araquidónico (AA) (%)	0,20	-1,05;1,44	0,737	1,32	-0,76;3,41	0,193	-0,06	-0,17;0,06	0,337	-0,08	-0,46;0,29	0,640
Ácido behénico (%)	-0,11	-0,59;0,38	0,640	-0,45	-0,93;0,04	0,070	-0,003	-0,05;0,06	0,901	<b>0,13</b>	<b>0,06;0,20</b>	<b>0,001*</b>
Ácido eicosapentaenoico EPA (%)	-0,04	-0,18;0,09	0,498	-3,60	-8,66;1,46	0,147	0,01	-0,01;0,02	0,462	0,38	-0,53;1,29	0,380
Ácido tricosanoico (%)	-0,01	-0,88;0,85	0,972	-0,48	-1,67;0,71	0,401	-0,01	-0,1;0,08	0,797	0,09	-0,11;0,29	0,324
Ácido lignocérico (%)	-0,09	-0,67;0,49	0,740	0,23	-0,59;1,05	0,548	0,01	-0,04;0,07	0,603	0,05	-0,09;0,18	0,491
Ácido nervónico (%)	-0,09	-1,10;0,93	0,855	-1,21	-2,60;0,19	0,085	-0,01	-0,10;0,10	0,974	0,26	0,04;0,47	<b>0,023<sup>^</sup></b>
Ácido docosahexaenoico DHA (%)	1,90	-1,38;5,16	0,232	-0,31	-1,42;0,79	0,548	0,05	-0,30;0,39	0,780	0,11	0,07;0,29	0,212
SFA (%)	0,03	-3,64;3,69	0,987	-0,69	-5,43;4,05	0,758	-0,05	-0,41;0,31	0,782	0,02	-0,79;0,82	0,961
UFA (%)	-0,03	-3,70;3,64	0,987	0,69	-4,05;5,43	0,758	0,05	-0,31;0,41	0,782	-0,02	-0,82;0,79	0,961
MUFA (%)	1,37	-2,56;5,30	0,462	-4,81	-9,29;-0,33	<b>0,037<sup>^</sup></b>	-0,21	-0,59;0,16	0,241	0,64	-0,18;1,46	0,117
DUFA (%)	-3,43	-6,33;-0,53	<b>0,024<sup>^</sup></b>	3,80	-2,80;10,39	0,233	0,26	-0,05;0,58	0,095	-0,56	-1,69;0,58	0,306
MUFA/DUFA (%)	0,07	-0,03;0,18	0,160	-0,19	-0,38;-0,01	<b>0,045<sup>^</sup></b>	-0,01	-0,02;0,003	0,139	0,03	-0,01;0,06	0,097
PUFA (%)	-1,39	-4,34;1,57	0,327	5,49	-1,37;12,35	0,107	<b>0,26</b>	<b>-4,42;0,52</b>	<b>0,050*</b>	-0,65	-1,89;0,58	0,269
MUFA/PUFA (%)	0,04	-0,06;0,143	0,390	-0,16	-0,30;-0,02	<b>0,028<sup>^</sup></b>	-0,01	-0,02;0,003	0,173	0,02	-0,01;0,05	0,107
PUFA n6 (%)	<b>-2,90</b>	<b>-5,56;-0,24</b>	<b>0,035*</b>	5,12	-1,09;11,33	0,097	0,16	-0,14;0,46	0,276	-0,64	-1,75;0,47	0,235
PUFA n3 (%)	1,85	-1,42;5,12	0,242	0,36	-0,65;1,37	0,449	0,05	-0,29;0,39	0,757	-0,02	-0,19;0,16	0,856
PUFA > 18C n6 (%)	0,20	-1,05;1,44	0,737	1,32	-0,76;3,41	0,193	-0,06	-0,17;0,06	0,337	-0,09	-0,46;0,29	0,640
PUFA > 18C n3 (%)	0,49	-3,13;4,11	0,774	0,23	-3,80;4,26	0,904	-0,01	-0,37;0,36	0,935	-0,25	-0,91;0,42	0,434
UI	-0,25	-1,34;0,85	0,631	-0,21	-1,71;1,30	0,771	-0,04	-0,14;0,07	0,495	-0,01	-0,26;0,25	0,979
SFA/MUFA (%)	1,46	-2,21;5,12	0,403	-3,60	-8,66;1,46	0,147	-0,21	-0,56;0,14	0,213	0,38	-0,53;1,29	0,380
PUFA n6/PUFA n3 (%)	-3,43	-6,33;-0,53	<b>0,024<sup>^</sup></b>	3,80	-2,80;10,39	0,233	0,26	-0,05;0,58	0,095	-0,56	-1,69;0,58	0,306

El símbolo \* indica una asociación lineal significativa ( $p < 0,05$ ) entre ácidos grasos y microbiota intestinal dentro del grupo control o intervención. Las siglas NaN (not-a-number) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. El símbolo <sup>^</sup> indica un coeficiente de regresión cuyo intervalo de confianza no incluye 0, pero dentro de un modelo que ajustado en función de los factores de confusión no tiene significación estadística. Las siglas NaN (*not-a-number*) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. Estimate: coeficientes de regresión o valor  $\beta$ , IC: intervalos de confianza, p: significación estadística, AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, DUFA: ácido graso diinsaturado, EPA: ácido eicosapentaenoico, LA: ácido linoleico, MUFA: ácido graso monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6, PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3, SFA: ácido graso saturado, UFA: ácidos graso insaturado, UI: índice de insaturación

**Tabla 5.3:** Regresión lineal múltiple entre ácidos grasos (variable dependiente) y la abundancia relativa de los filos Proteobacteria y Synergistetes por grupo, modelo ajustado en función del sexo, edad e IMC.

	PROTEOBACTERIA						SYNERGISTETES					
	CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)			CONTROL (n=17)			INTERVENCIÓN (n=17)		
	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p	Estimate	IC	p
Ácido palmítico (%)	-0,04	-0,86;0,78	0,920	1,15	-2,04;4,34	0,447	0,40	-2,18;2,98	0,743	NaN	NaN	NaN
Ácido esteárico (%)	0,09	-0,15;0,34	0,412	-0,15	-1,37;1,08	0,801	-0,15	-0,94;0,63	0,676	NaN	NaN	NaN
Ácido oleico (%)	0,54	-0,24;1,31	0,159	-0,10	-4,59;4,40	0,963	0,40	-2,28;3,08	0,749	NaN	NaN	NaN
Ácido linoleico (LA) (%)	-0,12	-0,93;0,69	0,757	1,74	-3,84;7,32	0,510	-0,87	-3,39;1,64	0,464	NaN	NaN	NaN
Ácido araquidónico (AA) (%)	0,02	-0,26;0,30	0,879	-0,13	-1,95;1,69	0,878	0,44	-0,40;1,29	0,276	NaN	NaN	NaN
Ácido behénico (%)	-0,02	-0,13;0,09	0,737	-0,42	-0,85;0,01	0,056	0,01	-0,34;0,35	0,975	NaN	NaN	NaN
Ácido eicosapentaenoico EPA (%)	-0,01	-0,04;0,02	0,436	-0,10	-4,59;4,40	0,963	0,01	-0,10;0,10	0,930	NaN	NaN	NaN
Ácido tricosanoico (%)	-0,01	-0,20;0,18	0,915	-0,62	-1,54;0,29	0,164	0,08	-0,53;0,69	0,777	NaN	NaN	NaN
Ácido lignocérico (%)	-0,04	-0,16;0,09	0,562	-0,32	-0,97;0,32	0,297	-0,11	-0,52;0,30	0,571	NaN	NaN	NaN
Ácido nervónico (%)	0,01	-0,22;0,24	0,958	-0,97	-2,11;0,16	0,087	-0,13	-0,85;0,60	0,711	NaN	NaN	NaN
Ácido docosahexaenoico DHA (%)	-0,42	-1,16;0,31	0,233	-0,84	-1,58;-0,09	<b>0,031<sup>^</sup></b>	-0,06	-2,54;2,42	0,957	NaN	NaN	NaN
SFA (%)	-0,01	-0,83;0,82	0,984	-0,36	-4,21;3,50	0,844	0,22	-2,39;2,82	0,860	NaN	NaN	NaN
UFA (%)	0,01	-0,82;0,83	0,984	0,36	-3,50;4,21	0,844	-0,22	-2,82;2,39	0,860	NaN	NaN	NaN
MUFA (%)	0,54	-0,73;0,31	0,400	-1,08	-5,41;3,25	0,597	0,28	-2,58;3,14	0,836	NaN	NaN	NaN
DUFA (%)	-0,12	-0,93;0,69	0,757	1,74	-3,84;7,32	0,510	-0,88	-3,39;1,64	0,464	NaN	NaN	NaN
MUFA/DUFA (%)	0,01	-0,01;0,04	0,251	-0,07	-0,24;0,10	0,400	0,01	-0,07;0,10	0,760	NaN	NaN	NaN
PUFA (%)	-0,53	-1,14;0,08	0,081	1,43	-4,73;7,59	0,621	-0,49	-2,66;1,69	0,634	NaN	NaN	NaN
MUFA/PUFA (%)	0,02	-0,01;0,04	0,131	-0,05	-0,184;0,09	0,485	0,01	-0,07;0,08	0,883	NaN	NaN	NaN
PUFA n6 (%)	-0,07	-0,79;0,65	0,837	1,61	-3,97;7,20	0,540	-0,28	-2,57;2,01	0,796	NaN	NaN	NaN
PUFA n3 (%)	-0,44	-1,17;0,30	0,218	-0,19	-1,02;0,65	0,638	-0,06	-2,53;2,41	0,960	NaN	NaN	NaN
PUFA > 18C n6 (%)	0,02	-0,26;0,30	0,879	-0,13	-1,95;1,69	0,878	0,44	-0,40;1,29	0,276	NaN	NaN	NaN
PUFA > 18C n3 (%)	-0,44	-1,17;0,30	0,218	-0,18	-1,02;0,65	0,638	-0,06	-2,53;2,41	0,960	NaN	NaN	NaN
UI	-0,02	-0,20;0,16	0,832	0,11	-0,76;-0,76	0,791	-0,01	-0,58;0,56	0,968	NaN	NaN	NaN
SFA/MUFA (%)	-0,03	-0,16;0,09	0,566	0,04	-0,31;0,40	0,801	0,07	-0,32;0,46	0,714	NaN	NaN	NaN
PUFA n6/PUFA n3 (%)	6,21	1,12;11,31	<b>0,024<sup>^</sup></b>	1,31	-8,06;10,68	0,764	3,61	3,61;33,28	0,782	NaN	NaN	NaN

El símbolo \* indica una asociación lineal significativa ( $p < 0,05$ ) entre ácidos grasos y microbiota intestinal dentro del grupo control o intervención. Las siglas NaN (not-a-number) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. El símbolo ^ indica un coeficiente de regresión cuyo intervalo de confianza no incluye 0, pero dentro de un modelo que ajustado en función de los factores de confusión no tiene significación estadística. Las siglas NaN (not-a-number) indican aquellos valores que no han podido ser calculados. Estimate: coeficientes de regresión o valor  $\beta$ , IC: intervalos de confianza, p: significación estadística, AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, DUFA: ácido graso diinsaturado, EPA: ácido eicosapentaenoico, LA: ácido linoleico, MUFA: ácido graso monoinsaturado, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n6: ácido graso poliinsaturado omega 6, PUFA n3: ácido graso poliinsaturado omega 3, SFA: ácido graso saturado, UFA: ácidos graso insaturado, UI: índice de insaturación



## 8. Discusión

### 8.1 Ácidos grasos

El consumo de carne roja se ha asociado con frecuencia al aumento de factores de riesgo cardiovascular o incluso al aumento de la incidencia de cánceres en el aparato digestivo, en comparación con la carne blanca, debido a su contenido más elevado de grasa saturada, entre otros aspectos (49–51).

Sin embargo, se ha demostrado que la carne roja producida a partir de animales alimentados con pasto (ganadería extensiva) presenta niveles más altos de CLA y PUFA omega-3 en comparación con la carne roja producida a partir de animales alimentados a base de concentrados de granos o piensos (ganadería intensiva), mientras que la carne procedente de estos últimos contiene niveles más elevados de SFA, PUFA omega-6 y AG *trans* (52).

La premisa en la que se basa la hipótesis de este estudio es que la alimentación a base de carne roja magra procedente de animales criados mediante ganadería extensiva presenta los mismos beneficios para la salud que los atribuidos a la carne blanca.

Diversos estudios han demostrado la no inferioridad del consumo de carne roja con respecto al de carne blanca en relación con la concentración de lípidos séricos y diversos factores de riesgo cardiovascular; por ejemplo, un ensayo clínico en el que se comparó el consumo de carne roja con el consumo de carne blanca y la influencia del contenido de SFA en ambas carnes, concluyó que, basándose en los efectos de ambos patrones alimentarios sobre de los lípidos y las lipoproteínas séricos, no existe evidencia suficiente para elegir la carne blanca sobre la roja con el objetivo de reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular (53). Estos datos concuerdan con los obtenidos por un meta-análisis en que se reflejó que los cambios en el perfil de lipídico no fueron significativamente diferentes entre el consumo de carne de res en comparación con el consumo de aves de corral (54).

Sin embargo, son muy pocos los estudios los que han investigado el efecto del consumo de este tipo de carnes sobre el perfil de ácidos grasos de los participantes; encontramos dos ensayos clínicos donde se analizó el perfil de ácidos grasos de los sujetos en función del consumo de carne roja magra.

En el primero, un ensayo clínico aleatorizado a doble ciego, se realizó una intervención dietética en la que durante 4 semanas el grupo control (n=20) consumió tres veces por semana carne roja de ternera alimentada con concentrados y el grupo intervención (n=18) por su parte consumió tres veces por semana carne roja procedente de ganado alimentado con pasto (al igual que en nuestro estudio). El resultado fue el aumento de los niveles de ácido esteárico, ALA, DHA, PUFA > 18C omega-3 y los PUFA omega-3 y la disminución de la relación PUFA omega-6/PUFA omega-3 en

el grupo intervención en comparación con el grupo control (55). Estos datos difieren con nuestro ensayo clínico, en el que por el contrario no se observaron variaciones significativas en las concentraciones séricas de AG del grupo intervención, que llevó una dieta a base de ternera del Pirineo procedente de ganadería extensiva. Las características de los participantes en este ensayo son similares a los de nuestro estudio, ya que se realizó en estudiantes de la universidad de Ulster, en Irlanda del Norte, con una media de edad e IMC similar al nuestros sujetos, por lo que las diferencias entre ambos estudios pueden deberse a otros factores, como la diferencia del tamaño muestral; (nuestro estudio contó con 17 participantes, este ensayo clínico casi el doble, 38). Además, el ratio de PUFA omega-6/PUFA omega-3 inicial del ensayo clínico irlandés fue mucho más bajo que el de los participantes de nuestro estudio (en el grupo control  $28,60 \pm 9,70$  vs  $8,20 \pm 0,79$  y en el grupo intervención  $28,30 \pm 8,08$  vs  $9,18 \pm 0,47$ ); en consecuencia en nuestros participantes encontramos una media de PUFA omega-6 total mayor (en el grupo control  $45,308 \pm 10,44$  vs  $34,06 \pm 1,98$  y en el grupo intervención  $46,835 \pm 4,24$  vs  $35,91 \pm 0,78$ ) y una media de PUFA omega-3 considerablemente menor (en el grupo control  $1,686 \pm 0,634$  vs  $3,93 \pm 0,31$  y en el grupo intervención  $1,323 \pm 0,904$  vs  $4,53 \pm 0,31$ ). Esta diferencia en el punto de partida en cuanto a los valores iniciales de los PUFA puede ser una de las causas que justifiquen las discrepancias entre ambos estudios en lo que respecta a las variaciones de los PUFA omega-3, los cuales podrían ser obtenidos por los participantes irlandeses a través de otros alimentos en la dieta, por lo que las diferencias entre los patrones alimentarios y los estilos de vida, tan diferentes entre diferentes países y regiones, debería ser tomada en cuenta a la hora de analizar este tipo de estudios.

Estos datos sugieren una pérdida de adherencia a la dieta mediterránea de la población universitaria española, como corrobora un estudio de la universidad de Navarra (56). En él, se estudió la adherencia a la dieta mediterránea en una muestra de 217 varones y 353 mujeres universitarios con edades entre 18 y 25 años; se concluyó que el 71,6% de los universitarios presentaba una adherencia media-baja a la dieta mediterránea. Además, aquellos participantes que vivían en una residencia universitaria presentaban porcentaje de adherencia a la dieta mediterránea significativamente menor (11,1 %) que a aquellos que vivían en la residencia familiar (35,6%), apreciándose un cierto factor protector en el hecho de seguir viviendo en el domicilio familiar y seguir las costumbres dietéticas mediterráneas “tradicionales” de los progenitores. Teniendo en cuenta que todos los participantes de nuestro estudio vivían en residencias universitarias, este factor debería tenerse en cuenta a la hora de analizar los datos basales del estudio.

El segundo ensayo clínico se realizó en un periodo de 20 semanas en niños sanos de 12 a 20 meses de edad; en el grupo intervención (grupo de carne roja) se dio a los padres diferentes tipos de platos compuestos con carne roja y se les alentó a que sus hijos consumieran 2 porciones/día

de los platos del estudio durante 20 semanas. Se consiguió una ingesta media de 19,4 g/día y los resultados fueron la ausencia de diferencias significativas en el grupo intervención en cuanto a la concentración de los lípidos séricos o al perfil de ácidos grasos (57); estos datos concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, en el que no se han observado diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos del grupo intervención. Esta similitud de datos podría deberse al período de tiempo que dura el estudio (que es similar al nuestro, 16 vs 20 semanas) y a un ratio mayor entre PUFA omega-6/PUFA omega-3, similar al de nuestro estudio.

Sin embargo, ningún estudio hasta la fecha ha comparado la diferencia de las concentraciones séricas de ácidos grasos entre los consumidores de carne roja procedente de ganadería extensiva y los consumidores de carne blanca, en este caso pollo.

En nuestro estudio, se observa en el grupo control una disminución significativa de las medias de los PUFA omega-6 totales ( $p=0,011$ ) y de algunos tipos de estos, como el AA ( $p=0,031$ ) y su precursor el LA ( $p=0,045$ ). Estos datos podrían interpretarse como positivos para la salud, ya que como se ha mencionado en la introducción, los PUFA omega-6 se asocian con procesos pro-inflamatorios que, aunque a priori son necesarios para el organismo, en exceso se asocian con diversas patologías crónicas. Además, como ya se ha reseñado, en la dieta occidental actual hay una desproporción importante del ratio PUFA omega-6/PUFA omega-3, por lo que una reducción de los niveles PUFA omega-6 podría considerarse beneficiosa para la salud.

En cuanto al grupo intervención, en los datos de nuestro estudio no se refleja una variación significativa de los niveles de los PUFA omega-6. Esta diferencia con respecto al grupo control puede deberse al tamaño muestral del estudio,  $n=17$ , que se corresponde con participantes que entregaron muestras de heces para analizar la microbiota; sin embargo, si nos fijamos en los datos basados en el tamaño muestral del estudio completo,  $n=47$ , encontramos una disminución significativa de la concentración de los PUFA omega-6 tras la intervención (0,048), de igual manera que en el grupo control (58). Es por ello que el pequeño tamaño muestral (a pesar de la calidad de las muestras de microbiota obtenidas) es un factor limitante a la hora de obtener resultados; ensayos clínicos futuros con un tamaño muestral más amplio son el siguiente paso a realizar para seguir profundizando este tema.

## 8.2 Microbiota

En el análisis de la abundancia de los diferentes filos encontramos una disminución estadísticamente significativa de la abundancia del filo Proteobacteria en el grupo intervención ( $p=0,021$ ).

Este filo está formado por anaerobios facultativos, y contiene varios géneros de microorganismos patógenos humanos conocidos, como *Brucella*, *Rickettsia*, *Neisseria*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Helicobacter* (59), y su abundancia relativa se encuentra aumentada en

diversas patologías, la mayoría relacionadas con un perfil tipo inflamatorio (60). Por ejemplo, trastornos metabólicos como obesidad (61), diabetes y enfermedad del hígado graso no alcohólica y enfermedades del aparato digestivo, como enfermedad inflamatoria intestinal (59,60). En base a esto los autores han propuesto que las Proteobacterias pueden representar una especie de "firma microbiana" relacionada con la disbiosis y la enfermedad del huésped (62).

Por otra parte, el filo Proteobacteria (junto con Firmicutes) es el responsable de la producción de TMAO en el organismo. La TMAO es un metabolito con una fuerte asociación en la literatura científica con varias enfermedades crónicas no transmisibles y patologías cardiovasculares, como resistencia a la insulina, aterosclerosis, diabetes, cáncer, insuficiencia cardíaca, hipertensión, enfermedad renal crónica, esteatosis hepática o enfermedad de Alzheimer (63).

La producción de TMAO es el resultado de la fermentación por parte de Proteobacteria y Firmicutes de las proteínas colina y carnitina, las cuales se encuentran fundamentalmente en la carne roja y otros productos de origen animal, como los huevos, la leche y el queso. Estas proteínas se transforman en el intestino en trimetilamina (TMA) gracias a las enzimas microbianas, para convertirse finalmente en TMAO en el hígado (63).

En base a esta fisiología, diversos estudios han demostrado la asociación entre el consumo de carne roja y la presencia de niveles elevados de TMAO y en consecuencia el aumento de patologías cardiovasculares y crónicas (64).

Podemos teorizar, dado que la carne roja contiene los precursores de la TMAO y estos son metabolizados por el filo Proteobacteria, que el consumo de carne roja en la dieta esté relacionado con niveles más altos de Proteobacteria; esta suposición parece ser corroborada por estudios actuales. En humanos, en un estudio observacional de 2021, se analizaron muestras de la microbiota intestinal de preadolescentes asiáticos en función de su patrón dietético, separando grupo de carne roja, grupo de carne blanca y grupo equilibrado. Se observó en el grupo de carne roja un aumento de *Escherichia* y *Shigella* (pertenecientes al filo Proteobacteria) y de otros géneros de Firmicutes (65). Por otra parte, en ensayos clínicos realizados con ratones y cerdos (66), se indica que la alimentación con carne de vacuno aumenta la abundancia relativa del filo Proteobacteria, tal y como reseña una reciente revisión sistemática (67).

Sin embargo, estas suposiciones no se corresponden con los datos obtenidos en este estudio, que muestran una disminución significativa del filo Proteobacteria en el grupo intervención, a diferencia del grupo control en que no se observan variaciones. Nuestra hipótesis es, al igual que encontramos en la carne roja magra procedente de ganadería extensiva un perfil de ácidos grasos mucho más favorable que el de la carne roja convencional, esta también contendría un perfil de proteínas mucho más favorable (presumiblemente con menor cantidad de colina y carnitina), y por ello en este estudio encontramos una disminución la abundancia relativa de Proteobacteria.

Además, el hecho de que este efecto no se halle en el grupo control puede hacer que nos aventuremos incluso a suponer que el perfil proteico de la carne roja magra es más saludable que el de la carne blanca. Esta hipótesis va en concordancia con los datos de un ensayo clínico aleatorizado controlado realizado en humanos este 2022 en EEUU, en el que se demostró que no existían diferencias significativas en cuanto a los niveles de TMAO y composición de la microbiota intestinal entre el grupo que consumió carne magra de cerdo vs el grupo que consumió carne de pollo (68) y con los datos de un ensayo clínico de 2020 realizado en cerdos, en el que no se demostró diferencia a nivel de filamentos entre aquellos que habían recibido dieta a base de carne roja o a base de carne de pollo (69).

### 8.3 Interacción entre la microbiota y ácidos grasos

Se ha demostrado que varios géneros del dominio Bacteria como las Bifidobacterias y Propionibacterias (pertenecientes al filo Actinobacteria), y *Lactobacillus* (pertenecientes al filo Firmicutes) están implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, incluyendo la transformación de LA en CLA (32).

Por otra parte, tal y como se ha mencionado previamente, el aumento del consumo de los PUFA omega-6 que abunda en la dieta occidental contribuye al aumento de diferentes patologías, y aunque las vías metabólicas de los AG relacionados con la microbiota intestinal se han ido dilucidando gracias a diversos estudios in vitro y en ratones, los efectos sobre la función fisiológica del huésped siguen sin estar claros.

El estudio de Miyamoto et al (40) demostró que la microbiota intestinal confiere al huésped resistencia a la obesidad inducida por una dieta alta en grasas al modular el metabolismo de los PUFA ingeridos en la dieta. La suplementación de 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico (HYA), un AG intermedio y metabolito microbiano intestinal derivado de la isomerización del LA, atenúa la obesidad inducida por una dieta alta en grasas en ratones sin provocar inflamación adiposa mediada por ácido araquidónico y mejorando la condición metabólica a través de receptores de AG libres. No solo esto, se demostró que los ratones colonizados por *Lactobacillus* muestran efectos similares a los ratones suplementados con HYA (no olvidemos que el género *Lactobacillus*, englobado en el filo Firmicutes, es el más característico de los relacionados con el metabolismo de los PUFA), por lo que podemos deducir que tiene los mismos beneficios suplementar el metabolito derivado del metabolismo de los PUFA que la presencia de la bacteria que se encarga de producirlo.

En nuestro estudio, tras ajustar el modelo de regresión entre AG y la microbiota intestinal según sexo, edad e IMC encontramos asociaciones lineales tanto negativas como positivas; llama especialmente la atención la asociación lineal positiva con significación estadística en el filo Firmicutes del grupo control para los PUFA totales ( $\beta=0,26$ ,  $p=0,05$ ). Es decir, que por cada

unidad en % que aumenta la abundancia relativa de Firmicutes se prevé un aumento de los PUFA totales de 0,26. Este aumento, aunque pequeño, no es desdeñable teniendo en cuenta que se refiere a los PUFA totales, incluyendo los PUFA omega-6 y omega-3 y sus derivados. Dado que ya se conoce que algunos géneros pertenecientes a Firmicutes como *Lactobacillus* participan en el proceso de desintoxicación de PUFA transformándolos en otros tipos de AG, esta asociación positiva entre Firmicutes y los PUFA totales puede interpretarse, como una participación de este filo en el proceso inverso, es decir, que el filo Firmicutes participe en la formación de diferentes tipos de PUFA usando como precursor otro tipo de AG.

Por otra parte en el modelo de regresión ajustado encontramos también asociaciones lineales negativas en el filo Actinobacteria del grupo intervención para el ácido behénico ( $\beta=-0,23$ ,  $p=0,005$ ) y en el filo *Chloroflexi* del grupo control para PUFA omega-6 ( $\beta -2,90$ ,  $p= 0,035$ ), es decir, que por cada unidad en % que aumenta la abundancia relativa de Actinobacteria y *Chloroflexi* se prevé una disminución de ácido behénico de 0.77 y de PUFA omega-6 de 2,90 respectivamente. Mientras que algunos géneros pertenecientes al filo Actinobacteria, como Bifidobacterias y Propionibacterias se encuentran implicados en el metabolismo de los AG, es la primera que se encuentra una asociación entre el filo *Chloroflexi* y la producción de AG. Poco se sabe sobre la función de *Chloroflexi*, porque generalmente este filo se encuentra en hábitats acuáticos o terrestres, aunque también se encuentra en el tracto gastrointestinal de mamíferos y humanos, especialmente en la cavidad oral, donde se asocia con el aumento de patologías como la periodontitis (70). El hecho de que el contenido de varios AG disminuya en función de un aumento de los filos, sugiere una conversión sustancial de estos ácidos grasos en metabolitos microbianos. La asociación entre los diferentes filos y géneros bacterianos y los metabolitos resultantes de la metabolización de AG es el siguiente paso a dar en los estudios sobre este campo.

Además, cabe destacar que tras el ajustar la regresión lineal entre AG y microbiota en función de sexo, edad e IMC, se pierde la asociación entre varios filos y ácidos grasos, como en el caso de los filos Firmicutes y *Chloroflexi* para MUFA y sus ratios, del filo Proteobacteria para el ácido behénico y el ratio PUFA omega-6/PUFA omega-3 y por último del filo Synergistetes para los PUFA totales. Estos datos nos indican que las características propias de los participantes también influyen en la relación entre la abundancia de los filos y las concentraciones de ácidos grasos, en concordancia con estudios previos en los que se encontraron diferencias de sexo y edad en la conversión de PUFA y la composición de SFA en suero (71). Además, diversos estudios han demostrado las diferencias de la microbiota intestinal en función del sexo, la edad y el peso; en un estudio realizado en sujetos japoneses en 2019, los géneros *Prevotella*, *Megasphaera*, *Fusobacterium* y *Megasphaera* presentaron abundancias relativas en varones más elevadas, mientras que las mujeres presentaban un aumento de *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* y

*Akkermansia* (72). En una reciente revisión sistemática de 2020, se concluyó que los individuos con obesidad presentaban un aumento de los filos Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria y del ratio Firmicutes/Bacteroidetes en comparación con individuos no obesos (73). Por último un estudio transversal realizado en 2016 en el que se analizaron muestras fecales de 367 participantes sanos de edades comprendidas entre los 0 y los 104 años, observó cambios de los patrones y composición de la microbiota intestinal con la edad (74). Estos hallazgos nos confirman que el sexo, la edad y el peso deben considerarse como posibles factores de confusión a la hora de analizar el perfil de ácidos grasos sérico y la composición de la microbiota intestinal.

Todo ello ilustra la interacción entre la microbiota intestinal y el metabolismo de las grasas del huésped a través de los AG. Una mejor comprensión de estas interacciones y de su impacto en la homeostasis intestinal y metabólica será fundamental para diseñar estrategias nuevas y más eficientes de prevención y terapia de enfermedades y nutrición personalizada.

#### **8.4 Fortalezas y debilidades del estudio**

En cuanto a las principales fortalezas de este estudio, destaca el diseño del mismo (clínico randomizado cruzado y aleatorizado), que implica una baja variabilidad entre los sujetos, ya que cada sujeto actúa como su propio control y la precisión de las observaciones es elevada. Es importante resaltar que debido a los criterios de selección utilizados es posible extrapolar los resultados a la población general, dado que no padecen ninguna enfermedad.

Además, nos encontramos ante un tema actual sobre el que las últimas investigaciones están ocurriendo en los últimos años. Este es uno de los pocos estudios en evaluar el efecto en sujetos adultos de una dieta en carne de pollo en contraposición de una dieta rica en carne de ternera procedente de ganadería extensiva sobre el perfil de ácidos grasos, la variabilidad de la microbiota intestinal y la relación entre estos dos aspectos. No solo esto, nos encontramos ante el primer estudio que, basándose en los estudios in vitro y animales sobre el metabolismo de ácidos grasos y la microbiota, plantea una hipótesis en la que la composición de la microbiota intestinal influye en las concentraciones de ácidos grasos, y no al revés. A todo esto hay que añadirle que además se analizó esta relación teniendo en cuenta los factores de confusión sexo, edad e IMC, lo que aporta aún más fiabilidad a los datos obtenidos por este estudio.

Por otro lado, es necesario tener presente la existencia de algunas limitaciones. El tamaño muestral (n=17) resulta pequeño y obliga a realizar pruebas estadísticas no paramétricas. Por ello, el siguiente paso en este aspecto sería ampliar la cantidad de participantes. Además, encontramos diferencias significativas en cuanto al sexo de los participantes 11 varones y 6 mujeres, por lo que en este aspecto la muestra no resulta homogénea, pudiendo existir un sesgo de género. Además, para este trabajo no se ha incluido el efecto del orden en el que se realizó el

proyecto (efecto periodo), el efecto residual y la interacción de la intervención. Estos serán los próximos pasos a realizar.

## **9. Conclusiones**

Se concluye que tras los resultados encontrados no se observa inferioridad de la dieta rica en carne roja magra en comparación con carne de pollo, en cuanto a distintos indicadores de salud como son el perfil de ácidos grasos séricos y la abundancia de los filos de la microbiota intestinal. Se ha observado una disminución del filo Proteobacteria, considerado potencialmente patógeno, en el grupo consumidor de carne roja. Por último, encontramos asociaciones entre la variabilidad de los niveles de ácidos grasos y la abundancia de los filos Firmicutes, Actinobacteria y *Chloroflexi*.

Es por ello que este estudio apoya la hipótesis de que el consumo de carne de ternera magra procedente de ganadería extensiva no modifica los factores de riesgo cardiovascular, y su inclusión en la dieta aumenta la variedad de opciones de alimentos disponibles, lo que favorece una planificación dietética variada y equilibrada.



## **10. Bibliografía**

1. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL, Clinic C, Clinic C, Clinic C. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*. 2018;120(7):1183–96.
2. Wang X, Zhang A, Miao J, Sun H, Yan G, Wu F, et al. Gut microbiota as important modulator of metabolism in health and disease. *RSC Adv*. 2018;8:42380–9.
3. Qin J, Li R, Raes J, Consortium M. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59–65.
4. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Pipaon MS De. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterol Hepatol*. 2021;44:519–35.
5. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Abele G, Miggianno D, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7(14).
6. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787–803.
7. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier D Le, Yamada T, Mende DR, et al. MetaHIT Consortium: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473:174–80.
8. Robles-alonso V, Guarner F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr Hosp*. 2013;28(3):553–7.
9. Bander Z Al, Nitert MD, Mousa A. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *Int J Environ Res Public Heal*. 2020;17:1–21.
10. Stacchiotti V, Rezzi S, Eggersdorfer M, Galli F, Stacchiotti V, Rezzi S, et al. Metabolic and functional interplay between gut microbiota and fat-soluble vitamins. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2020;0(0):1–22. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793728>
11. Ratajczak W, Rył A, Mizerski A, Walczakiewicz K, Sipak O, Laszczyńska M. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *ABP*. 2019;66(1).
12. Kim Y, Shin C. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatric Disorders: Pathophysiological Mechanisms and Novel Treatments. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16:559–73.
13. Krishnan S, Alden N, Lee K. Pathways and Functions of Gut Microbiota Metabolism Impacting Host Physiology. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;36:137–45.
14. Dabke K, Hendrick G, Devkota S. The gut microbiome and metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2019;129(10):4050–7.

15. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* 2018;57(1):1–24.
16. Yamashiro Y. Gut Microbiota in Health and Disease. *Ann Nutr Metab.* 2017;71:242–6.
17. Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL, Sciences M, Health H, Clinic C, et al. Gut Microbiota and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2021;127(4):553–70.
18. Wilson AS, Koller KR, Ramaboli MC, Nesengani LT, Ocvirk S, Chen C, et al. Diet and the Human Gut Microbiome: An International Review. *Dig Dis Sci.* 2021;65(3):723–40.
19. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* [Internet]. 2016;7(3):189–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
20. Vos W, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut.* 2022;71:1020–32.
21. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Endocr Metab Disord.* 2019;(20):461–72.
22. Huyan Z, Pellegrini N, Steegenga W, Capuano E. Insights into gut microbiota metabolism of dietary lipids: the case of linoleic acid. *Food Funct.* 2022;13:4513–26.
23. Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM LJ. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at-risk” population. *J Obes.* 2013;37:216–23.
24. Urwin HJ, Miles EA, Noakes PS, Kremmyda LS, Vlachava M DN, Al E. Effect of salmon consumption during pregnancy on maternal and infant faecal microbiota, secretory IgA and calprotectin. *Br J Nutr.* 2014;111:773–84.
25. Lecomte V, Kaakoush N, Maloney C, Raipuria M, Huinao K, Mitchell H, et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One.* 2015;10:e0126931.
26. Machate DJ, Silva Figueiredo P, Marcelino G, Avellaneda Guimarães R de C, Hiane PA, Bogo D, et al. Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis.
27. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med.* 2017;15(73):1–17.
28. Saini RK, Keum Y. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci.* 2018;203:255–67.

29. Ballesteros-Vásquez MN, Valenzuela-Calvillo LS, Artalejo-Ochoa E, Robles-Sardin AE. Ácidos grasos trans: un análisis del efecto de su consumo en la salud humana, regulación del contenido en alimentos y alternativas para disminuirlos ON HUMAN HEALTH AND REGULATION. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):54–64.
30. Saika A, Nagatake T, Kunisawa J. Host- and Microbe-Dependent Dietary Lipid Metabolism in the Control of Allergy , Inflammation , and Immunity. *Front Nutr.* 2019;6(36):1–9.
31. Candela CG, López LMB, Kohen VL. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutr Hosp.* 2011;26(2):323–9.
32. Gorissen L, Leroy F, De Vuyst L, De Smet S, Raes K. Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55(11):1561–74.
33. Kishino S, Takeuchi M, Park S, Hirata A, Kitamura N, Kunisawa J. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *PNAS.* 2013;110(44):17808–13.
34. Bergamo P, Luongo D, Miyamoto J, Cocca E. Immunomodulatory activity of a gut microbial metabolite of dietary linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, associated with improved antioxidant/detoxifying defences. *J Funct Foods [Internet].* 2014;11:192–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.007>
35. Sofyana NT, Zheng J, Manabe Y, Yamamoto Y, Kishino S, Ogawa J, et al. Gut microbial fatty acid metabolites (KetoA and KetoC) affect the progression of nonalcoholic steatohepatitis and reverse cholesterol transport metabolism in mouse model. *Lipids.* 2020;55(2):151–62.
36. Takahashi H, Hara H, Goto T, Kamakari K. 13-Oxo-9(E),11(Z),15(Z)-octadecatrienoic Acid Activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  in Adipocytes. 2015;50(1):3–12.
37. Goto T, Kim Y, Furuzono T, Takahashi N, Yamakuni K, Yang H, et al. 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPAR $\gamma$  and stimulates adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2015;459(4):597–603. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.154>
38. Nanthirudjanar T, Furumoto H, Zheng J, Kim Y. Gut Microbial Fatty Acid Metabolites Reduce Triacylglycerol Levels in Hepatocytes. *Lipids.* 2015;50(11):1093–102.
39. Takahashi H, Kamakari K, Goto T, Hara H, Mohri S, Suzuki H, et al. 9-Oxo-10(E),12(Z),15(Z)- Octadecatrienoic Acid Activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  in Hepatocytes. *Lipids.* 2015;50(11):1083–91.

40. Miyamoto J, Igarashi M, Watanabe K, Karaki S, Mukoyama H, Kishino S, et al. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):4007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11978-0>
41. Corado A, Hoffmann C. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. 2018;9(4):308–25.
42. De La Fuente-Arrillaga C, Vazquez Ruiz Z, Bes-Rastrollo M, Sampson L, Martinez-González M. Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Heal Nutr Cambridge Univ Press*. 2010;1364–1372.
43. Bolyen E, Rideout J, Dillon M, Bokulich N, Abnet C, Al-Ghalith G, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852–7.
44. Callahan B, McMurdie P, Rosen M, Han A, Johnson A, Holmes S. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581–3.
45. Katoh K, Standley D. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772–80.
46. Price M, Dehal P, Arkin A. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010;5(3):e9490.
47. Bokulich N, Kaehler B, Rideout J, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018;6(1).
48. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1).
49. Zaragoza-mart A, Garc EC. Influencia de la ingesta de alimentos o grupos de alimentos en la aparición y/o protección de los diversos tipos de cáncer: revisión sistemática. *Nutr Hosp*. 2020;37(1):169–92.
50. Lupoli R, Vitale M, Calabrese I, Giosu A, Riccardi G, Vaccaro O. White Meat Consumption, All-Cause Mortality, and Cardiovascular Events: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Nutrients*. 2021;13(2):676.

51. Abete I, Romaguera D, Vieira AR, Munain AL De, Norat T. Association between total , processed, red and white meat consumption and all-cause , CVD and IHD mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Nutr.* 2014;112(5):762–75.
52. Ponnampalam EN, Mann NJ, Sinclair AJ. Effect of feeding systems on omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acid and trans fatty acids in Australian beef cuts: potential impact on human health. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2006;15(1):21–9.
53. Bergeron N, Chiu S, Williams PT, King SM, Krauss RM. Effects of red meat, white meat, and nonmeat protein sources on atherogenic lipoprotein measures in the context of low compared with high saturated fat intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2019;110(1):24–33.
54. Maki KC, Elswyk ME Van, Alexander DD, Rains TM, Sohn EL, McNeill S. A meta-analysis of randomized controlled trials that compare the lipid effects of beef versus poultry and/or fish consumption. *J Clin Lipidol* [Internet]. 2012;6(4):352–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacl.2012.01.001>
55. McAfee AJ, Mccorley EM, Cuskelly GJ, Fearon AM, Moss BW, Beattie JAM. Red meat from animals offered a grass diet increases plasma and platelet n-3 PUFA in healthy consumers. *Br J Nutr.* 2011;105(1):80–9.
56. Travé Durá T, Castroviejo Gandarias A. Adherencia a la dieta mediterránea en la población universitaria. *Nutr Hosp.* 2011;26(3):602–8.
57. Szymlek-gay EA, Gray AR, Heath AM, Ferguson EL, Skeaff CM. Red Meat Consumption and Serum Lipids and Fatty Acids. *JPGN.* 2018;67(3):395–400.
58. Santaliestra-Pasías A, Miguel-Berges M, Campo M, Guerrero A, Olleta J, Santolaria P, et al. Effect of the intake of lean red-meat from beef- (Pirenaica breed) versus lean white-meat on body composition, fatty acids profile and cardiovascular risk indicators: a randomised cross-over study in healthy young adults. *Nutrients.*
59. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9351507.
60. Webb CR, Koboziev I, Furr KL, Grisham MB. Protective and Pro-Inflammatory Roles of Intestinal Bacteria Cynthia. *Pathophysiology.* 2017;23(2):67–80.
61. Berry D, Palacios-gonzalez B. Altered Gut Microbiota and Compositional Changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican Undernourished and Obese. *Front Microbiol.* 2018;9(2494):1–11.

62. Shin N, Whon TW, Bae J. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2015;33(9):496–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
63. Salve K, Wolino C, Cardozo LFMD, Oliveira V De, Denise L. Can diet modulate trimethylamine N-oxide (TMAO) production? What do we know so far? *Eur J Nutr* [Internet]. 2021;60(7):3567–84. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02491-6>
64. Mei Z, Chen G, Wang Z, Usyk M, Yu B, Baeza YV, et al. Dietary factors , gut microbiota, and serum trimethylamine-N-oxide associated with cardiovascular disease in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Am J Clin Nutr*. 2021;113:1503–14.
65. Lin Q, Lun J, Zhang J, He X, Gong Z, Gao X, et al. Gut microbiome composition in pre-adolescent children with different meat consumption patterns. *J South Med Univ*. 2021;41(12):1801–8.
66. Schutkowski A, König B, Kluge H, Hirche F, Henze A, Schwerdtle T, et al. Metabolic footprint and intestinal microbial changes in response to dietary proteins in a pig model. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2019;67:149–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.02.004>
67. Albracht-schulte K, Islam T, Johnson P, Moustaid-moussa N. Systematic Review of Beef Protein Effects on Gut Microbiota: Implications for Health. *AdvNutr*. 2021;12(1):102–14.
68. Dhakal S, Moazzami Z, Perry C, Dey M. Effects of Lean Pork on Microbiota and Microbial-Metabolite Trimethylamine- N -Oxide: A Randomized Controlled Non-Inferiority Feeding Trial Based on the Dietary Guidelines for Americans. *Mol Nutr Food Res*. 2022;66(2101136):1–12.
69. Vossen E, Goethals S, Vrieze J De, Boon N, Hecke T Van, Smet S De. Red and processed meat consumption within two different dietary patterns: Effect on the colon microbial community and volatile metabolites in pigs. *Food Res Int* [Internet]. 2020;129:108793. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108793>
70. Campbell AG, Schwientek P, Vishnivetskaya T, Woyke T, Levy S, Beall CJ, et al. Diversity and genomic insights into the uncultured Chloroflexi from the human microbiota Alisha. *Env Microbiol*. 2014;16(9):2635–43.
71. Zhao L, Hao F, Huang J, Liu X, Ma X, Wang C, et al. Sex- and Age-Related Metabolic Characteristics of Serum Free Fatty Acids in Healthy Chinese Adults. *J Proteome Res*. 2020;19(4):1383–91.

72. Takagi T, Naito Y, Inoue R, Kashiwagi S. Differences in gut microbiota associated with age, sex, and stool consistency in healthy Japanese subjects. *J Gastroenterol* [Internet]. 2019;54(1):53–63. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1488-5>
73. Crovesy L, Masterson D, Lopes E. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2020;74(9):1251–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6>
74. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao J, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(90):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>