



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización de la microbiota intestinal asociada con dislipidemia y su relación con cambios en parámetros lipídicos después de cirugía bariátrica”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LBD Priscilla Elizabeth López Montoya

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Samuel Canizales Quinteros  
Facultad de Química, UNAM-INMEGEN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”  
Dr. Osbaldo Resendis Antonio  
INMEGEN

Ciudad de México. Diciembre, 2022.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**López Montoya Priscilla Elizabeth**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 18 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Caracterización de la microbiota intestinal asociada con dislipidemia y su relación con cambios en parámetros lipídicos después de cirugía bariátrica.**", dirigida por el Dr. **Canizales Quinteros Samuel**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Elena Zambrano González (INCMSZ)
VOCAL	José Pedraza Chaverri (FQ)
VOCAL	Ruth Gutiérrez Aguilar (FM)
VOCAL	Adrián Ochoa Leyva (IBT)
SECRETARIO	Patricia Ileana Canto Cetina (FM)

#### **A LOS MIEMBROS DEL JURADO:**

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **20(Maestría)/30(Doctorado)** días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de abril de 2022**  
**COORDINADORA**



**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

El presente trabajo fue realizado en la **Unidad Periférica de Genómica de Poblaciones Aplicada a Salud** de la **Facultad de Química** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, con sede en el **Instituto Nacional de Medicina Genómica**, con el financiamiento otorgado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, mediante el **Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT (FOSISS)** No. 289699.

## DEDICATORIA

A todos los que se fueron. A todos los que llegaron. Pero, sobre todo, a quienes  
se quedaron.

A ti, Don Güero.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca número 736470, en el periodo comprendido del 1 de marzo de 2019 al 28 de febrero de 2021.

A mi tutor, Dr. Samuel Canizales Quinteros, por la oportunidad de incorporarme a su laboratorio y participar en los proyectos de investigación. Gracias por su constante apoyo, guía, confianza y, sobre todo, paciencia.

Al Dr., Hugo Villamil Ramírez y a la M. en C. Blanca Estela López Contreras, por su ayuda y asesoría técnica durante toda mi estancia en el laboratorio. Gracias por todo el apoyo incondicional que me han brindado, así como su mentoría y consejos cuando más los he necesitado.

A los miembros de mi Comité Tutoral, Dr. Óscar Armando Pérez Méndez y Dr. Osbaldo Resendis Antonio, por su guía y contribución en mi formación.

A los integrantes de mi Jurado, Dra. Elena Zambrano González, Dr. José Pedraza Chaverri, Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar, Dr. Adrián Ochoa Leyva y Dra. Ileana Patricia Canto Cetina, por su apoyo en la revisión crítica de esta tesis.

A Marisol, por haberme brindado su amistad y apoyo, dentro y fuera del laboratorio desde el primer día. Gracias por escucharme, aconsejarme, enseñarme y por tanto que hemos vivido juntas. A mis compañeros de laboratorio, por todos los momentos compartidos y su contribución en el desarrollo de mis proyectos.

A Brisna, Danne, Jackie y Victor, por todos los años de amistad en los cuales han sido un pilar para mí; gracias por siempre estar. A Emmanuel, que ha sido un gran apoyo en la realización de esta tesis, pero, sobre todo, por su amistad incondicional. A Carlos, por su amor, comprensión, apoyo y sabiduría.

A mi familia, por su paciencia y apoyo incondicional en cada uno de mis proyectos.

A la UNAM, a todos mis profesores y a todas las personas que de alguna forma han contribuido durante toda mi formación académica.

## ÍNDICE GENERAL.

ABREVIATURAS.

ÍNDICE DE FIGURAS.

ÍNDICE DE TABLAS.

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. Prevalencia de dislipidemia aterogénica.....	3
2.2. Metabolismo de triacilglicéridos y C-HDL.....	3
2.2.1. Vía exógena para la obtención de triacilglicéridos.....	4
2.2.2. Vía endógena para la síntesis de triacilglicéridos y lipoproteínas de alta densidad.....	6
2.3. Factores que modulan las concentraciones circulantes de triacilglicéridos y C-HDL.....	10
2.4. Influencia de la dieta en el metabolismo de triacilglicéridos y C-HDL.....	10
2.5. Participación de la microbiota en la regulación del metabolismo de triacilglicéridos y C-HDL.....	12
2.5.1. Regulación del metabolismo de ácidos grasos mediada por ácidos grasos de cadena corta.....	13
2.5.2. Regulación de la lipogénesis a través de la generación de intermediarios bacterianos obtenidos de los ácidos grasos poliinsaturados.....	15
2.6. Influencia de la dieta en la microbiota intestinal.....	16
2.7. Efecto de la cirugía bariátrica sobre las concentraciones de lípidos circulantes y su relación con la microbiota intestinal.....	18
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	23



5. Objetivos.....	23
5.1. Objetivo general .....	23
5.2. Objetivos particulares .....	23
6. Metodología.....	25
6.1. Grupos de estudio .....	25
6.2. Evaluación antropométrica .....	26
6.3. Evaluación bioquímica.....	26
6.4. Evaluación de la ingesta dietaria .....	27
6.5. Análisis de microbiota intestinal.....	27
6.6. Extracción de DNA de muestras fecales.....	28
6.7. Preparación de librerías.....	28
6.8. Procesamiento de las secuencias de amplicones del gen 16S rRNA .....	30
6.9. Evaluación de la diversidad y composición de la microbiota intestinal .....	32
6.10. Predicción de la funcionalidad microbiana .....	34
6.11. Análisis estadísticos .....	35
7. Resultados.....	36
7.1. Características de grupos de estudio.....	36
7.2. Patrones dietarios en los sujetos con dislipidemia aterogénica y controles.....	37
7.3. Diversidad de la microbiota intestinal en los grupos de estudio .....	40
7.4. Composición taxonómica de los grupos de estudio .....	42
7.5. Correlación de los géneros diferenciados entre casos y controles, con parámetros lipídicos y el cociente de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados/saturados.....	45

7.6. Diferencias en el perfil funcional de la microbiota intestinal entre sujetos con dislipidemia aterogénica y controles.....	47
7.7. Microbiota intestinal asociada con las concentraciones de C-HDL y triacilglicéridos antes y después de cirugía por bypass gástrico en Y de Roux.....	50
7.8. Variación de la microbiota intestinal asociada con la remisión de la dislipidemia aterogénica después de cirugía por bypass gástrico en Y de Roux..	54
8. Discusión .....	58
9. Conclusiones .....	69
10. Perspectivas .....	70
11. Referencias .....	71
12. Anexos .....	99
Anexo A. Extracción de DNA de muestras fecales “DNA Stool Mini Kit (Qiagen)” .....	99
Anexo B. Extracción de DNA de muestras fecales “Power Fecal Kit (Qiagen)” .....	100
Anexo C. Primera amplificación de la región V4 del gen 16S rRNA .....	102
Anexo D. Purificación de amplificadores.....	103
Anexo E. Segunda amplificación de la región V4 del gen 16S rRNA.....	104
Figuras suplementarias .....	105
Tablas suplementarias .....	113
PUBLICACIONES.....	124

## **ABREVIATURAS.**

<b>ACC1</b>	Acetil-Coenzima A carboxilasa 1
<b>ACOX1</b>	Acil-Coenzima A oxidasa 1
<b>AMPK</b>	Proteína cinasa activada por adenosín monofosfato
<b>ASV</b>	Variante de secuencia de amplicón
<b>CETP</b>	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
<b>C-HDL</b>	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
<b>ChREBP</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
<b>CLA</b>	Conjugados de ácido linoleico
<b>CO2</b>	Dióxido de carbono
<b>COPII</b>	Proteínas de recubrimiento II
<b>CPT-I</b>	Carnitinpalmítoil transferasa 1
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>DA</b>	Dislipidemia aterogénica
<b>DGAT</b>	Diacilglicerol aciltransferasa
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2
<b>ELOVL6</b>	Elongasa de ácidos grasos 6
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>FA</b>	Ácidos grasos
<b>FASN</b>	Sintasa de ácidos grasos
<b>FATP</b>	Proteína transportadora de ácidos grasos
<b>Ffar2</b>	Receptor de ácidos grasos libres
<b>FXR</b>	Receptor X farnesoide

<b>g/día</b>	Gramos / día
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>IDL</b>	Lipoproteínas de densidad intermedia
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>kg/m<sup>2</sup></b>	Kilogramo / Metro cuadrado
<b>LA</b>	Ácido linoleico
<b>LCAT</b>	Lecitín colesterol aciltransferasa
<b>LDA</b>	Puntaje de análisis discriminante lineal
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>LRT</b>	Lipoproteínas ricas en triacilglicéridos
<b>LXR</b>	Receptor X hepático
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mg/dL</b>	Miligramo / decilitro
<b>MGAT</b>	Monoglicerol aciltransferasa
<b>mL</b>	Mililitro
<b>μL</b>	Microlitro
<b>MTP</b>	Proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos
<b>MUFA</b>	Ácido graso monoinsaturado
<b>ng/μL</b>	Nanogramo / microlitro
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OTU</b>	Unidad operacional taxonómica

<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCTV</b>	Vesícula transportadora de pre-quilomicrones
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas
<b>PPAR</b>	Receptor activado por proliferados peroxisomales
<b>PUFA</b>	Ácido graso poliinsaturado
<b>QM</b>	Quilomicrones
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>RYGB</b>	Bypass gástrico en Y de Roux
<b>SCD1</b>	Esteroil-coenzima A desaturasa 1
<b>SCFA</b>	Ácido graso de cadena corta
<b>SFA</b>	Ácido graso saturado
<b>SNUT</b>	Sistema de Evaluación de Hábitos Nutricionales y Consumo de Nutrimientos
<b>SREBP-1</b>	Proteína de unión al elemento regulador del esteroil
<b>TG</b>	Triacilglicéridos
<b>UCP-1</b>	Proteína no acoplada 1
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Vía exógena para la obtención de triacilglicéridos .....	6
<b>Figura 2.</b> Vía endógena para la síntesis de triacilglicéridos y lipoproteínas de alta densidad.....	9
<b>Figura 3.</b> Esquema de la anatomía post-operatoria después del bypass gástrico en Y de Roux.....	19
<b>Figura 4.</b> Cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados de sujetos con dislipidemia y controles. ....	39
<b>Figura 5.</b> Correlación de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados/saturados y parámetros lipídicos .....	39
<b>Figura 6.</b> Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.....	41
<b>Figura 7.</b> Diversidad beta de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.....	42
<b>Figura 8.</b> Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.....	44
<b>Figura 9.</b> Abundancia relativa de géneros diferenciados (LDA >3.5, $p < 0.05$ ) entre grupos dislipidemia y control .....	45
<b>Figura 10.</b> Mapa de calor de las correlaciones de la abundancia relativa de géneros identificados en el análisis LEfSe con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos, cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados e índice de masa corporal.....	47

<b>Figura 11.</b> Enriquecimiento de vías metabólicas inferidas para los sujetos con dislipidemia y controles .....	49
<b>Figura 12.</b> Correlación de la abundancia de <i>Escherichia-Shigella</i> y las vías enriquecidas de biosíntesis de Kdo2-Lípido A y Lipopolisacáridos .....	50
<b>Figura 13.</b> Mapa de calor de las correlaciones de la abundancia relativa de géneros identificados con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos, antes y después de la cirugía por bypass gástrico en Y de Roux .....	52
<b>Figura 14.</b> Abundancia relativa de <i>Fusobacterium</i> , <i>[Eubacterium] eligens group</i> y <i>[Eubacterium] xylanophilum group</i> en sujetos con dislipidemia antes y después de cirugía bariátrica.....	53
<b>Figura 15.</b> Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos sometidos a bypass gástrico en Y de Roux.....	54
<b>Figura 16.</b> Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de pacientes sometidos a bypass gástrico en Y de Roux.....	55
<b>Figura 17.</b> Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia sometidos a cirugía por bypass gástrico en Y de Roux .....	56
<b>Figura 18.</b> Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos sin dislipidemia sometidos a cirugía por bypass gástrico en Y de Roux.....	57
<b>Figura 19.</b> Resumen de los principales hallazgos en la caracterización de la microbiota intestinal asociada con la dislipidemia aterogénica.....	67

<b>Figura suplementaria S1.</b> Imagen de electroforesis en gel de agarosa donde se muestra la integridad de los amplicones (~450pb) de muestras de DNA bacteriano extraído de materia fecal.....	105
<b>Figura suplementaria S2.</b> Fragmento de la secuencia del gen 16s rRNA donde se muestra como ejemplo los segmentos amplificados de las regiones hipervariables V4 y V3-V4.....	105
<b>Figura suplementaria S3.</b> Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles, respecto al estuche de extracción empleado.....	106
<b>Figura suplementaria S4.</b> Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles, respecto a la región secuenciada .....	107
<b>Figura suplementaria S5.</b> Correlación de los parámetros de la diversidad alfa con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos.....	108
<b>Figura suplementaria S6.</b> Abundancia relativa (%) a nivel de filo de los sujetos con dislipidemia y controles.....	109
<b>Figura suplementaria S7.</b> Abundancia relativa (%) a nivel de clase de los sujetos con dislipidemia y controles.....	109
<b>Figura suplementaria S8.</b> Abundancia relativa (%) a nivel de género de los sujetos con dislipidemia y controles .....	110
<b>Figura suplementaria S9.</b> Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.....	111
<b>Figura suplementaria S10.</b> Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.....	111



**Figura suplementaria S11.** Abundancia relativa de géneros diferenciados (LDA >3,  $p < 0.05$ ) entre pacientes con y sin dislipidemia, previo al bypass gástrico en Y de Roux..... 112

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos con dislipidemia aterogénica y controles.....	36
<b>Tabla 2.</b> Ingesta diaria de nutrientes de los grupos de estudio.....	38
<b>Tabla 3.</b> Características de los sujetos antes y después de cirugía bariátrica por bypass gástrico en Y de Roux.....	51
<b>Tabla 4.</b> Características de los sujetos con dislipidemia antes y después de cirugía por bypass gástrico en Y de Roux.....	53
<b>Tabla A1.</b> Mezcla de reacción para primera PCR.....	102
<b>Tabla A2.</b> Condiciones de termociclado para primera PCR .....	102
<b>Tabla A3.</b> Mezcla de reacción para segunda PCR.....	104
<b>Tabla A4.</b> Condiciones de termociclado para segunda PCR.....	104
<b>Tabla suplementaria S1.</b> Primers usados en la primera PCR (región V4) ...	113
<b>Tabla suplementaria S2.</b> Primers usados en la segunda PCR (región V4)...	115
<b>Tabla suplementaria S3.</b> Primers usados para la amplificación de las regiones V3-V4 .....	115
<b>Tabla suplementaria S4.</b> Correlación de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos saturados y parámetros lipídicos.....	117
<b>Tabla suplementaria S5.</b> Valores descriptivos de la diversidad alfa de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio, respecto al estuche de extracción de DNA empleado .....	116

<b>Tabla suplementaria S6.</b> Valores descriptivos de la diversidad alfa de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio, respecto a la región secuenciada .....	116
<b>Tabla suplementaria S7.</b> Valores descriptivos de la diversidad alfa de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio.....	118
<b>Tabla suplementaria S8.</b> Valores descriptivos de la diversidad beta de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles, respecto a la influencia de covariables .....	117
<b>Tabla suplementaria S9.</b> Resultados del análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia aterogénica (DA) y control.....	119
<b>Tabla suplementaria S10.</b> Asociación de la abundancia relativa de género identificados en el análisis LEfSe con la dislipidemia aterogénica, ajustada por edad, sexo, índice de masa corporal, estuche de extracción y región secuenciada .....	122
<b>Tabla suplementaria S11.</b> Correlaciones de la abundancia relativa de géneros identificados en el análisis LEfSe con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos, cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados e índice de masa corporal .....	123

## 1. Resumen.

Diversos estudios sugieren que la microbiota intestinal puede modular las concentraciones de lípidos circulantes. Sin embargo, la relación entre la composición de la microbiota intestinal y la presencia de dislipidemia aterogénica ha sido poco estudiada. Asimismo, debido a que la obesidad es una de las principales causas de la dislipidemia aterogénica secundaria, resulta importante analizar el efecto de la composición de la microbiota intestinal en los perfiles lipídicos después de una intervención para pérdida de peso. En este estudio se comparó la diversidad microbiana y la composición taxonómica de pacientes con dislipidemia aterogénica, definida por concentraciones elevadas de triacilglicéridos (TG) y disminuidas de C-HDL (n=41) y controles sin dislipidemia (n=38). Además, los géneros bacterianos asociados con la dislipidemia aterogénica fueron evaluados en 20 pacientes con obesidad antes y después de realizada una cirugía bariátrica por bypass gástrico en Y de Roux (RYGB). La composición de la microbiota fue caracterizada usando secuenciación masiva del gen 16s rRNA. Nuestros resultados mostraron que la diversidad de la microbiota intestinal fue significativamente menor en los sujetos con dislipidemia aterogénica. Además, la abundancia relativa de los géneros *Megasphaera* y *Escherichia-Shigella* fue significativamente mayor en los sujetos con dislipidemia aterogénica. Particularmente *Escherichia-Shigella* es un productor de lipopolisacáridos (LPS), una endotoxina bacteriana relacionada con procesos inflamatorios. Por otra parte, la abundancia de 4 géneros productores de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (*Christensenellaceae R-7 group*, *Ruminococcaceae UCG-014*, *Akkermansia* y [*Eubacterium*] *eligens group*) fue

significativamente mayor en los controles. Notablemente, en los pacientes sometidos a RYGB la abundancia de *[Eubacterium] eligens group* también se asoció significativamente con concentraciones elevadas de TG un año después de realizada la cirugía. De manera interesante, la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y el cociente de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados (PUFA/SFA) fueron significativamente mayores en los controles que en los sujetos con dislipidemia aterogénica. Sin embargo, de los cuatro géneros bacterianos incrementados en los controles sin dislipidemia, solo *Akkermansia* presentó una correlación positiva y significativa con el cociente PUFA/SFA. Estos resultados sugieren que las bacterias productoras de SCFA se asocian con un perfil saludable de lípidos, mientras que la presencia de bacterias productoras de LPS, tales como *Escherichia-Shigella*, podrían contribuir al desarrollo de la dislipidemia aterogénica.

## **2. Introducción**

### **2.1. Prevalencia de dislipidemia aterogénica**

Las dislipidemias comprenden un grupo de desórdenes caracterizados por concentraciones anormales de lípidos y/o lipoproteínas en circulación. Con base en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del año 2021, las dislipidemias de mayor prevalencia en la población mexicana adulta son: la hipertrigliceridemia, definida como triacilglicéridos (TG) >150 mg/dL, presente en 47.2% y la hipoalfalipoproteinemia, definida por concentraciones de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) <40 mg/dL, presente en 30.8% de la población (ENSANUT, 2021). Estas alteraciones pueden estar presentes de manera conjunta y existen estudios de que más de la tercera parte de la población (34.5%) padece la combinación de ambos desórdenes lipídicos (Hernández-Alcaraz & et al., 2020).

La presentación conjunta de concentraciones disminuidas de C-HDL y elevadas de TG se considera como dislipidemia aterogénica (Hoshino & et al., 2022), siendo reconocida como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Mach & et al., 2020; Meaney & et al., 2013).

### **2.2. Metabolismo de triacilglicéridos y C-HDL**

Los TG son lípidos formados por tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol, los cuales funcionan principalmente como almacén de energía. Su origen

puede ser exógeno cuando su incorporación es a partir de la dieta, o endógeno cuando son sintetizados en el hígado a partir de ácidos grasos. Por otra parte, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son ensambladas extracelularmente a partir de componentes lipídicos y proteicos y participan en el transporte del colesterol de los tejidos periféricos al hígado (Brunham et al., 2015).

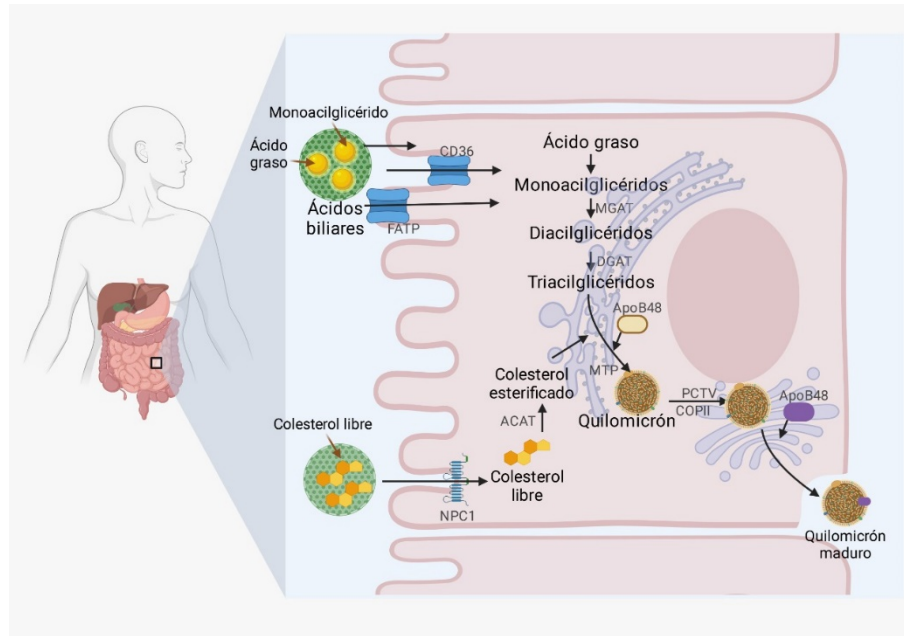
### **2.2.1. Vía exógena para la obtención de triacilglicéridos**

Los lípidos dietarios, en su mayoría TG, son emulsionados y comienzan a ser digeridos en el estómago por la acción de las lipasas lingual y gástrica, aunque su principal degradación ocurre en el intestino delgado, por la lipasa pancreática, generando monoacilglicéridos y ácidos grasos (FA) (Pan & Hussain, 2012). Posteriormente, los monoacilglicéridos, FA y otras moléculas derivadas de la digestión lipídica son solubilizados por los ácidos biliares y transportados a través de las células intestinales, mediante difusión pasiva o transportadores proteicos como el receptor CD36 y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) (Glatz et al., 2010).

Una vez internalizados en las células del epitelio intestinal, los monoacilglicéridos y FA son reconvertidos a TG en el retículo endoplásmico por acción de las enzimas mono y diacilglicerol aciltransferasas (MGAT y DGAT, respectivamente) (Shi & Cheng, 2009). Los TG recién sintetizados son almacenados como gotas lipídicas o alternativamente, incorporados a quilomicrones (QM) (Mansbach & Siddiqi, 2010).

La formación de QM inicia cuando los TG sintetizados y otros tipos de lípidos se unen a la apolipoproteína B48, por acción de la proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos (MTP), formando así los QM inmaduros (Hussain et al., 2003). Estos QM son transportados al Aparato de Golgi en un complejo formado por la vesícula transportadora de pre-quilomicrones (PCTV) y proteínas de recubrimiento (COPII) para su maduración tras la unión de la apolipoproteína A1 a su estructura (Hesse et al., 2013; Jaschke et al., 2012). Finalmente, los QM son secretados mediante exocitosis hacia la linfa intestinal y posteriormente a la circulación general. Los QM reducen progresivamente su contenido de TG al ser hidrolizados por acción de la lipoproteína lipasa (LPL), lo que permite la distribución de ácidos grasos libres a los tejidos periféricos (Kumari et al., 2021). De forma simultánea, los QM son enriquecidos principalmente por colesterol esterificado y apolipoproteína E, provenientes de HDL, denominándose ahora QM remanentes los cuales son removidos de circulación tras la unión de la apolipoproteína E a receptores hepáticos (Redgrave, 2004) (Figura 1).





**Figura 1. Vía exógena para la obtención de triacilglicéridos.** Los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis de TG dietarios son transportados al interior del enterocito, donde son reconvertidos a TG. Los TG son almacenados o exportados como quilomicrones, los cuales al ser hidrolizados proveen de ácidos grasos libres a los tejidos periféricos. Adaptado de Ko et al., 2020. Creado con BioRender.com. ACAT: Acetil-coenzima A acetiltransferasa; ApoA48: Apolipoproteína A48; COPII: Proteínas de recubrimiento II; DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa; FATP: Proteína transportadora de ácidos grasos; MGAT: Monoglicerol aciltransferasa; NPC1: Proteína Niemann Pick C1; PCTV: Vesícula transportadora de pre-quilomicrones.

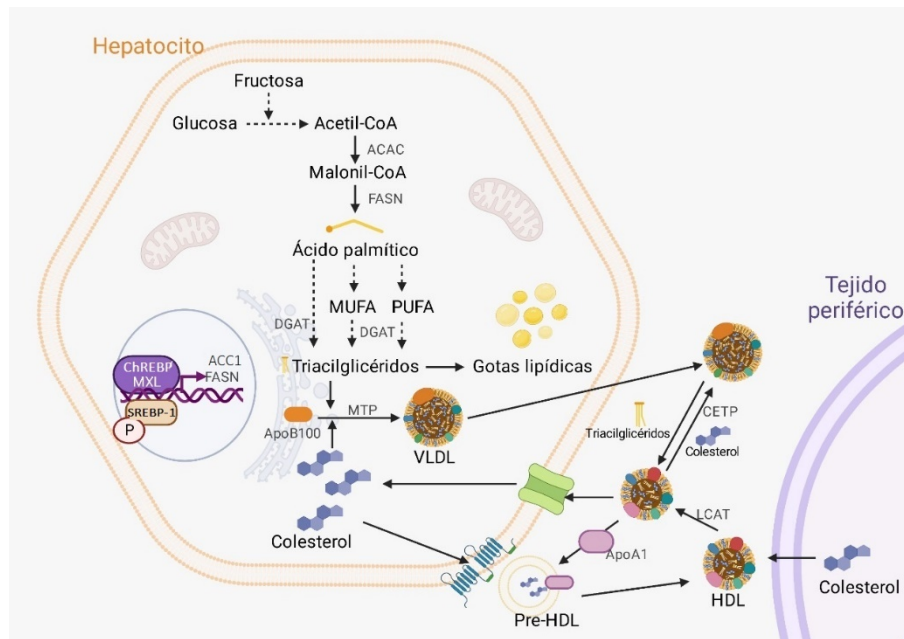
### 2.2.2. Vía endógena para la síntesis de triacilglicéridos y lipoproteínas de alta densidad

Mediante la lipogénesis *de novo* los carbohidratos excedentes de la ingesta dietaria son convertidos en ácidos grasos. A partir del acetil-CoA generado, posterior a la vía glucolítica, se genera el malonil-CoA por acción de la enzima acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1). Este intermediario es, a su vez, transformado a ácido palmítico, mediante la enzima sintasa de ácidos grasos (FASN) (Ameer et al., 2014).

El ácido palmítico es el principal ácido graso saturado (SFA) generado a través de esta vía, el cual, puede dar lugar a ácidos grasos más complejos como los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y algunos tipos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), después de ser sometido a una serie de reacciones consecutivas de elongación y desaturación (Liu et al., 2017). Estos ácidos grasos libres (SFA, MUFA y PUFA) son posteriormente esterificados a TG, los cuales, junto con aquellos almacenados en gotas lipídicas, pueden ser liberados en forma de partículas de muy baja densidad (VLDL), principalmente por el hígado. Los TG son empaquetados junto con otros tipos de lípidos y la apolipoproteína B100, con ayuda de MTP de forma similar como ocurre con los QM. Una vez que las VLDL son liberadas a circulación, son sometidas a hidrólisis y los FA resultantes son captados por tejidos periféricos. Esta lipólisis genera lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y eventualmente lipoproteínas de baja densidad (LDL) por acción de la lipasa hepática. Las lipoproteínas remanentes, también son captadas por el hígado, mediante receptores que reconocen a la apolipoproteína E en el caso de las VLDL e IDL, y a la apolipoproteína B100 en las LDL. Una vez que son removidas de circulación por endocitosis, estas partículas son transportadas a los lisosomas, donde las apolipoproteínas B son degradadas y los lípidos esterificados son hidrolizados a ácidos grasos libres (Feingold et al., 2021).

En el caso de las lipoproteínas HDL, éstas son ensambladas extracelularmente al conjuntar colesterol libre y la apolipoproteína A1. En circulación, el colesterol es esterificado por acción de la lecitín colesterol aciltransferasa (LCAT) intercambiando de forma recíproca por TG provenientes de lipoproteínas que contienen ApoB,

mediante la participación de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). De forma simultánea, las HDL remueven el exceso de colesterol de los tejidos periféricos, llevándolo hacia el hígado mediante el transporte reverso, donde este lípido puede ser redistribuido a otros tejidos o metabolizado para su posterior excreción del organismo (Brunham et al., 2015) (Figura 2).



**Figura 2. Vía endógena para la síntesis de triacilglicéridos y lipoproteínas de alta densidad.** Los ácidos grasos son sintetizados por la lipogénesis de novo a partir de carbohidratos excedentes de la dieta. Se generan diferentes variedades de SFAs, MUFAs y PUFAs, los cuales posteriormente son esterificados a TG. Los TG son exportados como VLDLs, los cuales al ser hidrolizados proveen de ácidos grasos libres a los tejidos periféricos. Las HDLs remueven el exceso de colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado. Adaptado de Heeren & Scheja, 2021. Creado con BioRender.com. ACC1: Acetil-coenzima A carboxilasa 1; ApoA1: Apolipoproteína A1; ApoB100: Apolipoproteína B100; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; ChREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa; FASN: Sintasa de ácidos grasos; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LCAT: Lecitín colesterol aciltransferasa; MTP: Proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos; MUFA: Ácido graso monoinsaturado; preHDL: Pre-Lipoproteína de alta densidad; PUFA: Ácido graso poliinsaturado; SREBP-1: Proteína de unión al elemento regulador del esteroles; VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

### **2.3. Factores que modulan las concentraciones circulantes de triacilglicéridos y C-HDL**

La regulación de las concentraciones plasmáticas de C-HDL y TG es un proceso complejo en el que participan factores genéticos y ambientales, incluyendo el estilo de vida (Heller et al., 1993). Se ha descrito en estudios en gemelos y en familias han reportado una alta heredabilidad de las concentraciones circulantes del C-HDL (40-70%) y de TG (54-65%) (Elder et al., 2009; Kathiresan et al., 2007).

Entre los factores del estilo de vida, se ha demostrado que el tabaquismo, sedentarismo y una dieta hipercalórica alta en carbohidratos y/o grasas saturadas se asocian con un mayor riesgo de presentar un desequilibrio en el metabolismo lipídico, principalmente de TG y de C-HDL (Jain & Ducatman, 2018; Shin et al., 2020; Wang & Xu et al., 2017).

### **2.4. Influencia de la dieta en el metabolismo de triacilglicéridos y C-HDL**

Se ha demostrado, por medio de ensayos clínicos y estudios epidemiológicos prospectivos, la influencia de la cantidad y tipo de grasa incluidos en la dieta sobre las concentraciones circulantes de los rasgos lipídicos. Particularmente, se ha descrito que en modelos murinos alimentados con dietas ricas en grasas con alto contenido de SFA, se induce la abundancia nuclear del factor de transcripción proteína de unión al elemento regulador del estero 1 (Srebp-1). En estos modelos, la elevación de Srebp-1, aumenta la expresión de genes que codifican para enzimas participantes en la lipogénesis *de novo* (*Acc1*: acetil-CoA carboxilasa 1, *Fasn*:

sintasa de ácidos grasos), así como la síntesis de MUFA (*Scd1*: esteroil-Coenzima A desaturasa 1 y *Elovl6*: elongasa 6 de ácidos grasos) y TG (*Mgat*: monoacilglicerol aciltransferasa y *Dgat*: diacilglicerol aciltransferasa) (Unger et al., 2010). No obstante, se ha sugerido que este incremento de las concentraciones de lípidos circulantes, debido a un consumo elevado de SFA, ocurre sólo en combinación con una ingesta deficiente de PUFA (Dias et al., 2014).

Por otra parte, ante una dieta rica en carbohidratos/baja en grasas se activa la vía de lipogénesis *de novo* a través de la inducción del factor de transcripción proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), el cual incrementa la expresión de genes involucrados en esta vía, lo que favorece la generación de SFA y consecuentemente de MUFA.

Los mamíferos son incapaces de sintetizar las familias de PUFA omega-3 ( $\omega$ 3) y omega-6 ( $\omega$ 6), ya que carecen de las desaturasas  $\Delta$ 12 y  $\Delta$ 15 necesarias para su generación por la vía de lipogénesis *de novo*, por lo tanto, dependen principalmente de las fuentes dietéticas de estos ácidos grasos (Burdge, 2018). Por otra parte, se ha reportado en estudios en humanos que los PUFA incrementan la activación de PPAR $\alpha$  lo que propicia la oxidación de ácidos grasos al aumentar la expresión de los genes *CPT-1* y *ACOX1* que codifican para las enzimas carnitinpalmoil transferasa 1 y acil-coenzima A oxidasa 1 (Zúñiga et al., 2011). La CPT-1 cataliza la conversión de acil-CoA de ácidos grasos en acil- carnitinas de ácidos grasos para su ingreso a la matriz mitocondrial, donde se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación, mientras que ACOX1 cataliza el paso inicial de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal (He et al., 2020; Lu et al., 2014). De forma simultánea, los PUFA suprimen el contenido nuclear de

ChREBP, disminuyen la abundancia de SREBP-1 y con ello la expresión de genes responsables de la síntesis de ácidos grasos, con lo que consecuentemente se reducen las concentraciones de TG hepáticos y sanguíneos (Jump, 2011).

Al evaluar el efecto del reemplazo en la ingesta de SFA por PUFA, consistentemente se ha demostrado una disminución en las concentraciones circulantes de TG y aumento en las concentraciones de C- HDL, aunque este último no en todas las intervenciones (Mensink et al., 2016). En contraste, el reemplazo de SFA por MUFA o carbohidratos ha presentado resultados menos benéficos respecto a las concentraciones de lipídicos circulantes (Clifton, 2018). Por ello, la relación entre la ingesta de PUFA/SFA podría implicar un mejor entendimiento de la participación de estos ácidos grasos en el desarrollo de las dislipidemias.

## **2.5. Participación de la microbiota en la regulación del metabolismo de triacilglicéridos y C-HDL**

Durante la digestión, el hospedero y la microbiota producen un amplio rango de moléculas que son esenciales para regular múltiples vías en común para ambos, incluyendo el metabolismo lipídico. De manera interesante, en ratones gnotobióticos se ha demostrado que, en ausencia de microbiota intestinal, se afecta el perfil lipídico del hospedero (Kindt et al., 2018; Velagapudi et al., 2010). Adicionalmente, en humanos se ha descrito una menor riqueza y diversidad microbiana asociadas con concentraciones alteradas de TG y C-HDL (Fu et al., 2015; Vojinovic et al., 2019; Yun et al., 2020).

No se conocen completamente los mecanismos mediante los cuales el perfil lipídico sanguíneo es modificado por influencia de la microbiota intestinal, sin embargo, se ha descrito la manera en que algunos de sus metabolitos participan en esta regulación.

### **2.5.1. Regulación del metabolismo de ácidos grasos mediada por ácidos grasos de cadena corta**

El intestino humano no es capaz de degradar la mayoría de los carbohidratos complejos, por ello, la fermentación de carbohidratos no digeribles (fibra dietaria) es realizada por bacterias anaerobias intestinales, que son capaces de generar diferentes compuestos simples, destacando entre ellos los ácidos grasos de cadena corta (SCFA; <6 carbonos), siendo el acetato, propionato y butirato los más abundantes, en una proporción 60:20:20, respectivamente (Wong et al., 2006). La producción de acetato está ampliamente distribuida entre diferentes géneros, incluyendo *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus* y *Akkermansia*. Los principales productores de butirato pertenecen al filo Firmicutes, en particular los géneros *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcaceae*, *Eubacterium* y *Roseburia*, mientras que la producción de propionato se ha descrito en géneros tales como *Prevotella*, *Alistipes*, *Roseburia*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Akkermansia* y *Eubacterium* (Louis & Flint, 2016; Nogal et al., 2021; Parada-Venegas et al., 2019). Adicionalmente, los SCFA pueden ser obtenidos de forma exógena a partir de alimentos obtenidos a través de fermentación bacteriana. Sin embargo, éstos son captados en su mayoría en el



tracto gastrointestinal alto, por lo que concentraciones muy bajas alcanzan a llegar al intestino grueso (Banasiewicz et al., 2020; Shimizu et al., 2019).

Los SCFA pueden ser oxidados a cuerpos cetónicos y CO<sub>2</sub>, sirviendo como fuente de energía para los colonocitos, ya que proveen entre el 60 y 70% de los requerimientos energéticos de estas células (Macfarlane & Macfarlane, 2012). Los SCFA que no son consumidos por los colonocitos son transportados a través de las membranas apical y basolateral por difusión pasiva o mediante transportadores proteicos. En circulación portal, los SCFA son captados principalmente por el hígado, previniendo que se acumulen altas concentraciones de estos ácidos grasos en sangre. Se ha descrito en modelos murinos, así como en estudios en humanos, que más del 70% del acetato y el 30% de propionato son captados por el hígado, mientras que solo remanentes de butirato llegan a este tejido. El resto de estos SCFA es captado por tejidos periféricos donde son metabolizados (Bloemen et al., 2009; Bloemen et al., 2010).

Además de ser sustratos metabólicos, los SCFA actúan como moléculas de señalización en la regulación del metabolismo lipídico, a través de la activación de la vía de oxidación de ácidos grasos y la inhibición de la lipogénesis *de novo*, lo que resulta en una reducción de las concentraciones de ácidos grasos plasmáticos. Este proceso inicia cuando los SCFA activan a la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) en tejido hepático y muscular al incrementar el cociente AMP:ATP, o bien, de forma indirecta en el tejido adiposo, a través de la vía del receptor de ácidos grasos libres (Ffar2)-leptina. La activación de AMPK induce la expresión del coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de

peroxisomas (PGC-1 $\alpha$ ), el cual induce la activación de factores de transcripción (PPAR $\alpha/\beta/\gamma$ , LXR y FXR). Esto propicia un incremento en la oxidación de ácidos grasos en el hígado y músculo, mientras que la lipólisis *de novo* disminuye en el hígado. En el caso del tejido adiposo, la termogénesis y la oxidación de ácidos grasos se incrementan por la activación de la proteína desacoplante 1 (UCP-1). Estos procesos resultan en una mayor lipólisis de las lipoproteínas ricas en TG (LRT) en circulación; así como un mayor aclaramiento hacia el hígado, por lo cual disminuyen las concentraciones séricas de TG. La lipólisis de LRTs a su vez, potencia la maduración y capacidad de transporte de colesterol de las partículas HDL, por lo que incrementan las concentraciones plasmáticas del C-HDL (Cheng et al., 2018; des Besten et al., 2013; Wang et al., 2021; Ying et al., 2022).

### **2.5.2. Regulación de la lipogénesis a través de la generación de intermediarios bacterianos obtenidos de los ácidos grasos poliinsaturados**

La microbiota intestinal también puede metabolizar ácidos grasos dietarios, principalmente a través de la hidratación e hidrogenación de los enlaces insaturados de las cadenas alifáticas de MUFAs y PUFAs. La variedad de precursores generados por estos procesos es aprovechada por el hospedero para sintetizar moléculas de señalización o como parte de lípidos estructurales (Kindt et al., 2018; Gérard, 2020). Adicionalmente, en diversos estudios en humanos y modelos animales se han asociado metabolitos derivados de PUFAs, como los conjugados de ácido linoleico (CLA), con efectos antiaterogénicos (Dilzer et al., 2012; Toomey

et al., 2006). A partir del ácido linoleico (LA), un ácido graso poliinsaturado esencial, diversos géneros bacterianos, tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Roseburia*, *Butyrivibrio* y *Megasphaera*, producen CLAs (Belury et al., 2002; Druart et al., 2014; Kim et al., 2002; Lehnen et al., 2015; Ogawa et al., 2005). La producción bacteriana de CLAs es un proceso de múltiples pasos que genera varios intermediarios metabólicos, como los ácidos grasos hidroxilados y oxidados que regulan la lipogénesis. En ensayos *in vitro* y modelos animales se ha descrito que los isómeros 10-hidroxi-CLA y 10-oxo-CLA reducen significativamente la expresión de *Srebp-1c*, *Scd-1* y *Acc2*, lo que resulta en una menor lipogénesis *de novo* y, en consecuencia, una menor concentración hepática de TG (Nanthirudjanar et al., 2015). No obstante, también se han observado diferentes efectos dependiendo de los isómeros de CLA. Se ha descrito que *cis-9,trans-11*-CLA favorece la sensibilidad a la insulina y disminuye la aterosclerosis, al activar el factor de transcripción PPAR $\gamma$ . En contraste, el *trans-10,cis-12*-CLA disminuye la sensibilidad a la insulina e incrementa la aterosclerosis al inhibir la expresión de PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$  (Brown et al., 2003; Granlund et al., 2003; Wargent et al., 2005). Estos factores de transcripción, a su vez, regulan la expresión de enzimas de las vías de síntesis o catabolismo de ácidos grasos, lo que resulta principalmente en la modificación de las concentraciones hepáticas y circulantes de TG.

## **2.6. Influencia de la dieta en la microbiota intestinal**

Se ha estimado que del 5 al 20% de la varianza de la microbiota intestinal en humanos estaría explicada por la dieta (Johnson et al., 2020). Estudios de

intervenciones dietarias han observado cambios en la microbiota intestinal, desde las primeras 24 horas de iniciada la intervención (Sonnenburg et al., 2016).

La influencia del consumo de carbohidratos en la modificación de la microbiota intestinal ha sido ampliamente estudiada. De forma consistente, se ha descrito que en humanos con una mayor ingesta de carbohidratos digeribles (mono y disacáridos) se incrementa la abundancia relativa de *Bifidobacterium* y reduce la abundancia de *Bacteroides* y *Clostridium* (Eid et al., 2014). Sin embargo, es el consumo de carbohidratos no digeribles, o fibra dietaria el que condiciona a un mayor impacto en la composición, diversidad y riqueza de la microbiota. Así, un mayor consumo de fibra incrementa la abundancia de bacterias productoras de SCFA los cuales participan en la regulación del metabolismo lipídico (Cronin et al., 2021; Seo et al., 2020).

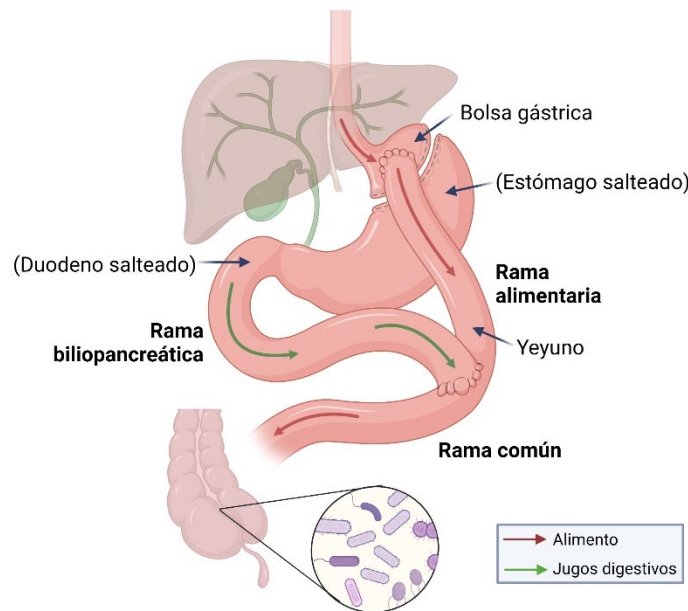
Respecto a las intervenciones con dietas altas en grasas, estudios en modelos murinos y en humanos han observado un incremento en la abundancia relativa de bacterias relacionadas con procesos inflamatorios como *Clostridiales*, *Bacteroides*, *Bilophila*, *Tyzzarella* y *Fusobacterium*, particularmente con un consumo elevado de grasas saturadas (Singh et al., 2017; Xu et al., 2022). En contraste, un mayor consumo de grasas insaturadas se ha relacionado con la presencia de bacterias productoras de SCFA tales como *Akkermansia muciniphila*. No obstante, todavía son pocos los estudios que han evaluado los efectos de los ácidos grasos insaturados sobre la microbiota, por lo que sus posibles efectos benéficos aún son controversiales (Machate et al., 2020).

## **2.7. Efecto de la cirugía bariátrica sobre las concentraciones de lípidos circulantes y su relación con la microbiota intestinal**

Debido a que la obesidad se ha relacionado con la presencia de dislipidemia aterogénica (Liao et al., 2020), la pérdida de peso puede mejorar las concentraciones de lípidos circulantes independientemente del tratamiento (Chawla et al., 2020; Vest et al., 2012). Particularmente, la cirugía bariátrica por bypass gástrico en Y de Roux (RYGB), es el tratamiento más efectivo para revertir la obesidad mórbida, así como para promover la mejoría de comorbilidades metabólicas asociadas (Adams et al., 2017). El RYGB es un procedimiento quirúrgico en el que se combinan los procedimientos de restricción, al crear una bolsa gástrica de tamaño reducido; así como de malabsorción, al desviar el estómago distal y el duodeno proximal, mediante la unión del extremo distal del yeyuno medio a la bolsa gástrica proximal (Furet et al., 2010) (Figura 3).

La mayor pérdida de peso ocurre entre el primer y segundo año posteriores al RYGB (Sjostrom, 2008). Estudios retrospectivos han reportado que después de 10 años de realizada la cirugía, al menos el 50% de los sujetos mantienen un 20% del peso perdido (Chahal-Kummen et al., 2020; Guimarães et al., 2021; Maciejewski et al., 2016). Adicionalmente, se ha reportado que el 97% presentan remisión de la dislipidemia durante el primer año, pero solo entre el 46 y 52% de estos pacientes se mantienen en remisión después de 10 años de realizada la cirugía (Chahal-Kummen et al., 2020; Guimarães et al., 2021; Maciejewski et al., 2016; Piché et al., 2021). Además, se ha observado un incremento de hasta 9% de la concentración

sérica del C-HDL y una disminución de más de 70% de la concentración de TG, después de un año del RYGB (Heffron et al., 2016; Nienov et al., 2019; Ruiz- Mar et al., 2020).



**Figura 3. Esquema de la anatomía postoperatoria después del bypass gástrico en Y de Roux.** Durante la cirugía, se separa la parte superior del estómago creando una bolsa gástrica la cual se une directamente al yeyuno (restricción). El resto del estómago y el duodeno se redireccionan al intestino delgado (malabsorción). Adaptado de Lutz & Bueter, 2014. Creado con BioRender.com.

Se han sugerido diferentes mecanismos a través de los cuales se genera la mejoría de los rasgos lipídicos después de esta cirugía. Al ser un procedimiento restrictivo y de malabsorción, una menor cantidad de TG y ácidos grasos son internalizados en el intestino. Por otra parte, debido a la pérdida de peso y de tejido graso, la sensibilidad a la insulina mejora, con lo cual se reduce el flujo de ácidos grasos no esterificados hacia el hígado y músculo, evitando así su acumulación y la

síntesis de TG (He et al., 2013). Además, los niveles posprandiales de péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y su receptor GLP-1R aumentan después de la cirugía bariátrica, reduciendo la tasa de síntesis de VLDLs y la lipogénesis *de novo* en el hígado (Mells & Anania, 2013; Schwartz et al., 2010). Adicionalmente, una vez estabilizada la pérdida de peso por la cirugía, se aumenta la actividad de las enzimas LCAT, LPL y CETP potenciando el catabolismo y remodelamiento de lipoproteínas ricas en TG. Parte de estos lípidos y apolipoproteínas son transferidos a las HDLs, generando un incremento en la concentración circulante de C-HDL (Piché et al., 2021).

La restricción en la ingesta y absorción de nutrientes por RYGB, así como los cambios anatómicos debidos a la intervención, también generan alteraciones en la microbiota intestinal (Steinert et al., 2020). Estudios en humanos han demostrado que estos cambios en la microbiota ocurren desde de los primeros 3 meses, manteniéndose estable hasta 10 años después de la intervención (Tremaroli et al., 2015; Zhou et al., 2020). Se ha descrito que la cirugía por RYGB restablece la riqueza y diversidad microbiana, y favorece el enriquecimiento de géneros anaerobios comensales productores de SCFA, tales como *Akkermansia*, *Roseburia* y *Faecalibacterium* (Kong et al., 2013; Magouliotis et al., 2017). Aunado a ello, factores como el cambio en los gradientes de oxígeno en el tracto intestinal favorecen la colonización de géneros anaerobios facultativos como *Escherichia*, *Streptococcus* y *Veillonella*, cuya relación con la remisión de la dislipidemia no ha sido establecida (Farin et al., 2020).

Aunque los cambios en la microbiota intestinal podrían contribuir con la mejora de los rasgos lipídicos, la causalidad y los mecanismos involucrados no se han definido (Davies et al., 2019). En este sentido, Lau y colaboradores (2021) describieron que la abundancia relativa de la familia Veillonellaceae y de los géneros *Sutterella* y *Enterobacter* correlacionó negativa con la concentración del C-HDL, después de un año de realizado el RYGB. En contraste, ningún taxón fue asociado con la concentración de TG (Lau et al., 2021).



### **3. Justificación**

La dislipidemia aterogénica es considerada un problema de salud pública, debido a su alta prevalencia en adultos y a su asociación con el incremento en el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares. Una dieta alta ácidos grasos poliinsaturados y baja en grasas saturadas (PUFA/SFA) ha sido reconocida como un factor importante para disminuir el riesgo de presentar dislipidemia aterogénica. Adicionalmente, se ha observado que la microbiota intestinal puede participar en la regulación de las concentraciones circulantes de lípidos, modulando la absorción intestinal de grasa proveniente de la dieta y con ello, la formación de lipoproteínas. Actualmente, son escasos los estudios en donde se describen géneros bacterianos relacionados con alteraciones en la concentración de lípidos asociados con el desarrollo de dislipidemia aterogénica como TG y C-HDL. Además, existen pocas evidencias que permitan plantear la hipótesis sobre los mecanismos a través de los cuales la microbiota intestinal se relaciona con los rasgos lipídicos de la dislipidemia aterogénica. Por ello, en este trabajo se planteó analizar la asociación entre la microbiota intestinal y la dislipidemia aterogénica. Así mismo, dado que se ha informado que la pérdida de peso por RYGB mejora la concentración de lípidos circulantes, también se evaluó si las modificaciones postquirúrgicas en el perfil microbiano están relacionadas con la mejoría del perfil lipídico en un grupo de pacientes sometidos a cirugía bariátrica por RYGB.

#### **4. Hipótesis**

La microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia aterogénica presentará una diversidad microbiana disminuida y un perfil taxonómico y funcional relacionado con la menor ingesta de ácidos grasos poliinsaturados. Además, los cambios en este perfil taxonómico, debido a la cirugía RYGB, se asociarán con mejoría en los parámetros lipídicos.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. Objetivo general**

Identificar el perfil taxonómico y funcional de la microbiota intestinal asociado con la presencia de dislipidemia aterogénica, así como los efectos de la microbiota intestinal en la concentración de lípidos séricos después del RYGB.

##### **5.2. Objetivos particulares**

- Determinar diferencias en la ingesta de macronutrientes, particularmente ácidos grasos saturados y poliinsaturados, entre pacientes con dislipidemia aterogénica y controles.
- Comparar la diversidad, composición y funcionalidad de la microbiota intestinal entre adultos con dislipidemia aterogénica y controles.
- Analizar si la ingesta de ácidos grasos (poliinsaturados y saturados) está asociada con los géneros bacterianos significativamente diferenciados entre los sujetos con dislipidemia aterogénica y controles.

- Evaluar si los géneros bacterianos significativamente diferenciados entre los pacientes con dislipidemia aterogénica y controles, se asocian con el perfil de lípidos después de la cirugía bariátrica.

## **6. Metodología**

### **6.1. Grupos de estudio**

Se incluyeron 41 sujetos con dislipidemia aterogénica (31 mujeres y 10 hombres) y 38 controles (32 mujeres y 6 hombres) mayores de 18 años pertenecientes a la “Cohorte de Trabajadores de La Salud” del IMSS (Denova-Gutiérrez et al., 2016) o captados en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (Martínez-Medina et al., 2021). Los criterios de inclusión fueron que contaran con una medición en ayuno de C-HDL y TG séricos, así como datos de secuenciación de microbiota intestinal a partir de una muestra de materia fecal. Los criterios de exclusión fueron el uso de antibióticos 3 meses previos al reclutamiento o el uso de fármacos hipolipemiantes en sujetos sin el diagnóstico de dislipidemia aterogénica. Adicionalmente, se evaluaron 20 pacientes con obesidad sometidos a cirugía bariátrica laparoscópica de bypass gástrico en Y de Roux (RYGB) y con seguimiento de un año posterior a la cirugía. Los pacientes formaban parte del Programa de Cirugía Bariátrica de la Clínica de Obesidad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Los protocolos de investigación para generar los resultados de esta tesis se realizaron de acuerdo con lo establecido en la declaración de Helsinki (World Medical Association, 2013). Estos protocolos fueron aprobados por los Comités de Ética de las instituciones participantes: Instituto Mexicano del Seguro Social (No. 12 CEI 09 006 14; 17 de mayo del 2016), Instituto Nacional de Medicina Genómica (CEI 2017/13; 19 de julio del 2017) e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y

Nutrición (Ref. 1468; 8 de abril del 2015). Todos los participantes incluidos en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado.

## **6.2. Evaluación antropométrica**

Las mediciones antropométricas de peso y talla fueron tomadas de acuerdo con la técnica de Lohman (1998), con procedimientos estandarizados y equipos calibrados con base en las normas de calidad establecidas internacionalmente. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso en kilogramos dividido entre la talla en metros elevada al cuadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) y el estatus de obesidad se consideró como  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ , de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021).

## **6.3. Evaluación bioquímica**

Las concentraciones séricas de C-HDL, TG, colesterol total (CT) y glucosa fueron determinadas a partir de una muestra de sangre periférica tomada posterior a un periodo de ayuno de 8 a 12 horas, mediante métodos estandarizados (Denova-Gutiérrez et al., 2016; Martínez-Medina et al., 2021). La dislipidemia aterogénica se definió como la presencia simultánea de concentraciones elevada de  $\text{TG} \geq 150 \text{ mg}/\text{dL}$  y disminuida de C- HDL  $<40 \text{ mg}/\text{dL}$  en hombres y  $<45 \text{ mg}/\text{dL}$  en mujeres (NCEP, 2002). La diabetes de tipo 2 (DT2) se definió considerando un valor de glucosa en ayuno  $\geq 126 \text{ mg}/\text{dL}$  o bien por diagnóstico previo (American Diabetes Association, 2019).

#### **6.4. Evaluación de la ingesta dietaria**

Se realizó a través de un cuestionario semi-cuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos previamente validado en población mexicana (Hernández et al., 1998). A través de éste, se les preguntó a los sujetos participantes los tamaños habituales y el total de porciones consumidas de 116 tipos de alimentos clasificados en 27 grupos, así como la frecuencia en que los ingirieron durante el último año por medio de 10 categorías de respuestas. Posteriormente, cada cuestionario se analizó con el software “Sistema de Evaluación de Hábitos Nutricionales y Consumo de Nutrientes (SNUT)”, mediante el cual se calculó la ingesta diaria promedio de nutrientes (g/día) (Hernández et al., 2003). El porcentaje energético para cada macronutriente (carbohidratos, grasas y proteínas) se calculó multiplicando la ingesta diaria promedio (g/día) por el factor de Atwater correspondiente (Capuano et al., 2018) y dividiendo entre el total de kilocalorías consumidas. Por su parte, el consumo de fibra dietaria (g/día) fue estandarizado por 1000 kilocalorías (g/1000kca/día), con la finalidad de reducir la variación debida a la diferencia de ingesta total de energía por cada sujeto.

#### **6.5. Análisis de microbiota intestinal**

Se les solicitó a los participantes que recolectaran una muestra de materia fecal, en un recipiente de plástico estéril, la cual se mantuvo en cadena de frío hasta su recepción en el respectivo centro de investigación. Se realizaron alícuotas de materia fecal en tubos de microcentrifuga de 2 mL y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

## **6.6. Extracción de DNA de muestras fecales**

A partir de 180-220 mg de materia fecal se realizó la extracción de DNA mediante los estuches comerciales “DNA Stool Mini Kit (Qiagen)” (32 casos, 24 controles y 20 pacientes de RYGB pre y post-cirugía) o “Power Fecal Kit (Qiagen)” (9 casos y 14 controles), de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Anexos A y B) y agregando un paso previo de lisis mecánica con el equipo FastPrep. El volumen final de elución fue de 200  $\mu$ L y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. El DNA extraído se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher, Delaware, EUA), usando como blanco el amortiguador de elución del estuche de extracción. Se verificó que la relación 260/280 se encontrara entre 1.8 – 2.0 y la relación 260/230 entre 1.5 – 2.0.

## **6.7. Preparación de librerías**

La clasificación taxonómica y análisis filogenético de las comunidades microbianas, se realiza comúnmente secuenciando algunas de las nueve regiones hipervariables (V1-V9) del gen ribosomal bacteriano 16S. Este gen es utilizado como un marcador debido a su universalidad y alta conservación en las bacterias (Yang et al., 2016). Las regiones V3 y V4 son las más frecuentemente usadas para analizar el microbioma humano (Liu et al., 2020).

Después de la extracción de DNA, se realizó la amplificación de la región hipervariable V4 (288pb) (30 casos y 31 controles) o bien, de las regiones V3-V4 (444pb) (11 casos, 7 controles y 20 pacientes de RYGB pre y post-cirugía) del gen

16S rRNA, teniendo en conjunto 41 sujetos con dislipidemia, 38 controles sin dislipidemia y 20 pacientes con cirugía de RYGB. El análisis de regiones distintas del gen 16S rRNA se debió a los distintos tiempos en los que se realizaron; así como a la disponibilidad de reactivos para uno u otro ensayo.

Para la secuenciación de la región V4, se realizó una primera PCR con 100 ng de DNA bacteriano (Anexo C), utilizando un diseño basado en los primers 515F y 806R (The Earth Microbiome Project), en el que 24 primers reverse diferentes incluyeron secuencias de código de barras para la identificación de las muestras (Tabla Suplementaria S1). Para la preparación de las librerías para las regiones V3-V4 se realizó con base en el protocolo “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” para el sistema Illumina ([https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)) y empleando los primers IlluminaF y IlluminaR (Tabla Suplementaria S2).

El amplificado obtenido se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 2% empleando como solución amortiguadora TAE 1x y usando como referencia el marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Jena Bioscience). El corrimiento electroforético se llevó a cabo en una cámara de electroforesis BIORAD a un voltaje de 65V durante 45 minutos (Figura Suplementaria S1). Posteriormente, se purificaron los amplicones con perlas magnéticas (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) para eliminar posibles contaminantes (Anexo D). La concentración de los amplicones purificados se determinó por fluorescencia con el kit dsDNA HS Assay y el equipo Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Una vez que los amplicones fueron



purificados, se realizó una segunda PCR (Tabla Suplementaria S3) para incorporar a cada producto de PCR códigos de barras y secuencias necesarias para la unión de adaptadores de Illumina requeridos en el proceso de secuenciación (Anexo E).

La verificación de la presencia de los amplicones (~500 pb), así como su purificación y cuantificación se realizaron acorde a la metodología previamente descrita. Los amplicones obtenidos fueron nuevamente mezclados en un solo conjunto, a partir del cual se realizó la secuenciación con la plataforma Illumina MiSeq 2x250 en la Unidad de Secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

#### **6.8. Procesamiento de las secuencias de amplicones del gen 16S rRNA**

Las secuencias en crudo se procesaron usando el pipeline QIIME2 (Bolyen & et al., 2019). Para poder analizar en conjunto las secuencias de la región V4 y de las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA, se excluyeron los nucleótidos correspondientes a la región V3 y se recortaron los extremos delimitando la región V4 (Figura Suplementaria S2). La secuencia esperada para la región V4 tuvo una longitud de 288pb, mientras que la de las regiones V3-V4 tuvo una longitud de 444pb. A partir de éstas, las lecturas forward de la región V4 se cortaron en la posición 20 y las lecturas reverse en la posición 38, ambas del extremo 5', y se truncaron en la posición 220 del extremo 3'. En el caso de las regiones V3-V4, las lecturas forward y reverse se cortaron en las posiciones 194 y 20 del extremo 5', respectivamente, y

fueron truncadas en la posición 240 del extremo 3'. De esta manera, todas las secuencias quedaron con una longitud comparable de 220pb.

Se usó el complemento DADA2 para la corrección de errores y la resolución de las variantes de secuencias de amplicones (ASV). Las ASVs inferidas representan la unidad mínima de información de cada muestra, es decir, secuencias de amplicones diferenciadas que corresponden a cada una de las observaciones biológicas presentes, previo a su agrupación taxonómica (Callahan et al., 2016). Las secuencias quiméricas se eliminaron con el método consenso. Después de la resolución, las ASVs fueron agrupadas taxonómicamente en OTUs al 97% de identidad usando el complemento “cluster-features-open-reference” con el algoritmo V-SEARCH (Rognes et al., 2016) y la base de datos SILVA v.132. La agrupación mediante el método de OTUs se realizó con la finalidad de corregir el ruido de fondo generado por las diferentes regiones hipervariables secuenciadas y homologar los amplicones analizados, puesto que este agrupamiento es independiente de los datos y se basa en las secuencias referencia (Callahan et al., 2016). El árbol filogenético se construyó con las secuencias representativas de cada OTU, usando el complemento “align-to.tree-mafft-fasttree” (Kato & Toh, 2008; Price et al., 2010). Posteriormente, las muestras se normalizaron por rarefacción a una profundidad de lectura de alta calidad de 19,000, con un total de 2,261,000 lecturas.

## **6.9. Evaluación de la diversidad y composición de la microbiota intestinal**

Los análisis de diversidad y composición taxonómica de la microbiota se realizaron con el paquete phyloseq v1.38.0 (McMurdie & Holmes, 2013) del software R v4.1.1 (R Core Team, 2021). La pérdida de la diversidad de la microbiota suele ser un hallazgo constante en la disbiosis intestinal asociada con diferentes patologías (Kriss et al., 2018; Mosca et al., 2016). En este sentido, se emplearon diferentes herramientas matemáticas para poder describir la complejidad ecológica de la microbiota (Finotello et al., 2016; Wei et al., 2021) de los grupos de estudio, así como detectar posibles diferencias en la diversidad microbiana y una posible disbiosis relacionada con la dislipidemia.

Para contrastar la diversidad de las muestras independientemente de las diferencias por tamaño de cada muestra, se realizó la estandarización por rarefacción de la tabla de OTUs mediante un muestreo aleatorio sin reemplazo (1000 veces). La diversidad alfa se evaluó mediante el número de especies observadas, así como por los índices Chao1, Shannon y Simpson. La diversidad alfa resume la heterogeneidad general de una comunidad bacteriana, en cuanto a la riqueza y distribución de la abundancia de especies. El índice de Chao1 es un método no paramétrico para estimar el número de especies en una comunidad y el índice de Shannon refleja el número de taxones diferentes y qué tan uniformemente se distribuyen dentro de la comunidad. Finalmente, el índice de Simpson se emplea para medir el grado de dominancia de las especies más representativas de la comunidad (Finotello et al., 2016; Kim et al., 2017).

Para la diversidad beta, se calcularon las distancias UniFrac ponderada y no ponderada, estableciendo diferencias entre los grupos de estudio respecto al fenotipo mediante la prueba PERMANOVA con 9999 permutaciones (vegan v2.5.7) (Oksanen et al., 2020). La diversidad beta es empleada para comparar y cuantificar el grado de diferenciación entre comunidades bacterianas. Para ello, el método UniFrac mide la distancia filogenética entre los taxones presentes (no ponderada), además de detectar cambios en función de la abundancia de estos (ponderada). Mediante los análisis mencionados se pueden estimar las contribuciones relativas de diferentes factores sobre la microbiota (Lozupone et al., 2005; Lozupone et al., 2011).

Las diferencias de composición taxonómica entre los grupos de estudio se establecieron usando la versión en línea del análisis discriminante lineal de tamaño de efecto (LEfSe v1.0) (Segata et al., 2010; <http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>), respecto a la abundancia relativa a los diferentes niveles taxonómicos. Únicamente aquellos taxones con valores LDA (análisis discriminante lineal)  $>2$  y  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos. La influencia de la edad, sexo e IMC, al igual que la del estuche de extracción y las regiones secuenciadas como covariables, se evaluó mediante un modelo lineal de asociación multivariable (MaAsLin2 v1.4.0) (Mallick et al., 2020).

De manera importante, se evaluó la compatibilidad del análisis conjunto de los datos generados en este estudio. Para ello, se comparó la diversidad microbiana entre los estuches de extracción y las regiones secuenciadas para cada uno de los grupos (casos y controles). Lo anterior debido a que se ha reportado que el uso de

diferentes estuches de extracción de DNA; así como de distintas regiones hipervariables puede condicionar cambios en el perfil de la microbiota intestinal (Kazantseva et al., 2021; Lim et al., 2018; Liu et al., 2020; Yang et al., 2016). Notablemente, la diversidad alfa presentó el mismo comportamiento entre los grupos de estudio (casos o controles), independientemente de la región secuenciada o el estuche para extracción de DNA empleado (Figuras Suplementarias S3-S4 y Tablas Suplementarias S4-S5). De igual manera, la diversidad beta no presentó diferencias en las distancias UniFrac al considerar el estuche de extracción y la región secuenciada como covariables (Tabla Suplementaria S6).

#### **6.10. Predicción de la funcionalidad microbiana**

El software de investigación filogenética de comunidades mediante la reconstrucción de estados no observados (PICRUSt2 v2.2.0) (Douglas et al., 2020; <https://github.com/picrust/picrust2/wiki/>) se usó para predecir la funcionalidad de la microbiota. Las diferencias en el enriquecimiento de vías entre los grupos de estudio se establecieron usando el análisis LEfSe v1.0; Segata et al., 2010), respecto a la abundancia relativa de las funciones predichas a nivel 3, según la base curada MetaCyc (Caspi et al., 2018). Únicamente aquellas vías con valores  $LDA > 2$  y  $p < 0.05$  fueron consideradas como significativas.

### **6.11. Análisis estadísticos**

Los análisis se realizaron con los softwares R v4.1.1 (R Core Team, 2021) y SPSS Statistics v24.0 (IBM Corp., 2016). Las pruebas Shapiro-Wilk y Levene se aplicaron para verificar la normalidad de los datos. Las variables continuas de los casos y controles que no presentaron una distribución normal, se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney. Asimismo, la prueba Wilcoxon pareada se utilizó para los comparativos en los sujetos sometidos a cirugía RYGB (ggpubr v0.4.0) (Kassambara, 2020). Los índices de diversidad se compararon con la prueba *t*-Student y las variables categóricas nominales mediante la prueba Chi-cuadrada.

La correlación de la abundancia relativa de los géneros bacterianos con las concentraciones séricas del C-HDL y TG, IMC y el cociente PUFA/SFA se realizó con la prueba Rho de Spearman mediante los paquetes microbiomSeq v0.1 (Ssekagiri, 2022) y ggpubr v0.4.0 (Kassambara, 2020). Para los análisis de la microbiota intestinal en la cirugía bariátrica, sólo se consideraron los géneros bacterianos con una abundancia relativa >1% y que estuvieran presente en al menos el 25% de los sujetos (Morán-Ramos et al., 2019). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron como estadísticamente significativos. La corrección por pruebas múltiples de los resultados obtenidos se realizó mediante el procedimiento descrito por Benjamini-Hochberg (1994). Los gráficos presentados se construyeron con el paquete ggplot2 v3.3.5 (Wickham, 2021).

## 7. Resultados

### 7.1. Características de grupos de estudio

Las características demográficas, antropométricas y bioquímicas de los pacientes con dislipidemia y el grupo control se presentan en la Tabla 1. Como se esperaba, los sujetos con dislipidemia aterogénica presentaron concentraciones de C-HDL más bajas y de TG más altas que los sujetos controles, consistente con los criterios usados para definir la dislipidemia aterogénica. Además, el grupo con dislipidemia aterogénica presentó un mayor IMC, así como concentraciones más altas de glucosa en ayuno y menores de CT.

**Tabla 1.** Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos con dislipidemia aterogénica y controles

	<b>Dislipidemia aterogénica n=41</b>	<b>Control n=38</b>	<b>p</b>
<b>Sexo (M/H)</b>	31 / 10	32 / 6	0.342
<b>Edad (años)</b>	59.0 (48.0 – 69.5)	55.0 (35.0 – 64.0)	0.160
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.9 (26.3 – 30.7)	24.1 (21.9 – 26.9)	<b>1.0x10<sup>-5</sup></b>
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	38.0 (33.0 – 41.8)	67.9 (61.9 – 73.9)	<b>2.1x10<sup>-14</sup></b>
<b>TG (mg/dL)</b>	229.0 (183.5 – 267.5)	90.0 (71.3 – 108.0)	<b>2.1x10<sup>-14</sup></b>
<b>CT (mg/dL)</b>	179.0 (161.0 – 197.5)	208.0 (180.0 – 229.3)	<b>0.004</b>
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	99.0 (92.5 – 109.5)	92.5 (85.8 – 97.3)	<b>0.002</b>
<b>DT2 (%)</b>	14.6 (n=6)	7.9 (n=3)	0.207
<b>Tx hipolipemiante (%)</b>	22.0 (n=9)	0 (n=0)	<b>0.004</b>

Los datos se presentan como mediana (rango intercuartil) o porcentaje (n). El valor *p* se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney para las variables continuas, o bien, la prueba Chi Cuadrada para variables categóricas. M: mujer; H: hombre; IMC: índice de masa corporal; C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; CT: colesterol total; DT2: diabetes tipo 2; Tx: tratamiento.

## **7.2. Patrones dietarios en los sujetos con dislipidemia aterogénica y controles**

A pesar de que los sujetos con dislipidemia presentaron un mayor IMC que el grupo control, la ingesta total de energía fue similar entre ambos grupos y dentro del rango recomendado para adultos (mediana de 1557 kcal/día en los pacientes con dislipidemia y 1596 kcal/día en los controles). Respecto a los macronutrientes de la dieta, no se observaron diferencias significativas al comparar las proporciones en la ingesta de carbohidratos y grasas entre los pacientes con dislipidemia y controles. Es de llamar la atención que, para ambos grupos de estudio, la mediana de la ingesta de grasas fue inferior a lo recomendado para una dieta saludable (Trumbo et al. 2002). Particularmente, el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), pero no de saturados (SFA), fue significativamente menor en los sujetos con dislipidemia comparados con los controles (Tabla 2).

Adicionalmente, se evaluó el cociente PUFA/SFA, debido a que éste puede ser un mejor indicador del valor nutricional estos ácidos grasos; así como de sus posibles efectos en desarrollo de complicaciones metabólicas. De manera interesante, el cociente PUFA/SFA fue significativamente menor en los individuos con dislipidemia en comparación con el grupo de control (Figura 4). Además, el análisis en conjunto de todos los sujetos presentó una correlación positiva entre el cociente PUFA/SFA y la concentración de C-HDL ( $Rho=0.256$ ,  $p=0.023$ ); así como una correlación negativa entre dicho cociente y la concentración sérica de TG ( $Rho=-0.240$ ,  $p=0.033$ ; Figura 5 A-B). En contraste, estos lípidos presentaron

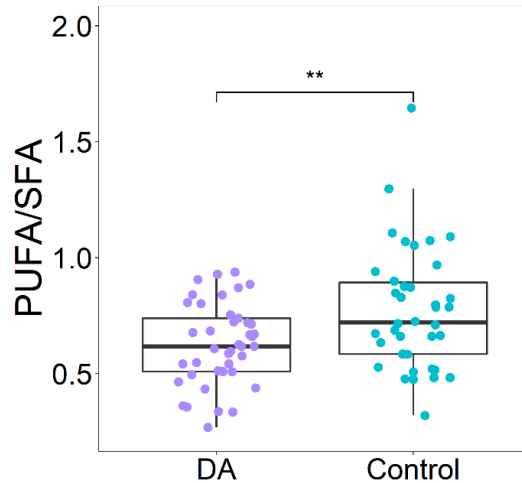


correlaciones no significativas con los PUFA y SFA por separado (Tabla Suplementaria S7).

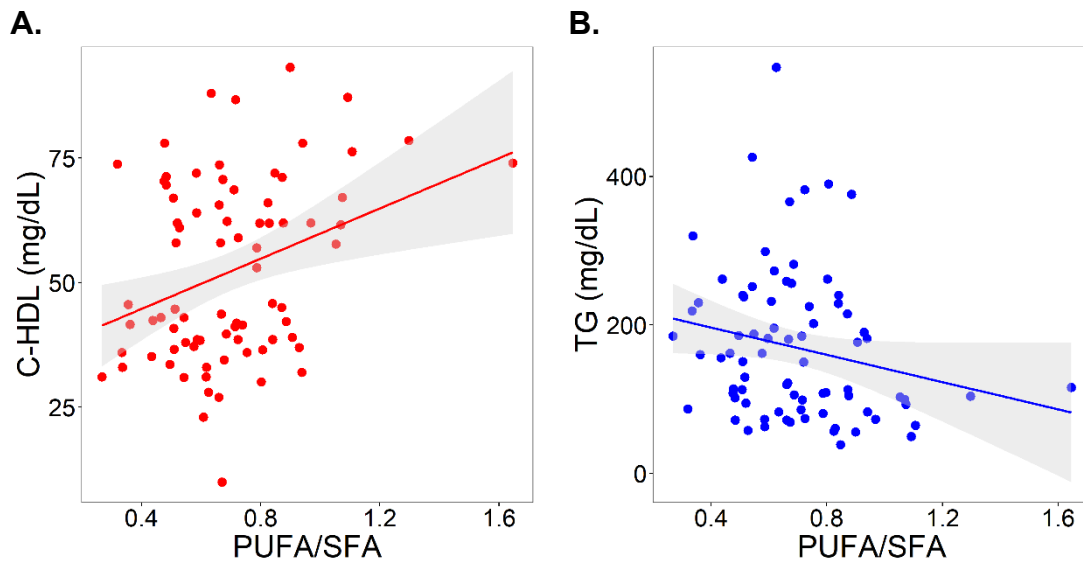
**Tabla 2.** Ingesta diaria de nutrientes de los grupos de estudio

	<b>Dislipidemia Aterogénica n=41</b>	<b>Control n=38</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Calorías (kcal/día)</b>	1557 (1222 – 1995)	1596 (1278 – 2291)	0.841
<b>Carbohidratos (%)</b>	61.94 (56.84 – 66.55)	59.31 (53.27 – 67.92)	0.399
<b>Proteínas (%)</b>	13.77 (11.98 – 15.05)	13.75 (12.06 – 15.35)	0.746
<b>Grasa total (%)</b>	24.40 (20.70 – 28.83)	26.91 (20.40 – 31.82)	0.280
<b>SFA (%)</b>	8.09 (6.84 – 10.48)	8.81 (6.13 – 9.96)	0.631
<b>MUFA (%)</b>	10.85 (8.43 – 12.36)	11.91 (8.69 – 14.55)	0.164
<b>PUFA (%)</b>	4.92 (4.18 – 6.18)	5.75 (4.61 – 7.11)	<b>0.035</b>
<b>Fibra dietética (g/1000kcal)</b>	15.18 (10.42 – 20.42)	17.24 (11.14 – 21.65)	0.524

Los datos se presentan como mediana (rango intercuartil). El valor *p* se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney. C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; kcal: kilocalorías; g: gramos; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.



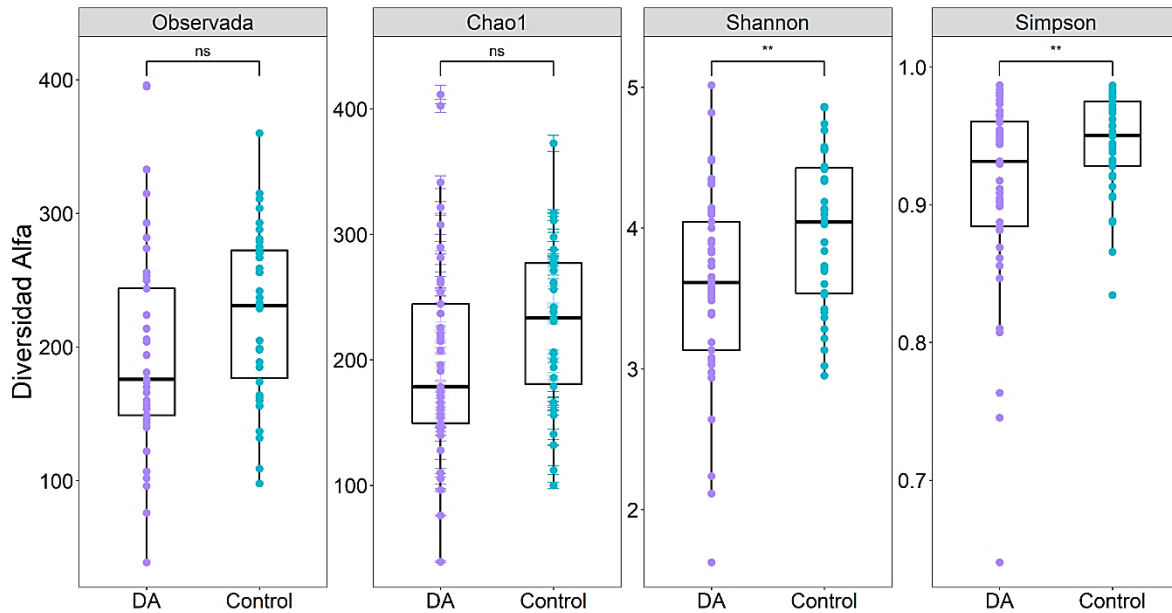
**Figura 4. Cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados de sujetos con dislipidemia y controles.** En el gráfico se presentan las medianas y rangos intercuartiles del cociente PUFA/SFA de los grupos de estudio (n=41 y n=38, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney. DA: dislipidemia aterogénica; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados. \*\* $p < 0.005$ .



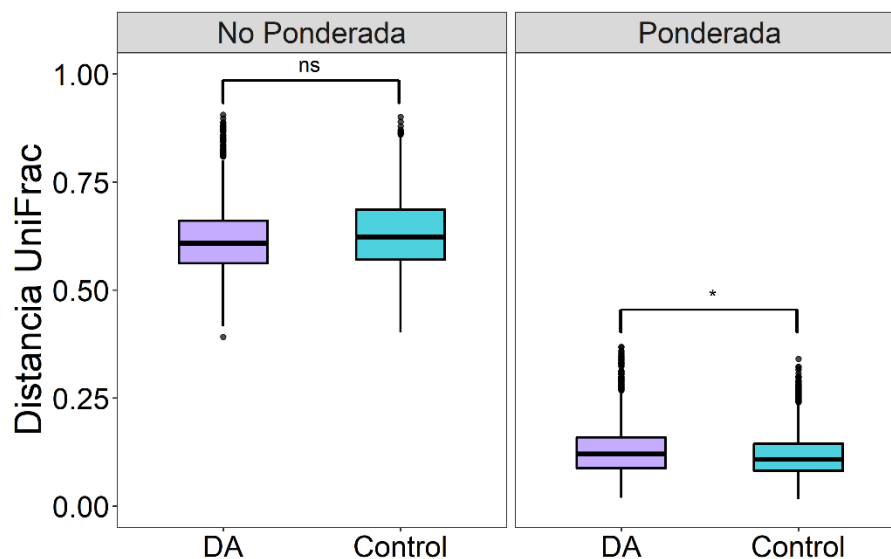
**Figura 5. Correlación de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados/saturados y parámetros lipídicos.** Se muestran los gráficos de dispersión del (A) C-HDL ( $Rho=0.256$ ,  $p=0.023$ ) y (B) TG ( $Rho=-0.240$ ,  $p=0.033$ ). Análisis mediante Rho de Spearman (n=79). C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados.

### **7.3. Diversidad de la microbiota intestinal en los grupos de estudio**

La diversidad alfa estimada por el número de especies observadas y por los índices Chao1, Shannon y Simpson fue menor en los sujetos con dislipidemia, aunque solo las comparaciones de los índices Shannon y Simpson fueron estadísticamente significativas (Figura 6;  $p < 0.005$ ). Al analizar en conjunto todos los sujetos, los cuatro parámetros de la diversidad alfa y la concentración de C-HDL correlacionaron positivamente, sin alcanzar significancia estadística ( $p > 0.05$ ). En contraste, los distintos índices de diversidad correlación negativa y significativamente con la concentración de TG ( $p < 0.05$ ) (Figura Suplementaria S5). En relación con la diversidad beta, la distancia UniFrac ponderada mostró diferencias significativas entre el grupo con dislipidemia y los controles ( $F=2.298$ ,  $R=0.0289$ ,  $p=0.038$ ; PERMANOVA) (Figura 7).



**Figura 6. Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.** En el gráfico se presentan las medianas y rangos intercuartiles de las especies observadas y los índices Chao1, Shannon y Simpson entre los grupos de estudio (n=41 y n=38, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante la prueba  $t$ -Student. DA: dislipidemia aterogénica. \*\* $p < 0.005$ ; ns: no significativo.



**Figura 7. Diversidad beta de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.** En el gráfico se presentan las medianas y rangos intercuartiles de las distancias UniFrac, no ponderada (F-value= 1.299; R-value= 0.017) y ponderada (F-value= 2.298; R-value= 0.029), entre los grupos de estudio (n=41 y n=38, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante el análisis PERMANOVA. DA: dislipidemia aterogénica. \* $p < 0.05$ ; ns: no significativo.

#### 7.4. Composición taxonómica de los grupos de estudio

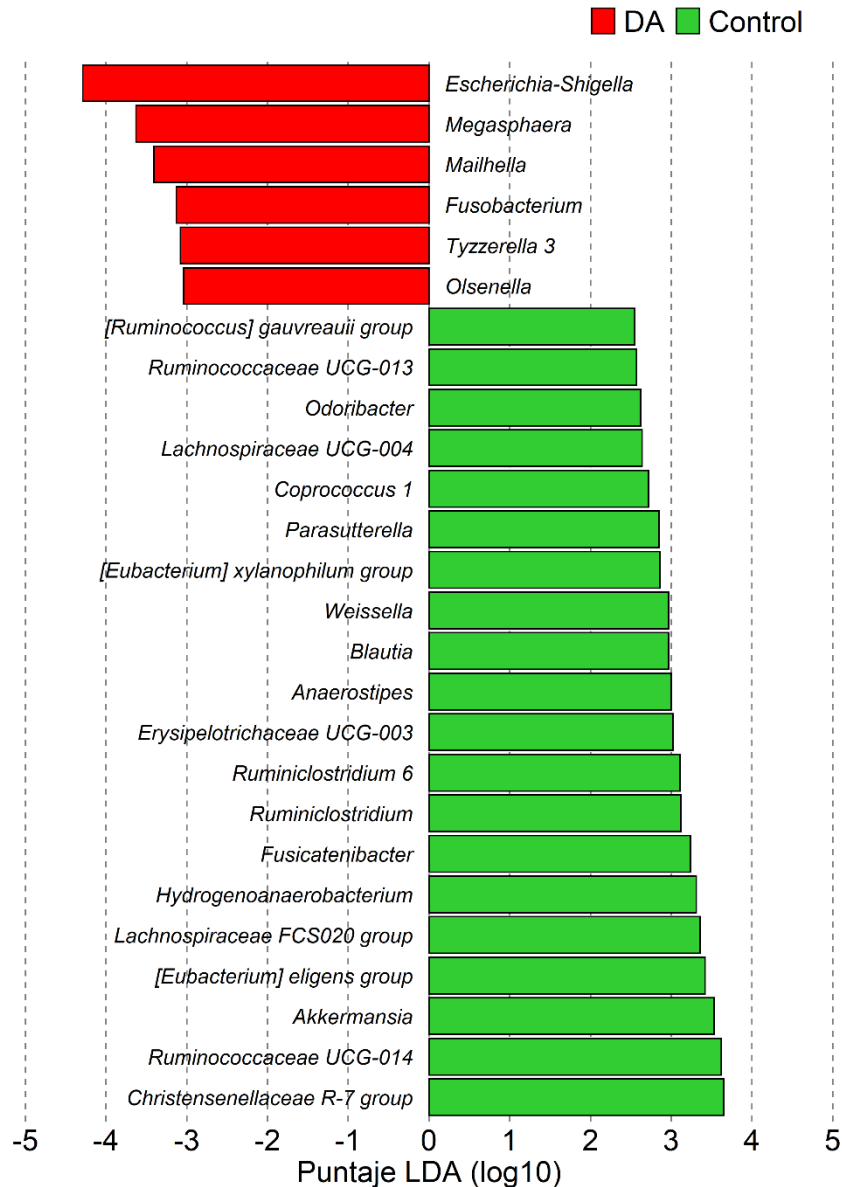
Se evaluó la composición taxonómica de la microbiota intestinal de los sujetos con dislipidemia y controles, identificando 14 fila, 21 clases, 41 órdenes, 88 familias y 198 géneros. La media de la abundancia relativa de la microbiota intestinal a nivel de filo, clase y género en los pacientes con DA y los controles se muestra en las figuras suplementarias S6-S8. Los filos más abundantes en ambos grupos de estudio (dislipidemia y controles) fueron Firmicutes (46.7% y 53.0%, respectivamente) y Bacteroidetes (43.5% y 37.2%, respectivamente); las clases más abundantes fueron Clostridia (40.2% en DA y 48.5% en controles) y Bacteroidia (43.5% en DA y 37.2% en controles); mientras que los géneros más abundantes

fueron *Bacteroides* (20.9% en DA y 18.9% en controles) y *Prevotella 9* (13.7% en DA y 11.3% en controles).

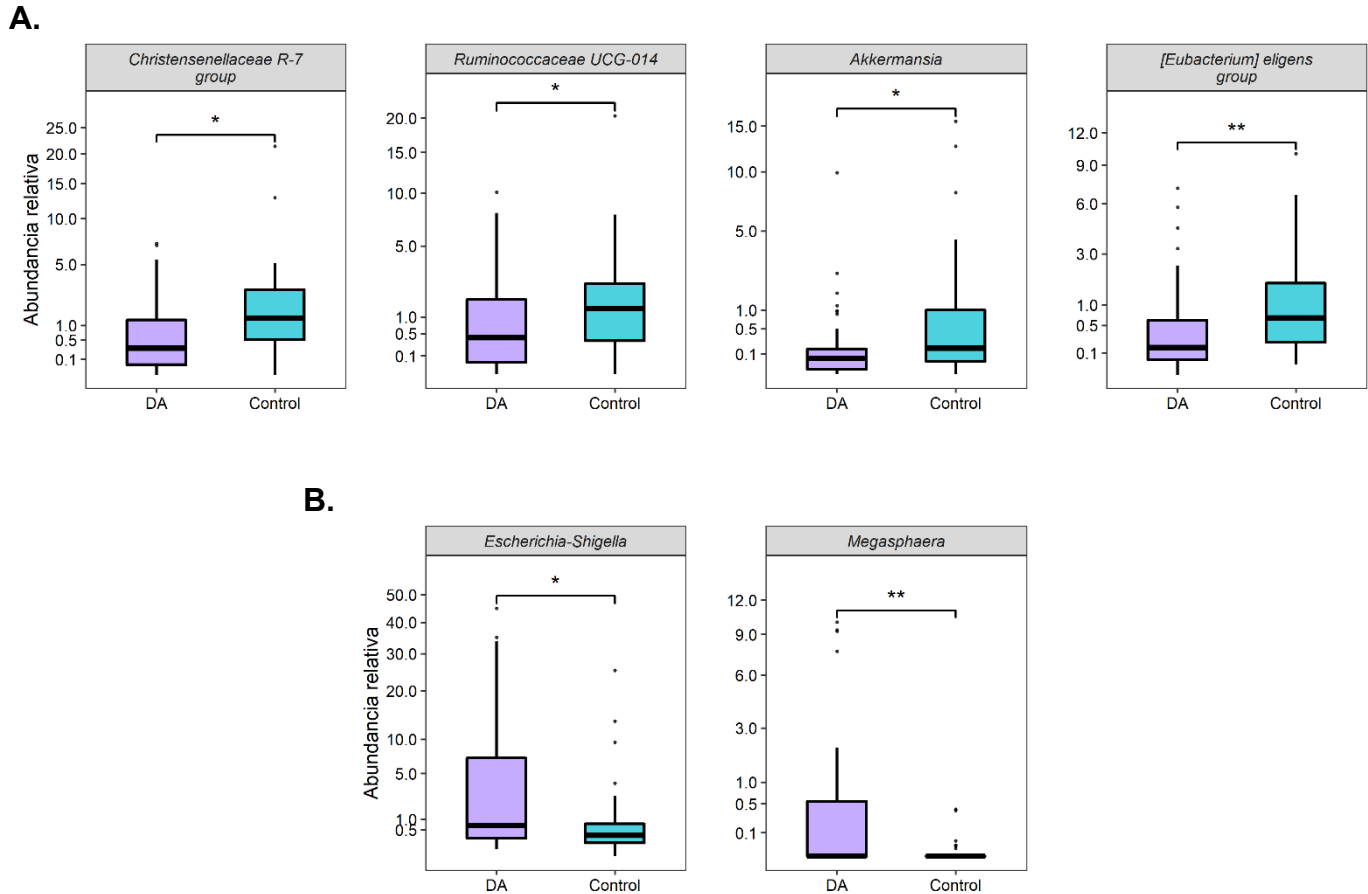
El análisis para identificar diferencias taxonómicas entre pacientes con dislipidemia y controles se realizó mediante el análisis LEfSe, considerando como diferencias significativas un puntaje para el efecto discriminante lineal (LDA) >2 y un valor de significancia ( $p$ ) <0.05. Este análisis evidenció un enriquecimiento significativo de las fila Verrucomicrobia, Tenericutes y Cyanobacteria en los sujetos control, mientras que las fila Proteobacteria y Fusobacteria presentaron una mayor abundancia en los pacientes con dislipidemia (Figura Suplementaria S9). Además, la abundancia relativa de dos clases fue mayor en los sujetos con dislipidemia (Gammaproteobacteria y Fusobacteriia), y 5 clases fueron más abundantes en los controles (Clostridia, Verrucomicrobiae, Mollicutes, Erysipelotrichia y Melainabacteria) (Figura suplementaria S10). Por último, la abundancia relativa de 20/198 géneros fue significativamente más alta en los controles (Figura 8), incluyendo 4 con un score LDA >3.5 (*Christensenellaceae R-7*, *Ruminococcaceae UCG-014*, *Akkermansia* y el grupo [*Eubacterium*] *eligans*); mientras que 6/198 géneros fueron significativamente más abundantes en el grupo con dislipidemia, incluyendo 2 con LDA >3.5 (*Escherichia-Shigella* y *Megasphaera*) (Figura 9).

Después de ajustar por edad, sexo e IMC mediante un modelo lineal multivariado (MaAslin2), 12 de los géneros identificados mediante LEfSe fueron significativamente más abundantes en los controles y 3 en los pacientes con dislipidemia. En particular, todos los géneros asociados con un score LDA >3.5 también presentaron asociación significativa en el análisis con MaAsLin2 ( $p \leq 0.01$ ,

$q \leq 0,1$ ), excepto *Akkermansia*, ya que su asociación perdió significancia tras ajustar por edad, sexo e IMC ( $p=0.156$ ,  $q=0.335$ ) (Tabla Suplementaria S10).



**Figura 8. Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.** En el gráfico se presentan los géneros enriquecidos asociados significativamente ( $p < 0.05$ ) con los grupos de estudio ( $n=41$  y  $n=38$ , respectivamente). El puntaje LDA o tamaño de efecto está representado en escala logarítmica. DA: dislipidemia aterogénica.



**Figura 9. Abundancia relativa de géneros diferenciados (LDA >3.5,  $p < 0.05$ ) entre grupos dislipidemia y control. (A) Géneros enriquecidos en sujetos control; (B) géneros enriquecidos en sujetos con dislipidemia. (n=41 y n=38, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney. DA: dislipidemia aterogénica. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ .**

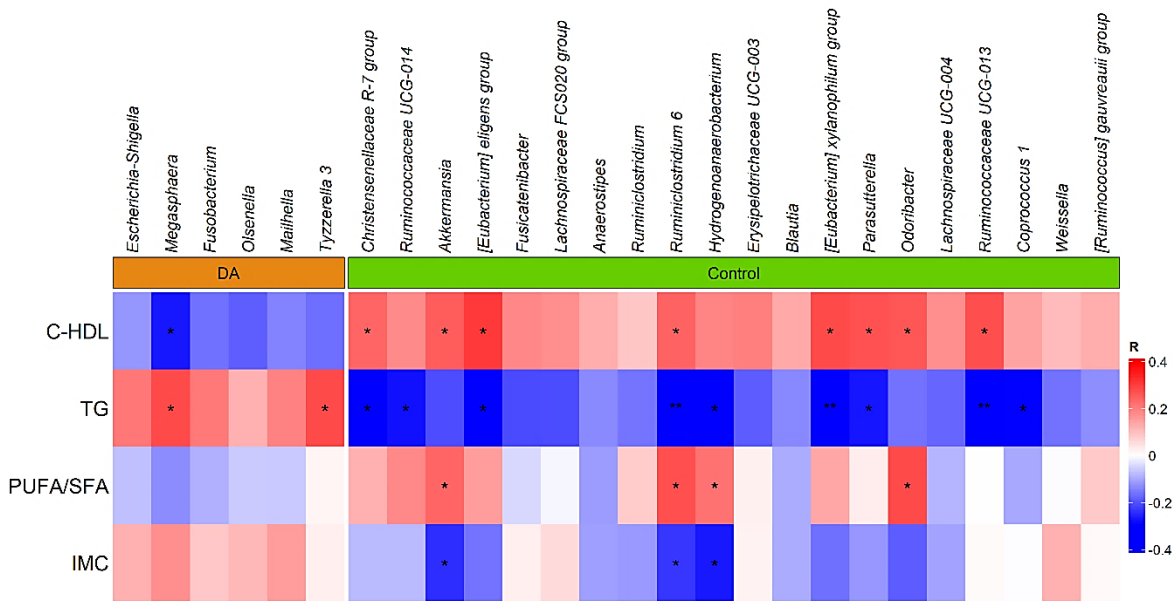
### 7.5. Correlación de los géneros diferenciados entre casos y controles, con parámetros lipídicos y el cociente de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados/saturados

Se evaluó la correlación de la abundancia relativa de los 26 géneros diferenciados entre sujetos con dislipidemia y controles, con las concentraciones circulantes del C-HDL y TG. De manera importante, los 20 géneros enriquecidos en



el grupo control, correlacionaron de forma positiva con la concentración del C-HDL y negativamente con la concentración de TG. De estos, 6 géneros correlacionaron significativamente con ambos parámetros. Cabe resaltar que, las correlaciones negativas de *Christensenellaceae R-7 group*, *[Eubacterium] eligens group*, *Ruminiclostridium 6*, *[Eubacterium] xylanophilum group* y *Ruminococcaceae UCG-013* con la concentración de TG, permanecieron significativas después de corregir por pruebas múltiples ( $q < 0.05$ ) (Tabla Suplementaria S11).

A pesar de que se ha informado que la ingesta de PUFA y SFA puede modular la composición de la microbiota intestinal, solo 4 géneros enriquecidos en el grupo control (*Akkermansia*, *Ruminiclostridium 6*, *Hydrogenoanaerobacterium* y *Odoribacter*) presentaron una correlación positiva y significativa con el cociente PUFA/SFA. De ellos, solo la correlación de *Odoribacter* permaneció significativa después de ajustar por el IMC ( $p = 0.033$ ), lo cual es consistente con las correlaciones negativas y significativas de las abundancias de los géneros *Akkermansia*, *Ruminiclostridium 6*, y *Hydrogenoanaerobacterium*, pero no de *Odoribacter* con el IMC (Figura 10).



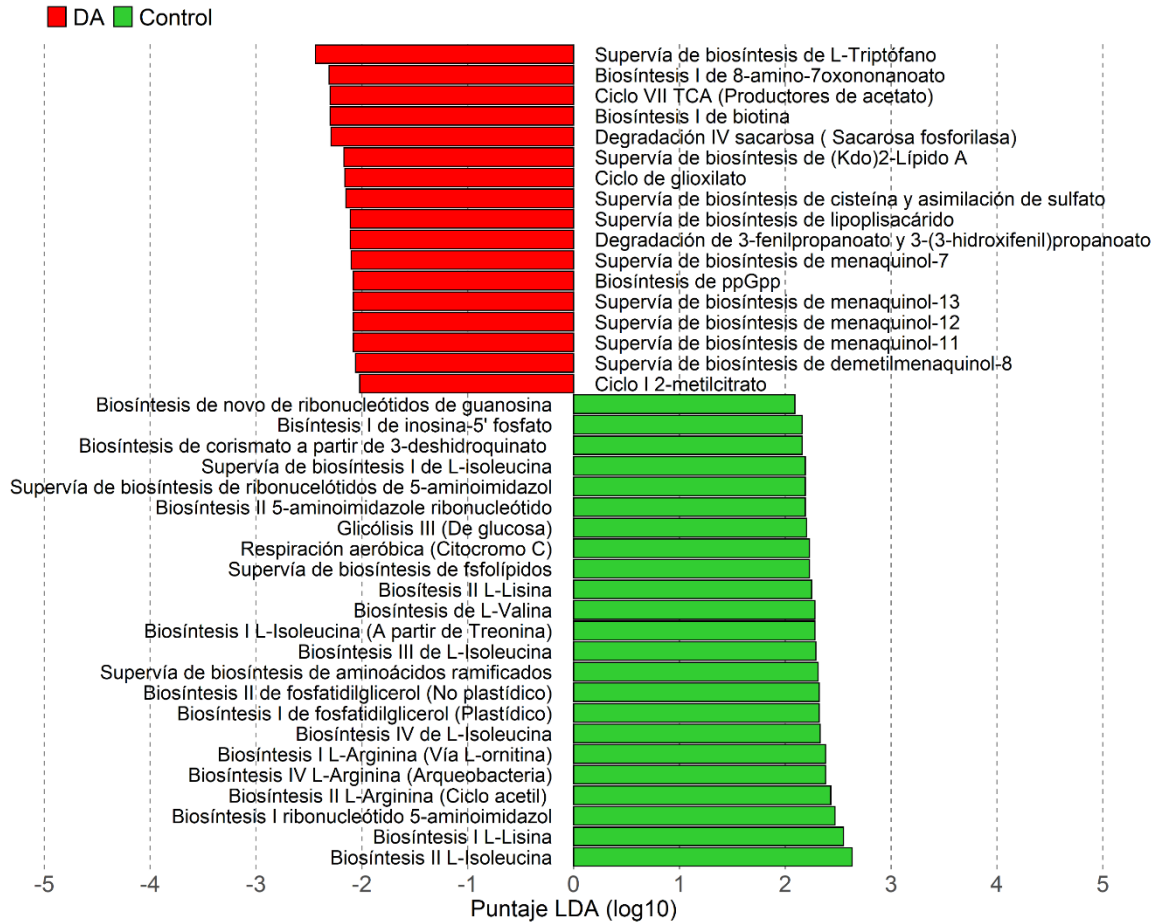
**Figura 10. Mapa de calor de las correlaciones de la abundancia relativa de géneros identificados en el análisis LEfSe con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos, cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados e índice de masa corporal. Análisis mediante Rho de Spearman (n=79). DA: dislipidemia aterogénica; C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados; IMC: índice de masa corporal. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ .**

### 7.6. Diferencias en el perfil funcional de la microbiota intestinal entre sujetos con dislipidemia aterogénica y controles

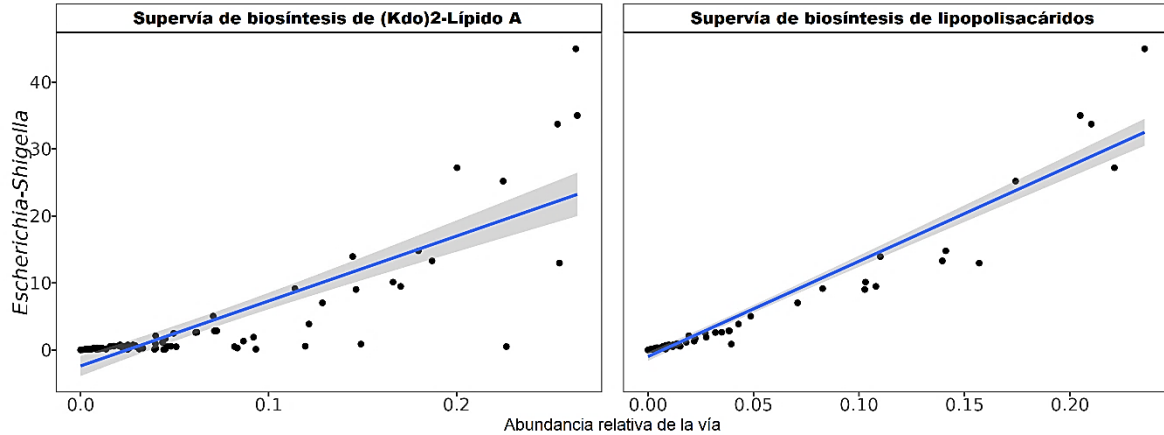
A partir de la caracterización de la microbiota intestinal, se realizó un análisis funcional predictivo para identificar las vías metabólicas diferenciadas entre los sujetos con dislipidemia y los controles. Además, con este análisis se buscó identificar procesos metabólicos que relacionaran la microbiota intestinal con los componentes de la dieta (PUFA/SFA) y la presencia de dislipidemia. Los resultados obtenidos presentan 40 vías diferenciadas, de las cuales 23 estuvieron enriquecidas

en los controles y 17 en los sujetos con dislipidemia (Figura 11). Ninguna de las vías diferenciadas estuvo relacionada con el metabolismo de los ácidos grasos.

En los controles sin dislipidemia, se observó el enriquecimiento de vías relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos ramificados (BCAA). Adicionalmente, se identificaron vías relacionadas con la biosíntesis de precursores de ácidos nucleótidos, tales como el aminoimidazol. Respecto al grupo con dislipidemia, se identificó el enriquecimiento de vías de biosíntesis de menaquinonas (MK) o vitamina K2. Además, las vías de la biosíntesis de Kdo2-Lipid A y de biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) se observaron significativamente incrementadas en los sujetos con dislipidemia. Este resultado fue particularmente relevante, debido a que los sujetos con dislipidemia presentaron una mayor abundancia del género *Escherichia-Shigella*, uno de los principales productores de LPS. De manera importante, estas vías metabólicas correlacionaron positiva y significativamente con el género *Escherichia-Shigella* ( $Rho=0.787$ ;  $p=8.0 \times 10^{-18}$  con la vía de síntesis de Kdo2-Lípido A y  $Rho=0.984$ ;  $p=2.3 \times 10^{-59}$  con vía de biosíntesis de LPS) (Figura 12).



**Figura 11. Enriquecimiento de vías metabólicas inferidas para los sujetos con dislipidemia y controles.** Las vías se predijeron mediante el software PICRUST2 y las diferencias entre los grupos de estudio se establecieron con el análisis LEfSe (n=41 y n=38, respectivamente). En el gráfico se presentan las vías enriquecidas (a nivel 3) asociadas significativamente con los grupos de estudio ( $p < 0.05$ ). El puntaje LDA o tamaño de efecto está representado en escala logarítmica. DA: dislipidemia aterogénica.



**Figura 12. Correlación de la abundancia de *Escherichia-Shigella* y las vías enriquecidas de biosíntesis de Kdo2-Lípido A y Lipopolisacáridos.** Análisis mediante Rho de Spearman (n=79). (Rho=0.787;  $p=8.0 \times 10^{-18}$  con la vía de síntesis de Kdo2-Lípido A y Rho=0.984;  $p=2.3 \times 10^{-59}$  con vía de biosíntesis de LPS).

### 7.7. Microbiota intestinal asociada con las concentraciones de C-HDL y triacilglicéridos antes y después de cirugía por bypass gástrico en Y de Roux

Al evaluar los parámetros lipídicos de los sujetos sometidos a una cirugía bariátrica por RYGB para pérdida de peso, se observó que la concentración circulante de TG disminuyó significativamente, mientras que la concentración de C-HDL incrementó después de 12 meses de realizada la cirugía. Cabe mencionar que previo a la cirugía, 4 pacientes tenían tratamiento con fármacos hipolipemiantes y solo uno de ellos continuó con el tratamiento después de la intervención (Tabla 3).

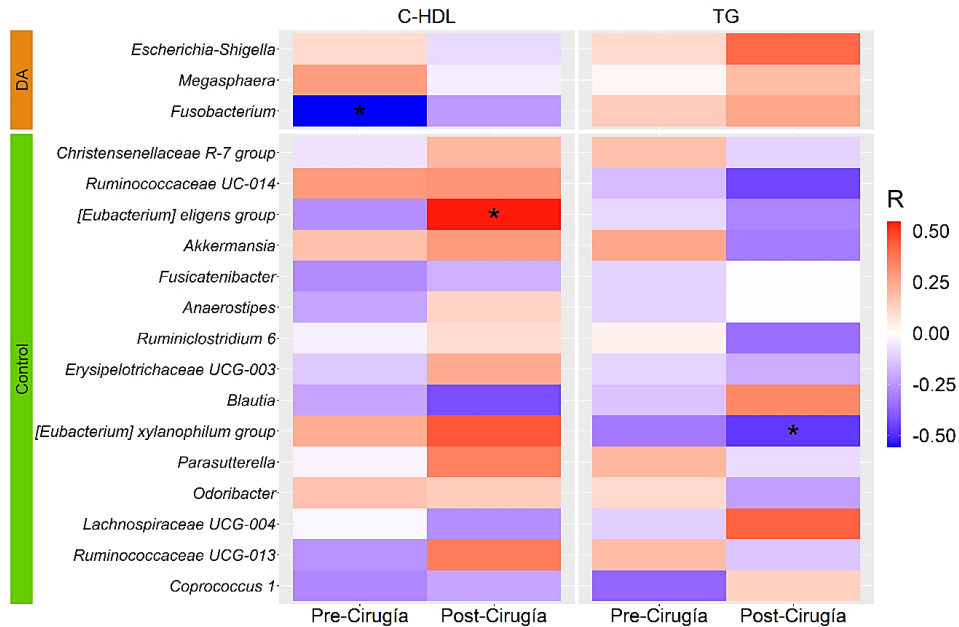
**Tabla 3.** Características de los sujetos antes y después de cirugía bariátrica por bypass gástrico en Y de Roux.

	Pre-Cirugía n=20	Post-Cirugía n=20	p
<b>Sexo (M/H)</b>		13 / 7	-
<b>Edad (años)</b>		40.0 (31.3 – 44.8)	-
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	45.7 (42.3 – 52.0)	32.9 (28.7 – 36.2)	<b>2.4x10<sup>-5</sup></b>
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	35.0 (31.3 – 41.8)	45.0 (37.0 – 49.0)	<b>0.002</b>
<b>TG (mg/dL)</b>	159.5 (104.3 – 180.8)	100.0 (67.0 – 144.0)	<b>0.015</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	154.5 (136.3 – 186.5)	146.0 (132.0 – 157.0)	0.111
<b>Tx hipolipemiente (%)</b>	20.0 (n=4)	5.0 (n=1)	0.151

Los datos se presentan como mediana (rango intercuartil) o porcentaje (n). El valor p se calculó mediante la prueba Wilcoxon pareado para las variables continuas, o bien, la prueba Chi Cuadrada para variables categóricas. Los valores de significancia se corrigieron mediante un ajuste por pruebas múltiples. M: mujer; H: hombre; IMC: índice de masa corporal; C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; CT: colesterol total; Tx: tratamiento.

Posteriormente, se analizó la asociación entre el perfil lipídico (niveles de C-HDL y TG) y la abundancia relativa de 18 de los 26 géneros diferenciados entre los sujetos con dislipidemia y controles. Estos géneros fueron seleccionados por estar presentes en al menos el 25% de los sujetos sometidos a cirugía bariátrica. De manera interesante, previo a la cirugía solo la abundancia de *Fusobacterium* correlacionó negativa y significativamente con la concentración sérica del C-HDL, como se puede observar en el gráfico de calor (Figura 13), lo cual es consistente con una mayor abundancia de este género en los sujetos con dislipidemia. Los análisis posteriores a la cirugía mostraron que el género *[Eubacterium] eligens* correlacionó positivamente con la concentración de HDL-C, mientras que *[Eubacterium] xylanophilum* correlacionó de forma negativa con la concentración de

TG. Ambas correlaciones permanecieron significativas después de ajustar por el IMC ( $p < 0.05$ ).



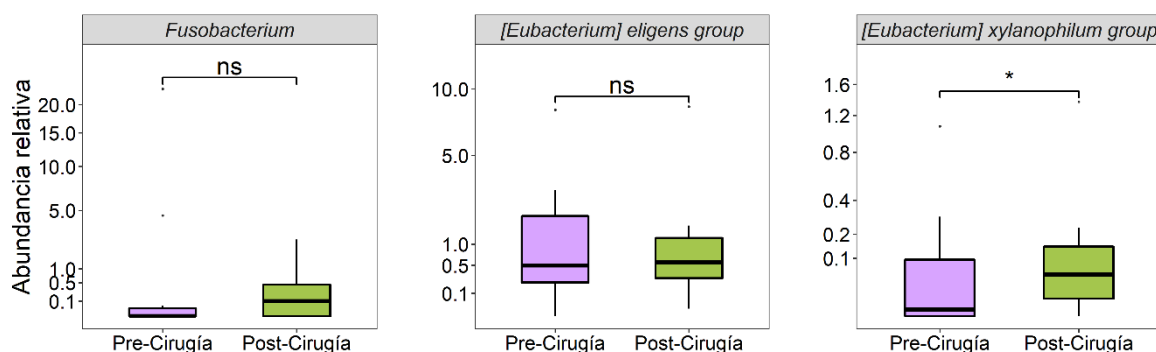
**Figura 13. Mapa de calor de las correlaciones de la abundancia relativa de géneros identificados con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos, antes y después de la cirugía por bypass gástrico en Y de Roux. Análisis mediante Rho de Spearman (n=20). DA: dislipidemia aterogénica; C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos. \* $p < 0.05$ .**

De los 20 pacientes con obesidad sometidos a cirugía bariátrica, 10 cumplieron con los criterios para definir la presencia de dislipidemia aterogénica (Tabla 4). Al comparar la abundancia relativa de los géneros *Fusobacterium*, *[Eubacterium] eligens* y *[Eubacterium] xylanophilum* en los pacientes con dislipidemia antes y después de la cirugía, se observó que solo *[Eubacterium] xylanophilum*, incrementó significativamente después de la cirugía en los sujetos con dislipidemia (Figura 14).

**Tabla 4.** Características de los sujetos con dislipidemia antes y después de cirugía por bypass gástrico en Y de Roux

Dislipidemia aterogénica n=10			
	Pre-Cirugía	Post-Cirugía	p
<b>Sexo (M/H)</b>	7 / 3		-
<b>Edad (años)</b>	40.0 (31.3 – 44.8)		-
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	48.3 (41.3 – 55.7)	32.9 (28.8 – 37.7)	<b>0.002</b>
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	33.0 (30.8 – 36.5)	42.0 (37.0 – 46.5)	<b>0.010</b>
<b>TG (mg/dL)</b>	175.0 (162.8 – 183.3)	135.0 (108.3 – 149.0)	<b>0.002</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	157.0 (133.8 – 189.3)	143.0 (124.5 – 159.8)	0.257
<b>Tx hipolipemiante (%)</b>	30 (n=3)	10 (n=1)	0.264

Los datos se presentan como mediana (rango intercuartil) o porcentaje (n). El valor p se calculó mediante la prueba Wilcoxon pareado para las variables continuas, o bien, la prueba Chi Cuadrada para variables categóricas. Los valores de significancia se corrigieron mediante un ajuste por pruebas múltiples. M: mujer; H: hombre; IMC: índice de masa corporal; C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; CT: colesterol total; Tx: tratamiento.

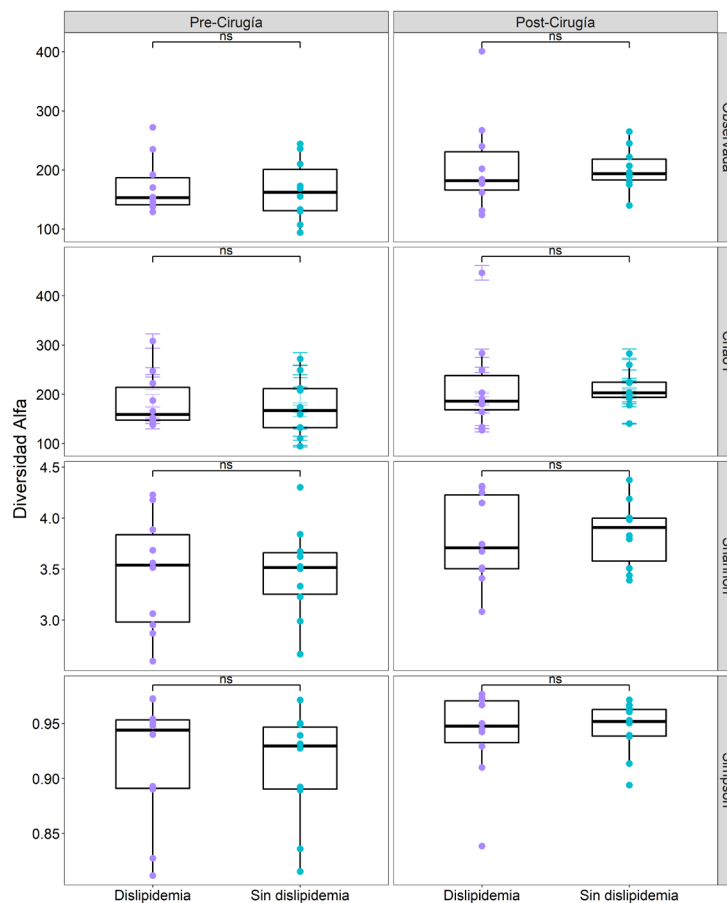


**Figura 14.** Abundancia relativa de *Fusobacterium*, *[Eubacterium] eligens group* y *[Eubacterium] xylanophilum group* en sujetos con dislipidemia antes y después de cirugía bariátrica. (n=10 y n=10, respectivamente). El valor p se calculó mediante la prueba Wilcoxon pareado. \*p<0.05; ns: no significativo.



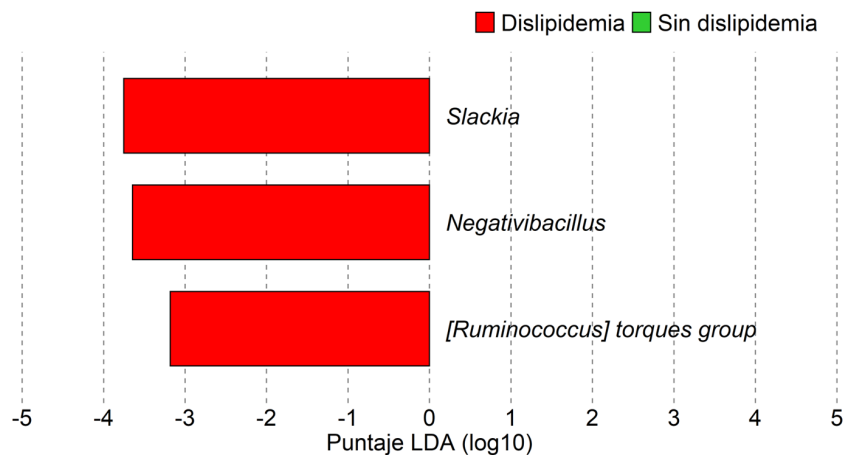
## 7.8. Variación de la microbiota intestinal asociada con la remisión de la dislipidemia aterogénica después de cirugía por bypass gástrico en Y de Roux

Después del RYGB, la dislipidemia aterogénica remitió en los 10 pacientes con este fenotipo. Al contrastar los parámetros de la diversidad alfa de estos sujetos con aquellos sin dislipidemia, no se encontraron diferencias significativas antes ni después de la intervención (Figura 15).



**Figura 15. Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos sometidos a bypass gástrico en Y de Roux.** En el gráfico se presentan las medianas y rangos intercuartiles de las especies observadas y los índices Chao1, Shannon y Simpson, entre los pacientes con dislipidemia y los sujetos sin dislipidemia (n=10 y n=10, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante la prueba  $t$ -Student. ns: no significativo.

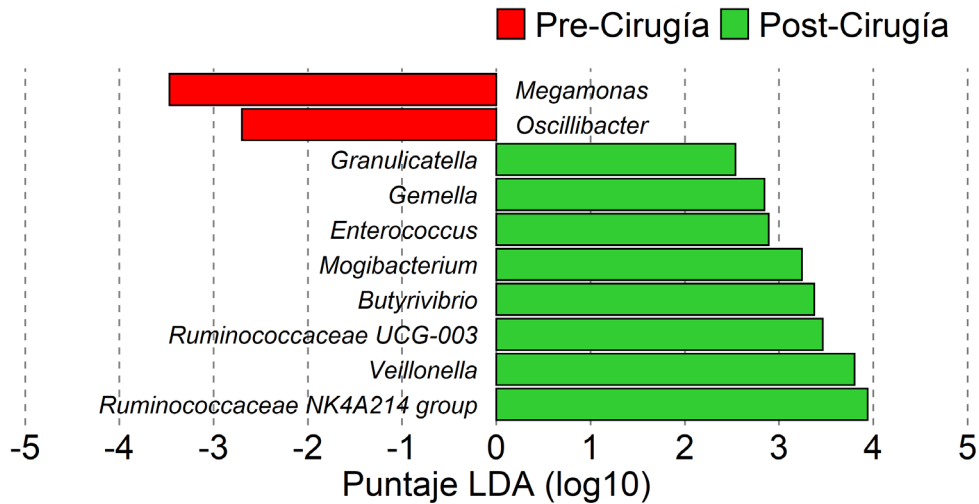
Mediante el análisis LEfSe, se identificó una mayor abundancia de los géneros *Slackia*, *Negativibacillus*, [*Ruminococcus*] *torques* group y *Desulfovibrio* en los pacientes con dislipidemia antes del RYGB (Figura 16). Ninguno estos géneros se encontraron diferenciado significativamente entre los pacientes con DA y controles, analizados en la primera etapa del estudio.



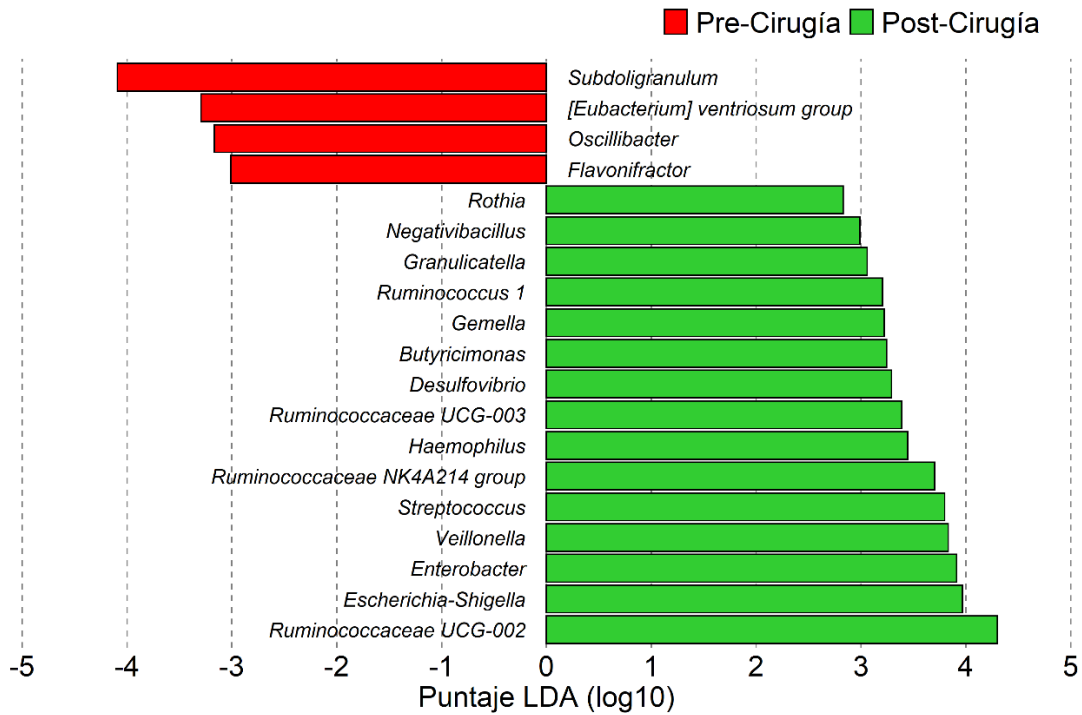
**Figura 16. Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de pacientes sometidos a bypass gástrico en Y de Roux.** En el gráfico se presentan los géneros enriquecidos asociados significativamente ( $p < 0.05$ ), con los pacientes con dislipidemia ( $n=10$ ) y sujetos sin dislipidemia ( $n=10$ ). El puntaje LDA o tamaño de efecto está representado en escala logarítmica.

De manera interesante, el análisis de la microbiota de los 10 sujetos con dislipidemia que normalizaron su perfil lipídico después del RYGB identificó 8/178 géneros que incrementaron su abundancia, comparados con 2/178 géneros que disminuyeron (Figura 17). Los sujetos sin dislipidemia presentaron 15/178 géneros incrementados y 4/178 géneros disminuidos después de la cirugía (Figura 18). Entre éstos, 7 géneros estuvieron compartidos entre los sujetos con dislipidemia y sin dislipidemia después del RYGB, por lo que el cambio puede deberse principalmente

a la cirugía. De manera interesante, 3 géneros (*Enterococcus*, *Mogibacterium* y *Butyrivibrio*) se identificaron solo en los sujetos con dislipidemia, por lo que pudieran estar relacionados con la remisión de esta patología.



**Figura 17. Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia sometidos a cirugía por bypass gástrico en Y de Roux.** En el gráfico se muestran los géneros enriquecidos asociados significativamente ( $p < 0.05$ ) con los grupos de estudio ( $n=10$  y  $n=10$ , respectivamente). El puntaje LDA o tamaño de efecto está representado en escala logarítmica.



**Figura 18. Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos sin dislipidemia sometidos a cirugía por bypass gástrico en Y de Roux.** En el gráfico se muestran los géneros enriquecidos asociado significativamente ( $p < 0.05$ ) con los grupos de estudio ( $n=10$  y  $n=10$ , respectivamente). El puntaje LDA o tamaño de efecto está representado en escala logarítmica.

## 8. Discusión

En diferentes estudios se ha sugerido que una diversidad disminuida de la microbiota intestinal podría tener una participación importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas (Moreno-Indias et al. 2014). En el presente trabajo, se observó una disminución de la diversidad alfa en los sujetos con dislipidemia aterogénica, consistente con estudios realizados en poblaciones de origen europeo y asiáticas, los cuales presentaron, por una parte, correlaciones negativas entre la diversidad de la microbiota intestinal y la concentración de TG, y, por otra parte, correlaciones positivas con la concentración de C-HDL (Kim et al., 2020; Fu et al., 2015; Yun et al., 2020). Cabe mencionar que, aunque no se observó variación en los resultados por influencia de los diferentes estuches de extracción empleados y las regiones secuenciadas, resulta relevante la confirmación de los análisis en un número mayor de sujetos.

El análisis de la composición de la microbiota intestinal entre sujetos con dislipidemia aterogénica y controles, permitió identificar diversos géneros previamente asociados con el metabolismo de lípidos, particularmente en la cohorte LifeLines-DEEP que incluye sujetos de origen europeo (Fu et al., 2015). Así tenemos que la asociación identificada en el presente estudio respecto a la menor abundancia de los géneros *Coprococcus 1*, *Christensenellaceae R-7* y *Odoribacter*, con la dislipidemia aterogénica, es consistente con los resultados de la cohorte LifeLines-DEEP. En esta cohorte, la abundancia de *Coprococcus* reveló una fuerte y negativa asociación con la concentración de TG ( $p=6 \times 10^{-5}$ ) (Fu et al., 2015). Las especies de *Coprococcus* son bacterias productoras de SCFA, conocidas por

disminuir la lipogénesis y mejorar la resistencia a la insulina (Agus et al., 2021). En un estudio reciente se encontró que la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 aumenta la abundancia de *Coprococcus*, asociándose este aumento con una mayor concentración sérica de SCFA y ácidos grasos de cadena ramificada, así como con concentraciones menores de TG (Vijay et al., 2021). Estos resultados sugieren que los beneficios cardiovasculares asociados a una mayor ingesta de PUFA podrían estar mediados, al menos en parte, por la microbiota intestinal. Sin embargo, en el presente estudio, la abundancia de género *Coprococcus* no se asoció significativamente con la proporción de PUFA/SFA. De manera notable, *Christensenellaceae* otro de los géneros identificados en este estudio, fue previamente asociado en los europeos con concentraciones menores de TG ( $p=2 \times 10^{-5}$ ) y mayores de C-HDL ( $p=0.004$ ). El género *Christensenellaceae* se ha relacionado de forma inversa con el IMC en diferentes poblaciones, incluidos niños mexicanos (Goodrich et al., 2014; López-Contreras et al., 2018). Dado que el aumento del IMC se asocia con la dislipidemia, se podría esperar que la abundancia disminuida de *Christensenellaceae* en los pacientes con dislipidemia fuera dependiente del IMC (Waters et al., 2019). Sin embargo, observamos que la asociación de *Christensenellaceae* con la dislipidemia aterogénica se mantuvo significativa después de ajustar para el IMC, lo que sugiere que esta asociación podría ser independiente de la varianza en el IMC. Por último, el género *Odoribacter* se asoció en la cohorte LifeLines-DEEP con una concentración más baja de TG ( $p=0.001$ ) (Fu et al., 2015). Además, este género se asoció con un perfil lipídico sérico saludable en una cohorte independiente de mujeres europeas con obesidad (Brahe et al., 2015). En nuestro estudio, la asociación de *Odoribacter* con un perfil

lipídico saludable perdió significancia después de ajustar por el IMC. Esto concuerda con un estudio previo, en el que la abundancia de *Odoribacter* se asoció inversamente con la obesidad en niños mexicanos (López-Contreras et al., 2018). Es de llamar la atención que *Odoribacter* también es una bacteria productora de SCFA, la cual de manera conjunta con *Akkermansia*, otro género productor de SCFA, se ha asociado con un perfil de lípidos séricos saludable (Brahe et al., 2015; Fu et al., 2015).

Aunado a los géneros mencionados, los sujetos controles también presentaron una mayor abundancia de los géneros [*Eubacterium*] (*eligens* y *xylanophilum*), *Ruminococcaceae*, [*Ruminococcus*] *gnavreuii*, *Ruminiclostridium* y *Blautia*, todos ellos conocidos por ser productores de distintos tipos de SCFA (Martin-Gallausiaux et al., 2021). Aunque la predicción funcional de la microbiota intestinal no identificó un enriquecimiento de alguna vía metabólica directamente relacionada con la biosíntesis de SCFA, nuestros resultados sugieren que las bacterias productoras de estos tipos de ácidos grasos, podría participar disminuyendo el riesgo de dislipidemia aterogénica, a través de la generación de estos metabolitos.

En modelos murinos y de tejido adiposo humano, la suplementación de los tres SCFA, de forma individual o en una mezcla, se ha asociado con una mayor oxidación de ácidos grasos y una menor lipogénesis *de novo* y, por lo tanto, una concentración circulante menor de TG (Shah et al., 2021). No obstante, se ha reportado que los efectos benéficos de los SCFA exógenos en el metabolismo lipídico varía dependiendo de la vía de administración. Asimismo, se han encontrado diferencias en la respuesta a la suplementación de SCFA respecto a la especie

hospedera evaluada. A este respecto, las incongruencias halladas entre roedores y humanos, se han atribuido a las características anatómicas y fisiológicas, pero también respecto a la composición de su microbiota, por lo que se podrían estar observando diferentes respuestas metabólicas a los SCFA (Kong, et al., 2021). En este sentido, el uso terapéutico de SCFA para la mejora del perfil lipídico sigue siendo desafiante y requiere mayor estudio.

En contraste con los resultados del grupo de control, ninguno de los géneros con mayor abundancia en los sujetos con dislipidemia aterogénica, son bacterias conocidas como productoras de SCFA. Los pacientes con dislipidemia presentaron una disbiosis de la microbiota intestinal caracterizada por reducción de la riqueza y la diversidad microbiana, en comparación con los sujetos controles. Además, de los 6 géneros que mostraron mayor abundancia en los pacientes con dislipidemia, el género *Escherichia-Shigella* presentó el puntaje LDA más elevado. De manera interesante, la mayor abundancia de *Escherichia coli* se ha asociado con una concentración más alta de TG (Moreno-Indias et al., 2015) y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (Zhu et al., 2013). Se ha sugerido que *Escherichia-Shigella* aumenta la permeabilidad intestinal en los humanos, debido a que incrementa los niveles de LPS en la luz intestinal (Cani et al., 2007; Pedersen et al., 2018). Esto concuerda con los resultados de nuestra predicción funcional, en los que se observa un enriquecimiento de las vías de biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) y del Kdo2-Lípido A, el principal componente de los LPS, en los pacientes con dislipidemia aterogénica. Además, la administración de LPS en modelos animales genera hipertrigliceridemia, al aumentar la síntesis hepática de ácidos grasos y la



lipólisis del tejido adiposo, mientras que suprime la oxidación de ácidos grasos (Feingold et al., 1993).

Adicionalmente, en los sujetos con dislipidemia se identificó el enriquecimiento de vías de biosíntesis de menaquinonas (MK) o vitamina K2. En estudios observacionales y prospectivos se ha reportado una relación inversa entre la ingesta de vitamina K2, principalmente a partir de alimentos fermentados, y el riesgo cardiovascular (Bellinze et al., 2021). A este respecto, la dieta es la principal fuente de vitamina K2 funcionalmente disponible (Theuwissen et al., 2014), ya que, pese a que la microbiota intestinal posee la capacidad de sintetizar grandes cantidades de estas moléculas, la biodisponibilidad de las MK bacterianas es limitada (Shaerer et al., 2008). Por tanto, el incremento predicho de la biosíntesis microbiana de MK en los sujetos con dislipidemia podría no estar relacionada con los mecanismos involucrados en el riesgo cardiovascular pero sí con el mantenimiento de la comunidad bacteriana, ya que particularmente se ha descrito que *Escherichia-Shigella* tiene la capacidad de sintetizar y liberar algunas formas de MK, las cuales a su vez sirven como factores de crecimiento para el desarrollo de diversos géneros bacterianos (Fenn et al., 2017).

De manera interesante, la abundancia de *Escherichia-Shigella* se incrementa tras la cirugía bariátrica de RYGB, sin evidencias de efectos perjudiciales para el huésped (Graessler et al., 2013). Sin embargo, en el estudio de Steinert y col. (2020) se observó que la abundancia de *Escherichia-Shigella* correlaciona significativamente con el aumento de la concentración de colesterol LDL después de 3 meses de realizada la cirugía de RYGB (Steinert et al., 2020). En nuestro

estudio, la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella* aumentó significativamente después de la RYGB y se correlacionó positivamente con la concentración de TG y negativamente con la concentración de C-HDL, sin alcanzar significancia estadística con ninguno. Dada la potencial relevancia de esta bacteria para el desarrollo de dislipidemia, se necesitan más estudios con un seguimiento a largo plazo para evaluar si el aumento de la abundancia de este género después de la cirugía bariátrica, es metabólicamente perjudicial para el huésped.

Otro de los géneros aumentados en los pacientes con dislipidemia fue *Fusobacterium*, el cual presentó una correlación negativa con la concentración de C-HDL antes de la cirugía bariátrica. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que presentan una mayor abundancia de este género en sujetos con obesidad, hipertrigliceridemia y DT2 (Kim et al., 2020; Sedighi et al., 2017; Yun et al., 2020). Aunque no se ha precisado el mecanismo a través del cual este género podría participar en el desarrollo de complicaciones metabólicas, varios estudios sugieren que está implicado en procesos inflamatorios, posiblemente alterando la permeabilidad de la barrera intestinal (Gurung et al., 2020). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el incremento de la abundancia de *Fusobacterium* podría relacionarse con la alteración del metabolismo lipídico.

La interrupción de la integridad de la barrera intestinal se ha asociado con la presencia de dislipidemia. A este respecto, en los sujetos control se identificaron vías relacionadas con la biosíntesis de precursores de ácidos nucleótidos, tales como el aminoimidazol, que provee una fuente exógena de purinas que pueden ser aprovechadas por la mucosa intestinal para la síntesis de nucleótidos, promover el

balance energético y mantener la integridad de la barrera intestinal (Lee et al., 2020). Adicionalmente, se observó el enriquecimiento de vías relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos ramificados (BCAA). Se ha descrito a partir de estudios en humanos y modelos animales que la microbiota intestinal es capaz de llevar a cabo la síntesis, captación, transporte y degradación de BCAA (Liu et al., 2020). A su vez, se ha reportado que estos aminoácidos juegan un papel esencial en la regulación fisiológica de la señalización de la insulina (Gojda & Cahova, 2021) y más recientemente, se ha sugerido que podrían estar involucrados en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, proliferación celular y desarrollo de inmunidad (Zhou et al., 2018).

De todos los macronutrientes evaluados, la ingesta de PUFA y la relación PUFA/SFA fueron los únicos significativamente menores en los sujetos con dislipidemia. La disminución en la ingesta de estos lípidos se ha descrito previamente tanto para la dislipidemia, como para otras enfermedades metabólicas (Buckley et al., 2010). Aunque se sabe que los factores dietarios modulan la composición de la microbiota intestinal, solo cuatro de los 26 géneros analizados se asociaron significativamente con el cociente PUFA/SFA, incluyendo *Akkermansia*, *Ruminiclostridium 6*, *Hydrogenoanaerobacterium* y *Odoribacter*. Esto sugiere que otros factores externos, además de la dieta, así como factores relacionados con el hospedero, como la variación genética, también pueden modular la composición de la microbiota intestinal (Granado-Serrano et al., 2019). Particularmente, se ha descrito que la abundancia de los géneros *Christensenellaceae* y *Odoribacter*, aumentados en los sujetos controles, son altamente heredable en distintas

poblaciones (Goodrich et al., 2014; Lim et al., 2017). Debido a que la población mexicana tiene una alta prevalencia de dislipidemia aterogénica y una estructura genética que confiere un mayor riesgo para presentar dislipidemias (León-Mimila et al., 2021), se requieren estudios que analicen la relación entre la variación genética, la composición de la microbiota y la presencia de dislipidemias en esta población.

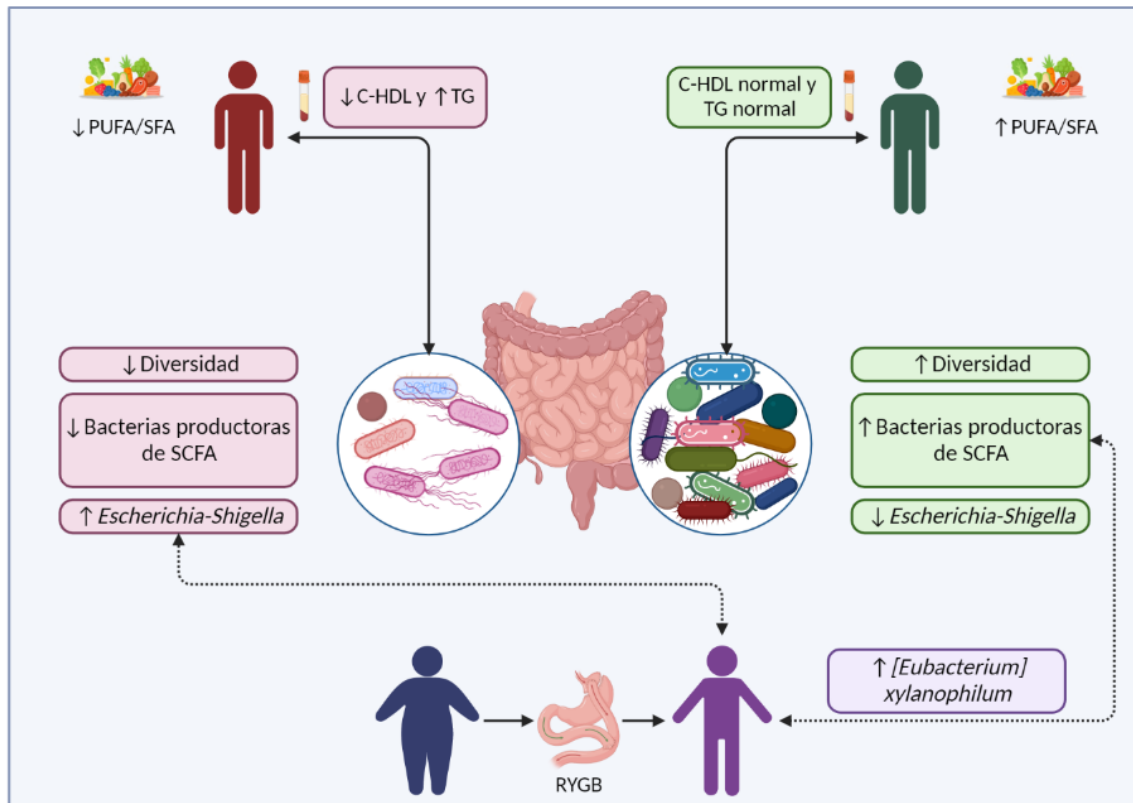
Se ha descrito que la cirugía bariátrica de RYGB incrementa la diversidad microbiana y provoca cambios significativos en la composición de la microbiota que podrían relacionarse con las mejorías metabólicas (Furet et al., 2010; Shen et al., 2019). Sin embargo, en el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de la diversidad alfa después de la intervención. Respecto a los géneros enriquecidos en los pacientes con dislipidemia previo al RYGB, ninguno de éstos correlacionó significativamente con las concentraciones del C-HDL y TG. No obstante, estudios en humanos han reportado la asociación de *[Ruminococcus] torques group* con concentraciones elevadas de TG, CT y VLDLs (Hintikka et al., 2022; Rajilic-Stojanovic et al., 2014). Esto es consistente con una mayor abundancia relativa de este género en los pacientes con dislipidemia, en comparación con aquellos sin dicho fenotipo.

Por otra parte, sólo 2 géneros productores de SCFA que se encontraron disminuidos en los pacientes con dislipidemia, se asociaron significativamente con las concentraciones de lípidos: *[Eubacterium] eligens* correlacionado positivamente con C-HDL y *[Eubacterium] xylanophilum* correlacionado negativamente con TG, después de un año de realizada la cirugía bariátrica. Es de llamar la atención, que *[Eubacterium] eligens* ha sido previamente asociado con una concentración menor

de TG (Nie et al., 2020). Aunado a ello, *[Eubacterium] xylanophilum* ha sido asociado con menor peso corporal y una concentración menor de CT (Wei et al., 2021). *[Eubacterium] xylanophilum* es una bacteria productora de butirato en el intestino, el cual aumenta después de la cirugía por RYGB tanto en humanos como en modelos murinos (Liou et al., 2013). Se ha sugerido que el efecto benéfico del butirato, en casos de obesidad inducida por dieta o de riesgo de aterosclerosis, está mediado por la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo los lípidos y glucosa (Amiri et al., 2021; Lin et al., 2012). Aunque la abundancia de estos géneros aumentó después de la cirugía en los pacientes con dislipidemia, sólo *[Eubacterium] xylanophilum* fue significativamente más abundante. Se requieren de estudios adicionales para evaluar si estos géneros productores de SCFA, tienen una participación relevante en la mejora del perfil lipídico después de la cirugía por RYGB.

Se deben reconocer algunas limitaciones del estudio. En primer lugar, se trata de un estudio transversal que no permite establecer una relación causal entre los géneros identificados y la dislipidemia. Debido a que utilizamos la secuenciación de algunas regiones de gen 16S rRNA, se requiere la secuenciación del metagenoma bacteriano para identificar las especies y las vías metabólicas asociadas con la dislipidemia aterogénica. Además, no se determinaron metabolitos de la microbiota intestinal con un posible papel en los mecanismos relacionados con la dislipidemia, como los SCFA y los LPS; aunado a ello, no se determinó la ingesta de PUFA/SFA en los sujetos con obesidad sometidos a cirugía bariátrica. Por último, dado que sólo se incluyeron 20 pacientes sometidos a RYGB, las asociaciones con los perfiles

lipídicos identificadas en los pacientes sometidos a RYGB deben confirmarse en un número mayor de sujetos.



**Figura 19. Resumen de los principales hallazgos en la caracterización de la microbiota intestinal asociada con la dislipidemia aterogénica.** Creado con BioRender.com. C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; RYGB: bypass gástrico en Y de Roux; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados; SCFA: ácidos grasos de cadena corta.

Respecto a los géneros enriquecidos en los sujetos con dislipidemia sometidos a RYGB, *Megamonas* se encontró enriquecido previo a la cirugía, lo cual es consistente con una mayor abundancia reportada en sujetos con obesidad y dislipidemia (Jin et al., 2021; Miyajima et al., 2022; Palmas et al., 2021). Además, después del RYGB, la abundancia de *Enterococcus*, *Mogibacterium* y *Butyrivibrio*

se encontró aumentada en los sujetos con dislipidemia. Se ha descrito el uso de algunas especies y cepas de *Enterococcus* como probióticos para disminuir las concentraciones circulantes de CT y TG, mientras que *Butyrivibrio* es un productor de butirato y CLA asociado con la mejoría del perfil lipídico en modelo murino (Hussain et al., 2016; Sun et al., 2022; Wang et al., 2020; Yang et al., 2021).

## 9. Conclusiones

En los sujetos con dislipidemia aterogénica se observó una menor diversidad de la microbiota intestinal; así como un incremento en la abundancia de bacterias patógenas productoras de LPS, tales como *Escherichia-Shigella*, las cuales podrían contribuir a la alteración de la permeabilidad en la barrera intestinal. En contraste, se encontró que las bacterias productoras de SCFA fueron significativamente más abundantes en el grupo control, por lo que la deficiencia de estas bacterias podría relacionarse con el desarrollo de dislipidemia. Aun cuando se observó una ingesta disminuida de PUFA en los sujetos con dislipidemia, así como un cociente PUFA/SFA desfavorable, no se obtuvieron resultados que indicaran la participación de la microbiota intestinal como intermediaria en su metabolismo, así como su relación con la variación del metabolismo lipídico. Finalmente, la asociación de algunos géneros bacterianos (productores de SCFA) con la mejoría de los parámetros lipídicos, después de realizada la cirugía de RYGB, sugiere la participación de la microbiota intestinal como un posible mecanismo para la mejoría del perfil lipídico.



## **10. Perspectivas**

Con base en los hallazgos del presente trabajo, se proponen como perspectivas la realización de determinaciones de SCFA y LPS, tanto en materia fecal como en circulación, para determinar si la abundancia de estos metabolitos producidos por la microbiota intestinal se relaciona con la presencia de dislipidemia aterogénica. Además, se considera importante confirmar la predicción de las vías metabólicas enriquecidas en la microbiota intestinal mediante la cuantificación de la expresión de los genes bacterianos participantes en estas vías. Por último, la dislipidemia aterogénica, así como la microbiota intestinal pueden estar influidos por factores inherentes al hospedero, como la genética. A este respecto, resulta relevante analizar la relación de variantes genéticas, la expresión génica hepática, intestinal y del tejido adiposo del hospedero, principalmente, de los genes relacionados con el metabolismo lipídico.

## 11. Referencias

Adams, T. D., Davidson, L. E., Litwin, S. E., Kim, J., Kolotkin, R. L., Nanjee, M. N., Gutierrez, J. M., Frogley, S. J., Ibele, A. R., Brinton, E. A., Hopkins, P. N., McKinlay, R., Simper, S. C., & Hunt, S. C. (2017). Weight and Metabolic Outcomes 12 Years after Gastric Bypass. *The New England Journal of Medicine*, 377(12), 1143–1155. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1700459>

Aday, A. W., & Everett, B. M. (2019). Dyslipidemia Profiles in Patients with Peripheral Artery Disease. *Curr Cardiol Rep*, 21(6), 42. <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1129-5>

Aguilar-Salinas, C. A., Olaiz, G., Valles, V., Torres, J. M., Gómez Pérez, F. J., Rull, J. A., . . . Sepulveda, J. (2001). High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res*, 42(8), 1298-1307.

Agus, A., Clément, K., & Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*, 70(6), 1174-1182. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323071>

Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(7), 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>

American Diabetes Association. (s/f). *Standards of Medical Care in Diabetes—2019 Abridged for Primary Care Providers | Clinical Diabetes | American Diabetes Association*. Recuperado el 2 de septiembre de 2022, de <https://diabetesjournals.org/clinical/article/37/1/11/32671/Standards-of-Medical-Care-in-Diabetes-2019>

Amiri, P., Hosseini, S. A., Ghaffari, S., Tutunchi, H., Mosharkesh, E., Asghari, S., & Roshanravan, N. (2021). Role of Butyrate, a Gut Microbiota Derived Metabolite, in Cardiovascular Diseases: A comprehensive narrative review. *Front Pharmacol*, 12, 837509. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.837509>

Ballantyne, C. M., Olsson, A. G., Cook, T. J., Mercuri, M. F., Pedersen, T. R., & Kjekshus, J. (2001). Influence of low high-density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on coronary heart disease events and response to simvastatin therapy in 4S. *Circulation*, 104(25), 3046-3051. <https://doi.org/10.1161/hc5001.100624>

Bamba, V., & Rader, D. J. (2007). Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology*, 132(6), 2181-2190. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.056>

Banasiewicz, T., Domagalska, D., Borycka-Kiciak, K., & Rydzewska, G. (2020). Determination of butyric acid dosage based on clinical and experimental studies - a literature review. *Przegląd gastroenterologiczny*, 15(2), 119–125. <https://doi.org/10.5114/pg.2020.95556>

Bellinge, J. W., Dalgaard, F., Murray, K., Connolly, E., Blekkenhorst, L. C., Bondonno, C. P., Lewis, J. R., Sim, M., Croft, K. D., Gislason, G., Torp-Pedersen, C., Tjønneland, A., Overvad, K., Hodgson, J. M., Schultz, C., & Bondonno, N. P. (2021). Vitamin K Intake and Atherosclerotic Cardiovascular Disease in the Danish Diet Cancer and Health Study. *Journal of the American Heart Association*, 10(16), e020551. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.020551>

Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22, 505–531. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.021302.121842>

Bloemen, J. G., Olde Damink, S. W. M., Venema, K., Buurman, W. A., Jalan, R., & Dejong, C. H. C. (2010). Short chain fatty acids exchange: Is the cirrhotic, dysfunctional liver still able to clear them? *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 29(3), 365–369. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.10.002>

Bloemen, J. G., Venema, K., van de Poll, M. C., Olde Damink, S. W., Buurman, W. A., & Dejong, C. H. (2009). Short chain fatty acids exchange across the gut and

liver in humans measured at surgery. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 28(6), 657–661. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.05.011>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., . . . Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Brahe, L. K., Le Chatelier, E., Prifti, E., Pons, N., Kennedy, S., Hansen, T., . . . Larsen, L. H. (2015). Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. *Nutr Diabetes*, 5, e159. <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.9>

Brown, J. M., & McIntosh, M. K. (2003). Conjugated linoleic acid in humans: Regulation of adiposity and insulin sensitivity. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3041–3046. <https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3041>

Brown, T. M., & Bittner, V. (2008). Biomarkers of atherosclerosis: clinical applications. *Curr Cardiol Rep*, 10(6), 497-504. <https://doi.org/10.1007/s11886-008-0078-1>

Brunham, L. R., & Hayden, M. R. (2015). Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. *Progress in Lipid Research*, 58, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.01.001>

Buckley, J. D., & Howe, P. R. (2010). Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity—a review. *Nutrients*, 2(12), 1212-1230. <https://doi.org/10.3390/nu2121212>

Burdge, G. C. (2018). Chapter 2—Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis and Metabolism in Adult Mammals. En G. C. Burdge (Ed.), *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism* (pp. 15–30). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811230-4.00002-8>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., . . . Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>

Capuano, E., Oliviero, T., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2018). Role of the food matrix and digestion on calculation of the actual energy content of food. *Nutr Rev*, 76(4), 274-289. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux072>

Carroll, M., Kit, B., & Lacher, D. (2015). Trends in elevated triglyceride in adults: United States, 2001-2012. *NCHS Data Brief*(198), 198.

Caselli, C., De Caterina, R., Smit, J. M., Campolo, J., El Mahdiui, M., Ragusa, R., . . . SMARTool, E. a. (2021). Triglycerides and low HDL cholesterol predict coronary heart disease risk in patients with stable angina. *Sci Rep*, 11(1), 20714. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00020-3>

Caspi, R., Billington, R., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., . . . Karp, P. D. (2018). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D633-D639. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx935>

Chahal-Kummen, M., Salte, O., Hewitt, S., Blom-Høgestøl, I. K., Risstad, H., Kristinsson, J., & Mala, T. (2020). Health benefits and risks during 10 years after Roux-en-Y gastric bypass. *Surgical endoscopy*, 34(12), 5368–5376. <https://doi.org/10.1007/s00464-019-07328-2>

Chaplin, A., Parra, P., Serra, F., & Palou, A. (2015). Conjugated Linoleic Acid Supplementation under a High-Fat Diet Modulates Stomach Protein Expression and Intestinal Microbiota in Adult Mice. *PloS One*, 10(4), e0125091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125091>

Chawla, S., Tessarolo Silva, F., Amaral Medeiros, S., Mekary, R. A., & Radenkovic, D. (2020). The Effect of Low-Fat and Low-Carbohydrate Diets on Weight Loss and Lipid Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 12(12), E3774. <https://doi.org/10.3390/nu12123774>

Cheng, C.-F., Ku, H.-C., & Lin, H. (2018). PGC-1 $\alpha$  as a Pivotal Factor in Lipid and Metabolic Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), E3447. <https://doi.org/10.3390/ijms19113447>

Clifton, P. M. (2019). Diet, exercise and weight loss and dyslipidaemia. *Pathology*, 51(2), 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.10.013>

Costabile, A., Klinder, A., Fava, F., Napolitano, A., Fogliano, V., Leonard, C., Gibson, G. R., & Tuohy, K. M. (2008). Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: A double-blind, placebo-controlled, crossover study. *The British Journal of Nutrition*, 99(1), 110–120. <https://doi.org/10.1017/S0007114507793923>

Cronin, P., Joyce, S. A., O'Toole, P. W., & O'Connor, E. M. (2021). Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients*, 13(5), 1655. <https://doi.org/10.3390/nu13051655>

Davies, N. K., O'Sullivan, J. M., Plank, L. D., & Murphy, R. (2019). Altered gut microbiome after bariatric surgery and its association with metabolic benefits: A systematic review. *Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery*, 15(4), 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2019.01.033>

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

Denova-Gutiérrez, E., Flores, Y. N., Gallegos-Carrillo, K., Ramírez-Palacios, P., Rivera-Paredes, B., Muñoz-Aguirre, P., . . . Salmerón, J. (2016). Health workers

cohort study: methods and study design. *Salud Publica Mex*, 58(6), 708-716. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i6.8299>

Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). Akkermansia muciniphila gen. Nov., sp. Nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>

Di Angelantonio, E., Sarwar, N., Perry, P., Kaptoge, S., Ray, K. K., Thompson, A., . . . Collaboration, E. R. F. (2009). Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*, 302(18), 1993-2000. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1619>

Dias, C. B., Garg, R., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2014). Saturated fat consumption may not be the main cause of increased blood lipid levels. *Medical Hypotheses*, 82(2), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.11.036>

Dilzer A, Park Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52:488–513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.501409>

Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., . . . Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol*, 38(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>

Druart, C., Neyrinck, A. M., Vlaeminck, B., Fievez, V., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2014). Role of the lower and upper intestine in the production and absorption of gut microbiota-derived PUFA metabolites. *PloS One*, 9(1), e87560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087560>

Eid N, Enani S, Walton G, Corona G, Costabile A, Gibson G, et al. The impact of date palm fruits and their component polyphenols, on gut microbial ecology, bacterial metabolites and colon cancer cell proliferation. *J Nutr Sci*. 2014;3:e46. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.16>

Elder, S. J., Lichtenstein, A. H., Pittas, A. G., Roberts, S. B., Fuss, P. J., Greenberg, A. S., McCrory, M. A., Bouchard, T. J., Saltzman, E., & Neale, M. C. (2009). Genetic and environmental influences on factors associated with cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research*, 50(9), 1917–1926. <https://doi.org/10.1194/jlr.P900033-JLR200>

Farin, W., Oñate, F. P., Plassais, J., Bonny, C., Beglinger, C., Woelnerhanssen, B., Nocca, D., Magoules, F., Le Chatelier, E., Pons, N., Cervino, A. C. L., & Ehrlich, S. D. (2020). Impact of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on gut microbiota: A metagenomic comparative analysis. *Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery*, 16(7), 852–862. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2020.03.014>

Feingold, K. R., Hardardottir, I., Memon, R., Krul, E. J., Moser, A. H., Taylor, J. M., & Grunfeld, C. (1993). Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *J Lipid Res*, 34(12), 2147–2158.

Feingold, K. R. (2021). Introduction to Lipids and Lipoproteins. En *Endotext [Internet]*. MDText.com, Inc. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>

Fenn, K., Strandwitz, P., Stewart, E. J., Dimise, E., Rubin, S., Gurubacharya, S., Clardy, J., & Lewis, K. (2017). Quinones are growth factors for the human gut microbiota. *Microbiome*, 5(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0380-5>

Finotello, F., Mastorilli, E., & Di Camillo, B. (2018). Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Briefings in bioinformatics*, 19(4), 679–692. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw119>

Fruchart, J. C., Sacks, F., Hermans, M. P., Assmann, G., Brown, W. V., Ceska, R., . . . Zimmet, P. (2008). The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol*, 102(10 Suppl), 1K-34K. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(08\)01833-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(08)01833-X)



Fu, J., Bonder, M. J., Cenit, M. C., Tigchelaar, E. F., Maatman, A., Dekens, J. A., . . . Zhernakova, A. (2015). The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids. *Circ Res*, 117(9), 817-824. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306807>

Furet, J. P., Kong, L. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., . . . Clément, K. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*, 59(12), 3049-3057. <https://doi.org/10.2337/db10-0253>

Gérard, P. (2020). The crosstalk between the gut microbiota and lipids. *Microbiota, Nutrition and Lipids: consequences on Health*, 70(7). <https://doi.org/10.1051/ocl/2020070>

Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., & Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: Implications for metabolic disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 367–417. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2009>

Gojda, J., & Cahova, M. (2021). Gut Microbiota as the Link between Elevated BCAA Serum Levels and Insulin Resistance. *Biomolecules*, 11(10), 1414. <https://doi.org/10.3390/biom11101414>

Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., . . . Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789-799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>

Graessler, J., Qin, Y., Zhong, H., Zhang, J., Licinio, J., Wong, M. L., . . . Bornstein, S. R. (2013). Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J*, 13(6), 514-522. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.43>

Granado-Serrano, A. B., Martín-Garí, M., Sánchez, V., Riart Solans, M., Berdún, R., Ludwig, I. A., . . . Serrano, J. C. E. (2019). Faecal bacterial and short-chain fatty

acids signature in hypercholesterolemia. *Sci Rep*, 9(1), 1772. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38874-3>

Granlund, L., Juvet, L. K., Pedersen, J. I., & Nebb, H. I. (2003). Trans10, cis12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPARgamma modulator. *Journal of Lipid Research*, 44(8), 1441–1452. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300120-JLR200>

Guimarães, M., Osório, C., Silva, D., Almeida, R. F., Reis, A., Cardoso, S., Pereira, S. S., Monteiro, M. P., & Nora, M. (2021). How Sustained is Roux-en-Y Gastric Bypass Long-term Efficacy? : Roux-en-Y Gastric Bypass efficacy. *Obesity surgery*, 31(8), 3623–3629. <https://doi.org/10.1007/s11695-021-05458-y>

Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., & Shulzhenko, N. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, 51, 102590. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>

He, A., Chen, X., Tan, M., Chen, Y., Lu, D., Zhang, X., Dean, J. M., Razani, B., & Lodhi, I. J. (2020). Acetyl-CoA Derived from Hepatic Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation Inhibits Autophagy and Promotes Steatosis via mTORC1 Activation. *Molecular cell*, 79(1), 30–42.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.007>

He, B., Piao, D., Yu, C., Wang, Y., & Han, P. (2013). Amelioration in hepatic insulin sensitivity by reduced hepatic lipid accumulation at short-term after Roux-en-Y gastric bypass surgery in type 2 diabetic rats. *Obesity surgery*, 23(12), 2033–2041. <https://doi.org/10.1007/s11695-013-0997-9>

Heeren, J., & Scheja, L. (2021). Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Molecular metabolism*, 50, 101238. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238>

Heffron, S. P., Parikh, A., Volodarskiy, A., Ren-Fielding, C., Schwartzbard, A., Nicholson, J., & Bangalore, S. (2016). Changes in Lipid Profile of Obese Patients

Following Contemporary Bariatric Surgery: A Meta-Analysis. *The American journal of medicine*, 129(9), 952–959. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.02.004>

Heller, D. A., de Faire, U., Pedersen, N. L., Dahlén, G., & McClearn, G. E. (1993). Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *The New England Journal of Medicine*, 328(16), 1150–1156. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304223281603>

Hernández-Alcaraz, C., Aguilar-Salinas, C. A., Mendoza-Herrera, K., Pedroza-Tobías, A., Villalpando, S., Shamah-Levy, T., . . . Barquera, S. (2020). Dyslipidemia prevalence, awareness, treatment and control in Mexico: results of the Ensanut 2012. *Salud Publica Mex*, 62(2), 137-146. <https://doi.org/10.21149/10520>

Hernández-Avila, M., Romieu, I., Parra, S., Hernández-Avila, J., Madrigal, H., & Willett, W. (1998). Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico City. *Salud Publica Mex*, 40(2), 133-140. <https://doi.org/10.1590/s0036-36341998000200005>

Hesse, D., Jaschke, A., Chung, B., & Schürmann, A. (2013). Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Bioscience Reports*, 33(1), 1–9. <https://doi.org/10.1042/BSR20120082>

Hintikka, J. E., Munukka, E., Valtonen, M., Luoto, R., Ihalainen, J. K., Kallonen, T., Waris, M., Heinonen, O. J., Ruuskanen, O., & Pekkala, S. (2022). Gut Microbiota and Serum Metabolome in Elite Cross-Country Skiers: A Controlled Study. *Metabolites*, 12(4), 335. <https://doi.org/10.3390/metabo12040335>

Hoshino, T., Ishizuka, K., Toi, S., Mizuno, T., Nishimura, A., Takahashi, S., Wako, S., & Kitagawa, K. (2022). Atherogenic Dyslipidemia and Residual Vascular Risk After Stroke or Transient Ischemic Attack. *Stroke*, 53(1), 79–86. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.034593>

Hussain, M. M., Shi, J., & Dreizen, P. (2003). Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *Journal of Lipid Research*, 44(1), 22–32. <https://doi.org/10.1194/jlr.r200014-jlr200>

Hussain, S., Srivastava, A., Tyagi, A., Shandilya, U. K., Kumar, A., Kumar, S., Panwar, S., & Tyagi, A. K. (2016). Characterization of CLA-producing *Butyrivibrio* spp. reveals strain-specific variations. *3 Biotech*, 6(1), 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0401-2>

Jain, R. B., & Ducatman, A. (2018). Associations between smoking and lipid/lipoprotein concentrations among US adults aged  $\geq 20$  years. *Journal of Circulating Biomarkers*, 7, 1849454418779310. <https://doi.org/10.1177/1849454418779310>

Jaschke, A., Chung, B., Hesse, D., Kluge, R., Zahn, C., Moser, M., Petzke, K.-J., Brigelius-Flohé, R., Puchkov, D., Koepsell, H., Heeren, J., Joost, H.-G., & Schürmann, A. (2012). The GTPase ARFRP1 controls the lipidation of chylomicrons in the Golgi of the intestinal epithelium. *Human Molecular Genetics*, 21(14), 3128–3142. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds140>

Jin, J., Cheng, R., Ren, Y., Shen, X., Wang, J., Xue, Y., Zhang, H., Jia, X., Li, T., He, F., & Tian, H. (2021). Distinctive Gut Microbiota in Patients with Overweight and Obesity with Dyslipidemia and its Responses to Long-term Orlistat and Ezetimibe Intervention: A Randomized Controlled Open-label Trial. *Frontiers in pharmacology*, 12, 732541. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.732541>

Johnson, A. J., Zheng, J. J., Kang, J. W., Saboe, A., Knights, D., & Zivkovic, A. M. (2020). A Guide to Diet-Microbiome Study Design. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.00079>

Jump, D. B. (2011). Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(2), 115–120. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328342991c>

Kathiresan, S., Manning, A. K., Demissie, S., D'Agostino, R. B., Surti, A., Guiducci, C., Gianniny, L., Burt, N. P., Melander, O., Orho-Melander, M., Arnett, D. K., Peloso, G. M., Ordovas, J. M., & Cupples, L. A. (2007). A genome-wide

association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study. *BMC Medical Genetics*, 8 Suppl 1, S17. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-S1-S17>

Katoh, K., & Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform*, 9(4), 286-298. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn013>

Kassambara, A. (2020). ggpubr: “ggplot2” based publication ready plots. <https://CRAN-R-project.org/package=ggpubr>

Kazantseva, J., Malv, E., Kaleda, A., Kallastu, A., & Meikas, A. (2021). Optimisation of sample storage and DNA extraction for human gut microbiota studies. *BMC microbiology*, 21(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02233-y>

Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>

Kim, M. H., Yun, K. E., Kim, J., Park, E., Chang, Y., Ryu, S., . . . Kim, H. N. (2020). Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. *Sci Rep*, 10(1), 19417. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76474-8>

Kim, Y. j., & Liu, R. h. (2002). Increase of Conjugated Linoleic Acid Content in Milk by Fermentation with Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science*, 67(5), 1731–1737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08714.x>

Kindt, A., Liebisch, G., Clavel, T., Haller, D., Hörmannspenger, G., Yoon, H., Kolmeder, D., Sigrüener, A., Krautbauer, S., Seeliger, C., Ganzha, A., Schweizer, S., Morisset, R., Strowig, T., Daniel, H., Helm, D., Küster, B., Krumsiek, J., & Ecker, J. (2018). The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice. *Nature communications*, 9(1), 3760. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05767-4>

Ko, C. W., Qu, J., Black, D. D., & Tso, P. (2020). Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 17(3), 169–183. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0250-7>

Kong, L.-C., Tap, J., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Zucker, J.-D., Doré, J., & Clément, K. (2013). Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: Increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1), 16–24. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.058743>

Kong, D., Schipper, L., & van Dijk, G. (2021). Distinct Effects of Short Chain Fatty Acids on Host Energy Balance and Fuel Homeostasis With Focus on Route of Administration and Host Species. *Frontiers in neuroscience*, 15, 755845. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.755845>

Kriss, M., Hazleton, K. Z., Nusbacher, N. M., Martin, C. G., & Lozupone, C. A. (2018). Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Current opinion in microbiology*, 44, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.003>

Kumari, A., Kristensen, K. K., Ploug, M., & Winther, A.-M. L. (2021). The Importance of Lipoprotein Lipase Regulation in Atherosclerosis. *Biomedicines*, 9(7), 782. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070782>

Lau, E., Belda, E., Picq, P., Carvalho, D., Ferreira-Magalhães, M., Silva, M. M., Barroso, I., Correia, F., Vaz, C. P., Miranda, I., Barbosa, A., Clément, K., Doré, J., Freitas, P., & Prifti, E. (2021). Gut microbiota changes after metabolic surgery in adult diabetic patients with mild obesity: a randomised controlled trial. *Diabetology & metabolic syndrome*, 13(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00672-1>

Le Roy, T., Lécuyer, E., Chassaing, B., Rhimi, M., Lhomme, M., Boudebbouze, S., . . . Lesnik, P. (2019). The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis. *BMC Biol*, 17(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0715-8>

Lee, J. S., Wang, R. X., Goldberg, M. S., Clifford, G. P., Kao, D. J., & Colgan, S. P. (2020). Microbiota-Sourced Purines Support Wound Healing and Mucous Barrier Function. *iScience*, 23(6), 101226. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101226>

Leeming, E. R., Johnson, A. J., Spector, T. D., & Le Roy, C. I. (2019). Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients*, 11(12), E2862. <https://doi.org/10.3390/nu11122862>

Lehnen, T. E., da Silva, M. R., Camacho, A., Marcadenti, A., & Lehnen, A. M. (2015). A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12, 36. <https://doi.org/10.1186/s12970-015-0097-4>

León-Mimila, P., Villamil-Ramírez, H., Macías-Kauffer, L. R., Jacobo-Albavera, L., López-Contreras, B. E., Posadas-Sánchez, R., Posadas-Romero, C., Romero-Hidalgo, S., Morán-Ramos, S., Domínguez-Pérez, M., Olivares-Arevalo, M., López-Montoya, P., Nieto-Guerra, R., Acuña-Alonzo, V., Macín-Pérez, G., Barquera-Lozano, R., Del-Río-Navarro, B. E., González-González, I., Campos-Pérez, F., Gómez-Pérez, F., ... Canizales-Quinteros, S. (2021). Genome-Wide Association Study Identifies a Functional *SIDT2* Variant Associated With HDL-C (High-Density Lipoprotein Cholesterol) Levels and Premature Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 41(9), 2494–2508. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315391>

Liao, Y.-Y., Chu, C., Wang, Y., Zheng, W.-L., Ma, Q., Hu, J.-W., Yan, Y., Wang, K.-K., Yuan, Y., Chen, C., & Mu, J.-J. (2021). Association of body mass index changes from childhood to adulthood with dyslipidemia in adults: Hanzhong adolescent cohort study. *Journal of Public Health (Oxford, England)*, 43(4), 780–788. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdaa108>

Lim, M. Y., You, H. J., Yoon, H. S., Kwon, B., Lee, J. Y., Lee, S., . . . Ko, G. (2017). The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*, 66(6), 1031-1038. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311326>

Lim, M. Y., Song, E. J., Kim, S. H., Lee, J., & Nam, Y. D. (2018). Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Systematic and applied microbiology*, 41(2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.008>

Lin, H. V., Frassetto, A., Kowalik, E. J., Nawrocki, A. R., Lu, M. M., Kosinski, J. R., . . . Marsh, D. J. (2012). Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*, 7(4), e35240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035240>

Liou, A. P., Paziuk, M., Luevano, J. M., Machineni, S., Turnbaugh, P. J., & Kaplan, L. M. (2013). Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med*, 5(178), 178ra141. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005687>

Liu, P., Wu, W., Chen, C., Panyod, S., Sheen, L. & Wu, M. (2020). Evaluation of Compatibility of 16S rRNA V3V4 and V4 Amplicon Libraries for Clinical Microbiome Profiling. *bioRxiv*; <https://doi.org/10.1101/2020.08.18.256818>

Liu, X., Wang, H., Liang, X., & Roberts, M. S. (2017). Chapter 30—Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. En P. Muriel (Ed.), *Liver Pathophysiology* (pp. 391–400). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00030-8>

Liu, Y., Hou, Y., Wang, G., Zheng, X., & Hao, H. (2020). Gut Microbial Metabolites of Aromatic Amino Acids as Signals in Host-Microbe Interplay. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 31(11), 818–834. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.02.012>

López-Contreras, B. E., Morán-Ramos, S., Villarruel-Vázquez, R., Macías-Kauffer, L., Villamil-Ramírez, H., León-Mimila, P., . . . Canizales-Quinteros, S. (2018). Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-



age children and its association with metabolic traits. *Pediatr Obes*, 13(6), 381-388. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12262>

Louis, P., Young, P., Holtrop, G., & Flint, H. J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*, 12(2), 304–314. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x>

Louis, P. & Flint, H. J. (2016). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 19(1):29-41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>

Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>

Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, 5(2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>

Lu, K. L., Xu, W. N., Wang, L. N., Zhang, D. D., Zhang, C. N., & Liu, W. B. (2014). Hepatic  $\beta$ -oxidation and regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet. *PloS one*, 9(3), e93135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093135>

Lutz, T. A., & Bueter, M. (2014). The physiology underlying Roux-en-Y gastric bypass: a status report. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 307(11), R1275–R1291. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00185.2014>

Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, 95(1), 50–60. [https://doi.org/10.5740/jaoacint.sge\\_macfarlane](https://doi.org/10.5740/jaoacint.sge_macfarlane)

Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., Backer, G. G. D., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M.-R., ... Patel, R. S. (2019). 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 290, 140–205. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.014>

Machate, D. J., Figueiredo, P. S., Marcelino, G., Guimarães, R., Hiane, P. A., Bogo, D., Pinheiro, V., Oliveira, L., & Pott, A. (2020). Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4093. <https://doi.org/10.3390/ijms21114093>

Maciejewski, M. L., Arterburn, D. E., Van Scoyoc, L., Smith, V. A., Yancy, W. S., Jr, Weidenbacher, H. J., Livingston, E. H., & Olsen, M. K. (2016). Bariatric Surgery and Long-term Durability of Weight Loss. *JAMA surgery*, 151(11), 1046–1055. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2016.2317>

Magouliotis, D. E., Tasiopoulou, V. S., Svokos, A. A., Svokos, K. A., & Zacharoulis, D. (2018). Extracorporeal membrane oxygenation versus cardiopulmonary bypass during lung transplantation: A meta-analysis. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 66(1), 38–47. <https://doi.org/10.1007/s11748-017-0836-3>

Mahdy Ali, K., Wonnerth, A., Huber, K., & Wojta, J. (2012). Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol--current therapies and future opportunities. *Br J Pharmacol*, 167(6), 1177-1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02081.x>

Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ (2020). *MaAsLin 2: Multivariable Association in Population-scale Meta-omics Studies.* R/Bioconductor package, <http://huttenhower.sph.harvard.edu/maaslin2>.

Mansbach, C. M., & Siddiqi, S. A. (2010). The biogenesis of chylomicrons. *Annual Review of Physiology*, 72, 315–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135801>

Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P., & Lapaque, N. (2021). SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proc Nutr Soc*, 80(1), 37-49. <https://doi.org/10.1017/S0029665120006916>

Martinez-Medina, J. N., Flores-Lopez, R., López-Contreras, B. E., Villamil-Ramirez, H., Guzman-Muñoz, D., Macias-Kauffer, L. R., . . . Moran-Ramos, S. (2021). Effect of Gut Microbial Enterotypes on the Association between Habitual Dietary Fiber Intake and Insulin Resistance Markers in Mexican Children and Adults. *Nutrients*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/nu13113892>

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Meaney, A., Ceballos-Reyes, G., Gutiérrez-Salmean, G., Samaniego-Méndez, V., Vela-Huerta, A., Alcocer, L., Zárate-Chavarría, E., Mendoza-Castelán, E., Olivares-Corichi, I., García-Sánchez, R., Martínez-Marroquín, Y., Ramírez-Sánchez, I., & Meaney, E. (2013). Cardiovascular risk factors in a Mexican middle-class urban population. The Lindavista Study. Baseline data. *Archivos De Cardiologia De Mexico*, 83(4), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2013.05.002>

Mells, J. E., & Anania, F. A. (2013). The role of gastrointestinal hormones in hepatic lipid metabolism. *Seminars in liver disease*, 33(4), 343–357. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1358527>

Mensink, R. P., & Organization, W. H. (2016). *Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: A systematic review and regression analysis*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246104>

Miyajima, Y., Karashima, S., Ogai, K., Taniguchi, K., Ogura, K., Kawakami, M., Nambo, H., Kometani, M., Aono, D., Demura, M., Yoneda, T., Tsujiguchi, H., Hara,

A., Nakamura, H., & Okamoto, S. (2022). Impact of gut microbiome on dyslipidemia in Japanese adults: Assessment of the Shika-machi super preventive health examination results for causal inference. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 908997. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.908997>

Moran-Ramos, S., Lopez-Contreras, B. E., Villarruel-Vazquez, R., Ocampo-Medina, E., Macias-Kauffer, L., Martinez-Medina, J. N., Villamil-Ramirez, H., León-Mimila, P., Del Rio-Navarro, B. E., Ibarra-Gonzalez, I., Vela-Amieva, M., Gomez-Perez, F. J., Velazquez-Cruz, R., Salmeron, J., Reyes-Castillo, Z., Aguilar-Salinas, C., & Canizales-Quinteros, S. (2020). Environmental and intrinsic factors shaping gut microbiota composition and diversity and its relation to metabolic health in children and early adolescents: A population-based study. *Gut microbes*, 11(4), 900–917. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1712985>

Moreno-Indias, I., & Tinahones, F. J. (2015). Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J Diabetes Res*, 2015, 970375. <https://doi.org/10.1155/2015/970375>

Mosca, A., Leclerc, M., & Hugot, J. P. (2016). Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem?. *Frontiers in microbiology*, 7, 455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00455>

Nanthirudjanar, T., Furumoto, H., Zheng, J., Kim, Y.-I., Goto, T., Takahashi, N., Kawada, T., Park, S.-B., Hirata, A., Kitamura, N., Kishino, S., Ogawa, J., Hirata, T., & Sugawara, T. (2015). Gut Microbial Fatty Acid Metabolites Reduce Triacylglycerol Levels in Hepatocytes. *Lipids*, 50(11), 1093–1102. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4067-z>

Nie, X., Chen, J., Ma, X., Ni, Y., Shen, Y., Yu, H., . . . Bao, Y. (2020). A metagenome-wide association study of gut microbiome and visceral fat accumulation. *Comput Struct Biotechnol J*, 18, 2596-2609. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.026>

Nienov, O. H., Machado, F. D., Dias, L. S., De Carli, L. A., & Schmid, H. (2020). Effect of Bariatric Surgery on High-Density Lipoprotein (HDL) Cholesterol in Non-diabetic Patients with Severe Obesity. *Obesity Surgery*, 30(1), 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11695-019-04126-6>

Nogal, A., Valdes, A. M. & Menni, C. (2021). The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardiometabolic health. *Gut Microbes*, 13(1):1897212. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1897212>

Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., & Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4), 355–364. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.355>

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). *Vegan: Community Ecology Package (Version 2.5-5)*. Available online at: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

Ooi, E. M., Watts, G. F., Ng, T. W., & Barrett, P. H. (2015). Effect of dietary Fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update. *Nutrients*, 7(6), 4416–4425. <https://doi.org/10.3390/nu7064416>

Padilla, N., Maraninchi, M., Béliard, S., Berthet, B., Nogueira, J. P., Wolff, E., Nicolay, A., Bégu, A., Dubois, N., Grangeot, R., Mattei, C., Vialettes, B., Xiao, C., Lewis, G. F., & Valéro, R. (2014). Effects of bariatric surgery on hepatic and intestinal lipoprotein particle metabolism in obese, nondiabetic humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(10), 2330–2337. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303849>

Palmas, V., Pisanu, S., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., Uva, P., Vascellari, S., Loviselli, A., Manzin, A., & Velluzzi, F. (2021). Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Scientific reports*, 11(1), 5532. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84928-w>

Pan, X., & Hussain, M. M. (2012). Gut triglyceride production. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1821(5), 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.09.013>

Parada-Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N. & Hermoso, M. A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>

Pedersen, C., Ijaz, U. Z., Gallagher, E., Horton, F., Ellis, R. J., Jaiyeola, E., . . . Robertson, M. D. (2018). Fecal Enterobacteriales enrichment is associated with increased in vivo intestinal permeability in humans. *Physiol Rep*, 6(7), e13649. <https://doi.org/10.14814/phy2.13649>

Piché, M. E., Tardif, I., Auclair, A., & Poirier, P. (2021). Effects of bariatric surgery on lipid-lipoprotein profile. *Metabolism: clinical and experimental*, 115, 154441. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154441>

Pigsborg, K., Gürdeniz, G., Rangel-Huerta, O. D., Holven, K. B., Dragsted, L. O., & Ulven, S. M. (2022). Effects of changing from a diet with saturated fat to a diet with n-6 polyunsaturated fat on the serum metabolome in relation to cardiovascular disease risk factors. *Eur J Nutr*, 61(4), 2079-2089. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02796-6>

Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>

Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>

Rebolledo, C., Cuevas, A., Zambrano, T., Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Saavedra, K., . . . Saavedra, N. (2017). Bacterial Community Profile of the Gut Microbiota Differs between Hypercholesterolemic Subjects and Controls. *Biomed Res Int*, 2017, 8127814. <https://doi.org/10.1155/2017/8127814>

Redgrave, T. G. (2004). Chylomicron metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt 1), 79–82. <https://doi.org/10.1042/bst0320079>

Reiner, Z. (2013). Managing the residual cardiovascular disease risk associated with HDL-cholesterol and triglycerides in statin-treated patients: a clinical update. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 23(9), 799-807. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.05.002>

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Ruiz-Mar, G., Ornelas-Oñate, L. A., Ruelas-Ayala, A., & Ramírez-Velásquez, J. E. (2020). Changes in lipid parameters in patients undergoing bariatric surgery. Lipid parameters and bariatric surgery. *Cirujano General*, 42(3), 203–209. <https://doi.org/10.35366/99960>

Russell, W. R., Gratz, S. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A. M., Lopley, G. E., Wallace, R. J., Duthie, G. G., & Flint, H. J. (2011). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(5), 1062–1072. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.002188>

Sedighi, M., Razavi, S., Navab-Moghadam, F., Khamseh, M. E., Alaei-Shahmiri, F., Mehrtash, A., & Amirmozafari, N. (2017). Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microb Pathog*, 111, 362-369. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.038>

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>

Seo, Y. S., Lee, H. B., Kim, Y., & Park, H. Y. (2020). Dietary Carbohydrate Constituents Related to Gut Dysbiosis and Health. *Microorganisms*, 8(3), 427. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030427>

Shearer, M. J., & Newman, P. (2008). Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thrombosis and haemostasis*, 100(4), 530–547.

Shah, S., Fillier, T., Pham, T. H., Thomas, R., & Cheema, S. K. (2021). Intraperitoneal Administration of Short-Chain Fatty Acids Improves Lipid Metabolism of Long-Evans Rats in a Sex-Specific Manner. *Nutrients*, 13(3), 892. <https://doi.org/10.3390/nu13030892>

Shen, N., Caixàs, A., Ahlers, M., Patel, K., Gao, Z., Dutia, R., Blaser, M. J., Clemente, J. C., & Laferrère, B. (2019). Longitudinal changes of microbiome composition and microbial metabolomics after surgical weight loss in individuals with obesity. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*, 15(8), 1367–1373. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2019.05.038>

Shi, Y., & Cheng, D. (2009). Beyond triglyceride synthesis: The dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 297(1), E10-18. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90949.2008>

Shimizu, H., Masujima, Y., Ushiroda, C., Mizushima, R., Taira, S., Ohue-Kitano, R., & Kimura, I. (2019). Dietary short-chain fatty acid intake improves the hepatic metabolic condition via FFAR3. *Scientific reports*, 9(1), 16574. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53242-x>

Shin, W.-K., Shin, S., Lee, J., Kang, D., & Lee, J. E. (2021). Carbohydrate Intake and Hyperlipidemia among Population with High-Carbohydrate Diets: The Health Examinees Gem Study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(3), 2000379. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000379>

Singh, R. K., Chang, H.-W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>



Sjöström L. (2008). Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *International journal of obesity (2005)*, 32 Suppl 7, S93–S97. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.244>

Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529(7585), 212–215. <https://doi.org/10.1038/nature16504>

Ssekagiri, A., Sloan, W. T., and Zeeshan Ijaz, U. (2022). *Microbiomeseq: An R package for microbial community analysis in an environmental context*. Available at: [http://userweb.eng.gla.ac.uk/umer.ijaz/projects/microbiomeSeq\\_Tutorial.html](http://userweb.eng.gla.ac.uk/umer.ijaz/projects/microbiomeSeq_Tutorial.html)

Staley, C., Weingarden, A. R., Khoruts, A., & Sadowsky, M. J. (2017). Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(1), 47-64. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8006-6>

Steinert, R. E., Rehman, A., Souto Lima, E. J., Agamennone, V., Schuren, F. H. J., Gero, D., Schreiner, P., Vonlanthen, R., Ismaeil, A., Tzafos, S., Hosa, H., Vetter, D., Misselwitz, B., & Bueter, M. (2020). Roux-en-Y gastric bypass surgery changes fungal and bacterial microbiota in morbidly obese patients-A pilot study. *PloS One*, 15(7), e0236936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236936>

Suburu, J., Gu, Z., Chen, H., Chen, W., Zhang, H., & Chen, Y. Q. (2013). Fatty acid metabolism: Implications for diet, genetic variation, and disease. *Food Biosci*, 4, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.07.003>

Sun, K., Liu, Z., & Wang, H. (2022). The effect of probiotics on the serum lipid levels in non-obese healthy adults with hyperlipidemia: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Efectos de los probióticos en los niveles lipídicos en adultos sanos no obesos con hiperlipidemia: revisión sistemática y metaanálisis de ensayos controlados aleatorios. *Nutricion hospitalaria*, 39(1), 157–170. <https://doi.org/10.20960/nh.03688>

Theuwissen, E., Magdeleyns, E. J., Braam, L. A., Teunissen, K. J., Knapen, M. H., Binnekamp, I. A., van Summeren, M. J., & Vermeer, C. (2014). Vitamin K status in healthy volunteers. *Food & function*, 5(2), 229–234. <https://doi.org/10.1039/c3fo60464k>

Toomey S, Harhen B, Roche HM, Fitzgerald D, Belton O. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis*. 2006;187:40–49. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.024>

Tremaroli, V., Karlsson, F., Werling, M., Ståhlman, M., Kovatcheva-Datchary, P., Olbers, T., Fändriks, L., le Roux, C. W., Nielsen, J., & Bäckhed, F. (2015). Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell metabolism*, 22(2), 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.009>

Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A. A., Poos, M., & Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, T. e. N. A. (2002). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc*, 102(11), 1621-1630. [https://doi.org/10.1016/s0002-8223\(02\)90346-9](https://doi.org/10.1016/s0002-8223(02)90346-9)

Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E., & Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.10.006>

Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2019). Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*, 92, 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.005>

Velagapudi, V. R., Hezaveh, R., Reigstad, C. S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., Islam, S., Felin, J., Perkins, R., Borén, J., Oresic, M., & Bäckhed, F. (2010). The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of Lipid Research*, 51(5), 1101–1112. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002774>

Vest, A. R., Heneghan, H. M., Agarwal, S., Schauer, P. R., & Young, J. B. (2012). Bariatric surgery and cardiovascular outcomes: A systematic review. *Heart (British Cardiac Society)*, 98(24), 1763–1777. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2012-301778>

Vieira-Silva, S., Falony, G., Belda, E., Nielsen, T., Aron-Wisnewsky, J., Chakaroun, R., . . . Consortium, M. (2020). Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*, 581(7808), 310-315. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2269-x>

Vijay, A., Astbury, S., Le Roy, C., Spector, T. D., & Valdes, A. M. (2021). The prebiotic effects of omega-3 fatty acid supplementation: A six-week randomised intervention trial. *Gut Microbes*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1863133>

Vojinovic, D., Radjabzadeh, D., Kurilshikov, A., Amin, N., Wijmenga, C., Franke, L., . . . van Duijn, C. M. (2019). Relationship between gut microbiota and circulating metabolites in population-based cohorts. *Nat Commun*, 10(1), 5813. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13721-1>

Wang, Y., & Xu, D. (2017). Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0515-5>

Wang, Z., Wang, Q. A., Liu, Y., & Jiang, L. (2021). Energy metabolism in brown adipose tissue. *The FEBS journal*, 288(12), 3647–3662. <https://doi.org/10.1111/febs.16015>

Wargent, E., Sennitt, M. V., Stocker, C., Mayes, A. E., Brown, L., O'Dowd, J., Wang, S., Einerhand, A. W. C., Mohede, I., Arch, J. R. S., & Cawthorne, M. A. (2005). Prolonged treatment of genetically obese mice with conjugated linoleic acid improves glucose tolerance and lowers plasma insulin concentration: Possible involvement of PPAR activation. *Lipids in Health and Disease*, 4, 3. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-4-3>

Waters, J. L., & Ley, R. E. (2019). The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol*, 17(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0699-4>

Wei, J., Zhao, Y., Zhou, C., Zhao, Q., Zhong, H., Zhu, X., . . . Yu, G. (2021). Dietary Polysaccharide from. *Polymers (Basel)*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/polym13193286>

Wickham, H. (2021). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. Retrieved from <https://ggplot2.tidyverse.org>

Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., & Jenkins, D. J. A. (2006). Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235–243. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>

World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>

Wu, J. H. Y., Micha, R., & Mozaffarian, D. (2019). Dietary fats and cardiometabolic disease: mechanisms and effects on risk factors and outcomes. *Nat Rev Cardiol*, 16(10), 581-601. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0206-1>

Xu, A. A., Kennedy, L. K., Hoffman, K., White, D. L., Kanwal, F., El-Serag, H. B., Petrosino, J. F., & Jiao, L. (2022). Dietary Fatty Acid Intake and the Colonic Gut Microbiota in Humans. *Nutrients*, 14(13), 2722. <https://doi.org/10.3390/nu14132722>

Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, 17, 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>

Yang, L., Xie, X., Li, Y., Wu, L., Fan, C., Liang, T., Xi, Y., Yang, S., Li, H., Zhang, J., Ding, Y., Xue, L., Chen, M., Wang, J., & Wu, Q. (2021). Evaluation of the Cholesterol-Lowering Mechanism of *Enterococcus faecium* Strain 132

and *Lactobacillus paracasei* Strain 201 in Hypercholesterolemia Rats. *Nutrients*, 13(6), 1982. <https://doi.org/10.3390/nu13061982>

Ying, Z., Tramper, N., Zhou, E., Boon, M. R., Rensen, P., & Kooijman, S. (2022). Role of thermogenic adipose tissue in lipid metabolism and atherosclerotic cardiovascular disease: lessons from studies in mice and humans. *Cardiovascular research*, cvac131. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac131>

Yun, K. E., Kim, J., Kim, M. H., Park, E., Kim, H. L., Chang, Y., . . . Kim, H. N. (2020). Major Lipids, Apolipoproteins, and Alterations of Gut Microbiota. *J Clin Med*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/jcm9051589>

Zhou, H., Yu, B., Gao, J., Htoo, J. K., & Chen, D. (2018). Regulation of intestinal health by branched-chain amino acids. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 89(1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/asj.12937>

Zhu, L., Baker, S. S., Gill, C., Liu, W., Alkhoury, R., Baker, R. D., & Gill, S. R. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*, 57(2), 601-609. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>

Zúñiga, J., Cancino, M., Medina, F., Varela, P., Vargas, R., Tapia, G., Videla, L. A., & Fernández, V. (2011). N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- $\alpha$  activation and PPAR- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS one*, 6(12), e28502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028502>

## **12. Anexos**

### **Anexo A. Extracción de DNA de muestras fecales “DNA Stool Mini Kit (Qiagen)”**

Se agregaron 1.4 mL de buffer ASL (buffer de lisis) a 180-220 mg de materia fecal congelada y se colocó la muestra en vórtex durante 1 minuto o bien, hasta que ésta se homogenizara completamente. Para facilitar la lisis de las bacterias, las muestras se calentaron en un termobloque a 95°C durante 5 minutos. Se homogenizaron nuevamente durante 15 segundos y se centrifugó a máxima velocidad (13,000rpm) por 1 minuto. Del sobrenadante obtenido, se tomaron 1.2mL y se añadió una tableta INHIBITEX para eliminar contaminantes; una vez disuelta la tableta, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó la mezcla a máxima velocidad por 3 minutos y se recuperó todo el sobrenadante, aplicando por duplicado estos pasos.

Se tomaron 200 µL del sobrenadante y se agregaron 15 µL de proteinasa K para la digestión de proteínas, inactivación de nucleasas (DNAsas y RNAsas) y remoción de contaminantes. A esta mezcla, se adicionaron 200 µL de buffer AL para favorecer la reacción de la enzima. Después de homogenizar la solución durante 15 segundos en vórtex, se incubó en termobloque a 70°C durante 30 minutos, para favorecer la reacción. A continuación, se centrifugó brevemente y añadieron 200 µL de etanol (96-100%) al lisado para eliminar sales, homogenizando nuevamente.

Todo el contenido se transfirió a columnas de sílice sobre tubos de recolección y

se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad, desechando la fase acuosa. Se agregaron 500 µL de buffer AW1 a las columnas centrifugando a máxima velocidad por 1 minuto y luego se añadieron 500 µL de buffer AW2, centrifugando ahora por 3 minutos. Dichos buffers son necesarios para la retención del DNA en las columnas y eliminación de contaminantes. Por último, las columnas se colocaron en un tubo de 1.5 mL y se añadieron 200 µL de buffer AE en la membrana. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad, durante 1 minuto para eluir el DNA.

#### **Anexo B. Extracción de DNA de muestras fecales “Power Fecal Kit (Qiagen)”**

Se colocaron 250 mg de materia fecal en el tubo con perlas y se agregaron 750 µL de buffer Powerbead Solution. Se añadieron 60 µL de la solución C1 y se colocaron los tubos en incubación a 65°C, durante 10 minutos, para facilitar la lisis de las bacterias. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo por duplicado la lisis mecánica de las muestras en el equipo FastPrep-24, con las siguientes características para cada ciclo:

Velocidad: 6.5 m/sec Adaptador: QuickPrep Tiempo: 45 segundos	Matriz de lisado: A Cantidad: 1 Unidad: mg	Ciclos: 1 Tiempo de pausado: 300 segundos
---	--	---

Entre cada ciclo de FastPrep-24, las muestras se colocaron en hielo para favorecer la lisis. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 11,900 rpm durante 1 minuto. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo y se agregaron

250  $\mu\text{L}$  de solución C2, mezclando brevemente en vortex durante 5 segundos y dejando reposar 5 minutos en agua fría (2-8°C). Las muestras se centrifugaron nuevamente por 11,900 rpm. durante 1 minuto. Se transfirieron 600  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un nuevo tubo y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la solución C3, mezclando en vortex por 5 segundos e incubando en agua fría por 5 minutos. Tras centrifugar a 11,900 rpm durante 1 minuto, se tomaron 750  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se mezclaron con 1220  $\mu\text{L}$  de la solución C4 en un nuevo tubo, agitando durante 5 segundos en vortex. De esta mezcla, se transfirieron primero 650  $\mu\text{L}$  a una columna MB Spin Column y se centrifugó a 11,900 rpm durante 1 minuto. Se desechó la fase acuosa y se repitió este paso hasta haber pasado por la columna todo el sobrenadante.

Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de solución C5 a la columna y se centrifugó a 11,900 rpm durante 30 segundos. Se desechó la fase acuosa y se repitió el ciclo de centrifugación. La columna MB Spin Column se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2 mL. Finalmente, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la solución C6 en el centro de la membrana de la columna y se centrifugó a 11,900 rpm durante 1 minuto para eluir y recuperar el DNA.



## Anexo C. Primera amplificación de la región V4 del gen 16S rRNA

Se realizó la siguiente mezcla de reacción sobre un volumen final de 25.5  $\mu\text{L}$  por pozo:

**Tabla A1.** Mezcla de reacción para primera PCR

Reactivo	Volumen		
	Muestra	Control negativo	Control positivo
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity		22.5 $\mu\text{L}$	
Primer Universal Forward desalado		0.5 $\mu\text{L}$	
Primer Reverse desalado (diseño 24x4 para una placa de 96 pozos)		0.5 $\mu\text{L}$	
DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	2 $\mu\text{L}$	-	-
H <sub>2</sub> O grado biología molecular	-	2 $\mu\text{L}$	-
MOCK	-	-	2 $\mu\text{L}$

Las muestras se amplificaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

**Tabla A2.** Condiciones de termociclado para primera PCR

1 ciclo	3 minutos	94°C	Desnaturalización
	30 segundos	94°C	Desnaturalización
30 ciclos	30 segundos	50°C	Alineamiento
	1.5 minutos	68°C	Extensión
1 ciclo	5 minutos	68°C	Extensión

#### **Anexo D. Purificación de amplificadores**

Se mezclaron 1.8  $\mu\text{L}$  de perlas Ampure atemperadas por cada  $\mu\text{L}$  de muestra, homogenizando con pipeta de 10 a 15 veces. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se colocaron sobre el magneto por 2 minutos o hasta que la suspensión se aclaró. Con la pipeta, se retiró el sobrenadante evitando tocar y romper el pellet de perlas. Se realizó por duplicado un lavado con 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% frío, incubando por 30 segundos y desechándolo después de este tiempo. Durante 5 minutos, se dejó evaporar el etanol residual y se retiraron las muestras del magneto. Las perlas se resuspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular y se dejó en incubación por 2 minutos. Las muestras se colocaron nuevamente en el magneto por un minuto y se recuperó la solución que contenía los amplicones evitando arrastrar el pellet de perlas.

## Anexo E. Segunda amplificación de la región V4 del gen 16S rRNA

Se realizó la siguiente mezcla de reacción sobre un volumen final de 51  $\mu\text{L}$  por tubo:

**Tabla A3.** Mezcla de reacción para segunda PCR

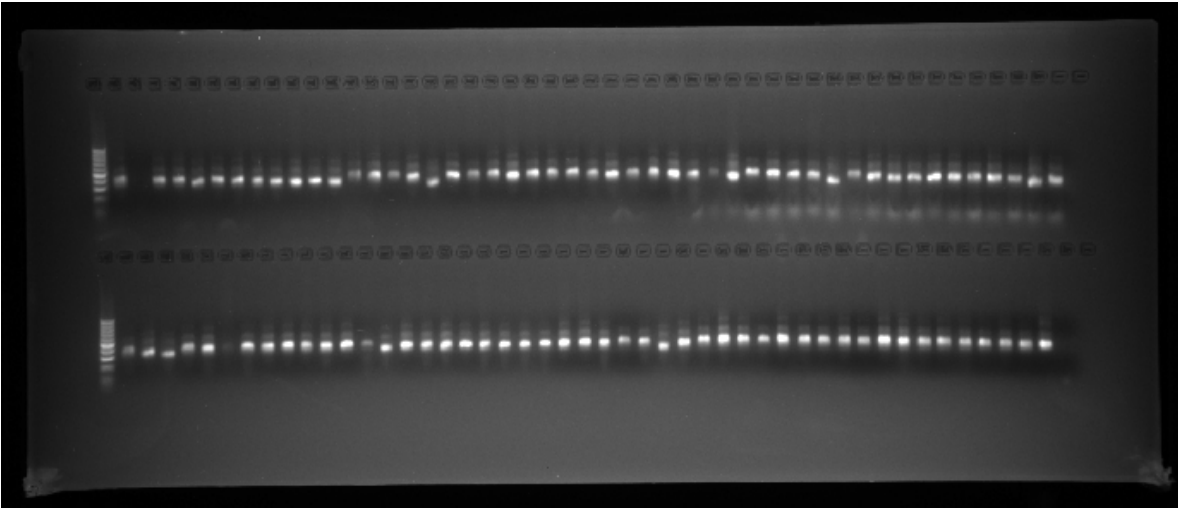
Reactivo	Volumen		
	Muestra	Control negativo	Control positivo
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity		45 $\mu\text{L}$	
Primer Universal Forward desalado		1 $\mu\text{L}$	
Primer Reverse desalado (diseño 4x1)		1 $\mu\text{L}$	
DNA (25 ng/ $\mu\text{L}$ )	4 $\mu\text{L}$	-	-
H <sub>2</sub> O grado biología molecular	-	4 $\mu\text{L}$	-
MOCK	-	-	4 $\mu\text{L}$

Las muestras se amplificaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

**Tabla A4.** Condiciones de termociclado para segunda PCR

1 ciclo	2 minutos	94°C	Desnaturalización
	30 segundos	94°C	Desnaturalización
5 ciclos	30 segundos	60°C	Alineamiento
	1.5 minutos	68°C	Extensión
1 ciclo	5 minutos	68°C	Extensión

## Figuras suplementarias



**Figura suplementaria S1.** Imagen de electroforesis en gel de agarosa donde se muestra la integridad de los amplicones (~450pb) de 94 muestras de DNA bacteriano extraído de materia fecal.

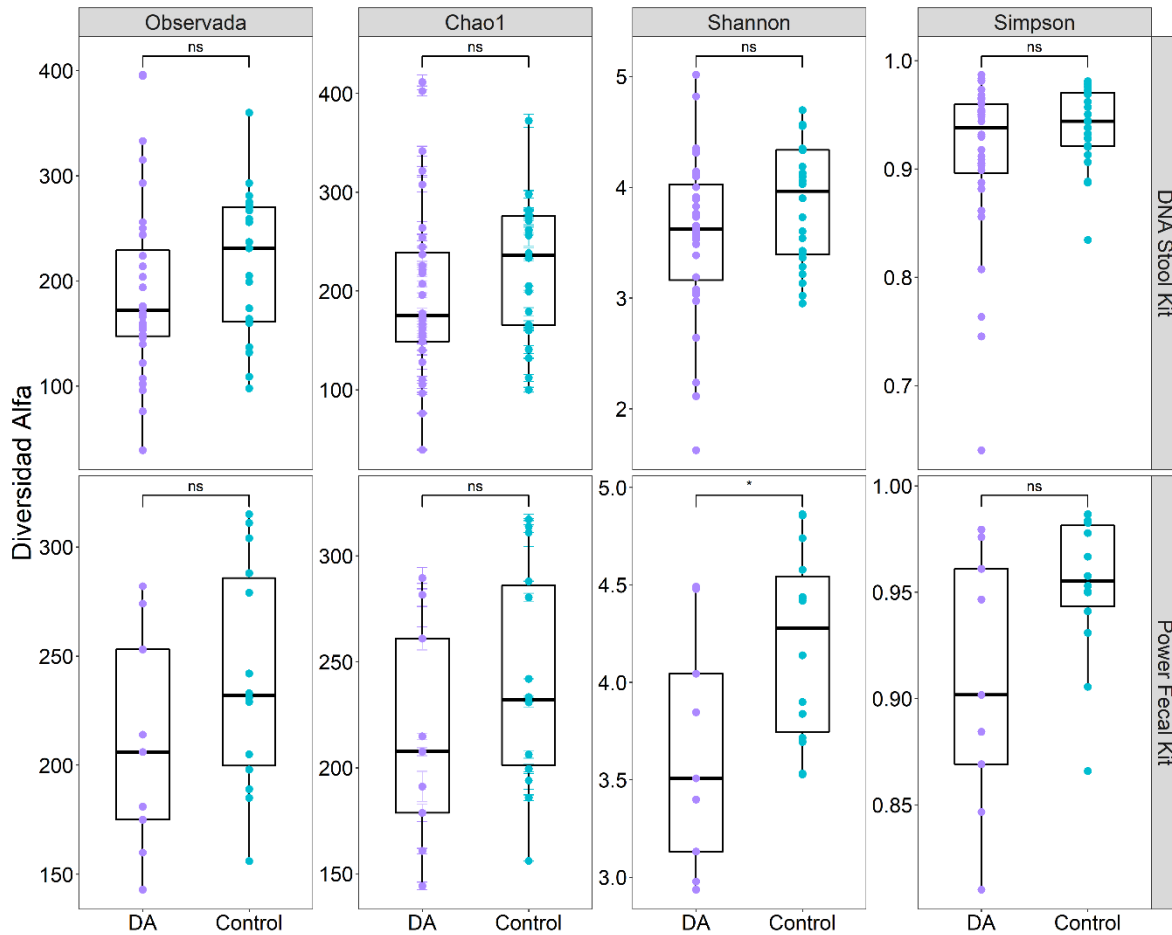
```

241 gatggccccg cggtgcatta gctagttggt agggtaacgg cctaccaagg caatgatgca
301 tagccgagtt gagagactga tcggccacat tgggactgag acacggccca aact<span style="background-color: yellow; border: 1px solid black;">cctacg</span>
361 <span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; color: green;">ggaggcaaca</span>→ gtacgcaatc ttccacaatg gacgaaagtc tgatggagca acgccgcggtg
421 agtgaagaag gttttcggat cgtaaagctc tgttgttggt gaagaaggat agaggtagta
481 actggccttt atttgacggt aatcaaccag aaagtcacgg ctaactac<span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; color: purple;">gt gccagcagcc</span>
541 <span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; color: purple;">g<span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; color: purple;">cggtac</span>→ tac gtaggtggca agcgttgctc ggatttattg ggcgtaaagc gagcgcaggc
601 ggaagaataa gtctgatgtg aaagccctcg gcttaaccga ggaactgcat cggaaactgt
661 ttttcttgag tgcagaagag gagagtggaa ctccatgtgt agcggtgga tgcgtagata
721 tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct ctctggtctg caactgacgc tgaggctcga
781 aagcatgggt agcgaacag<span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; color: red;">g<span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; color: red;">atagatacc ctggiagtc</span> atgccgtaaa cgatgagtgc
841 taagtgttgg gaggtttccg cctctcagtg ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg

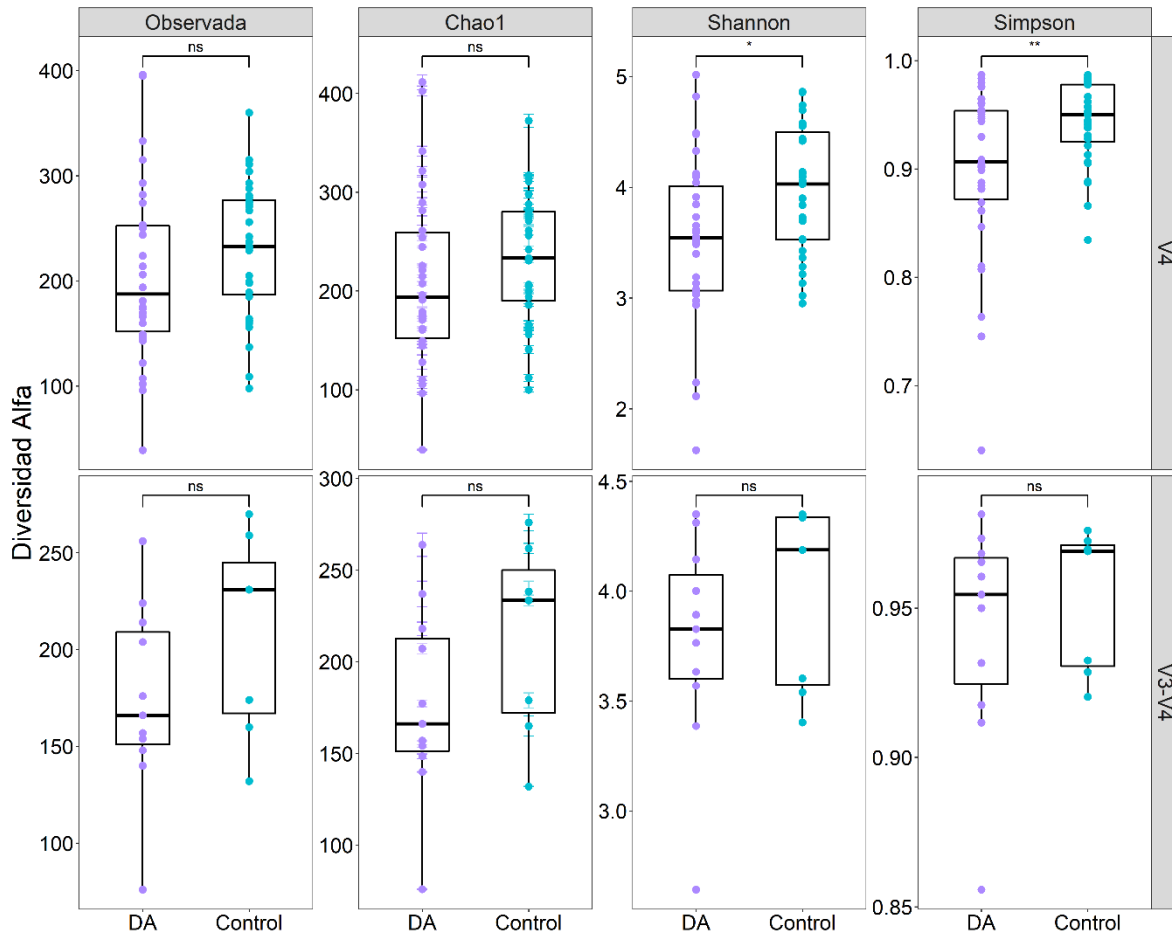
```

→ IlluminaF    → 515F    ← IlluminaR    ← 806R    V3    V4

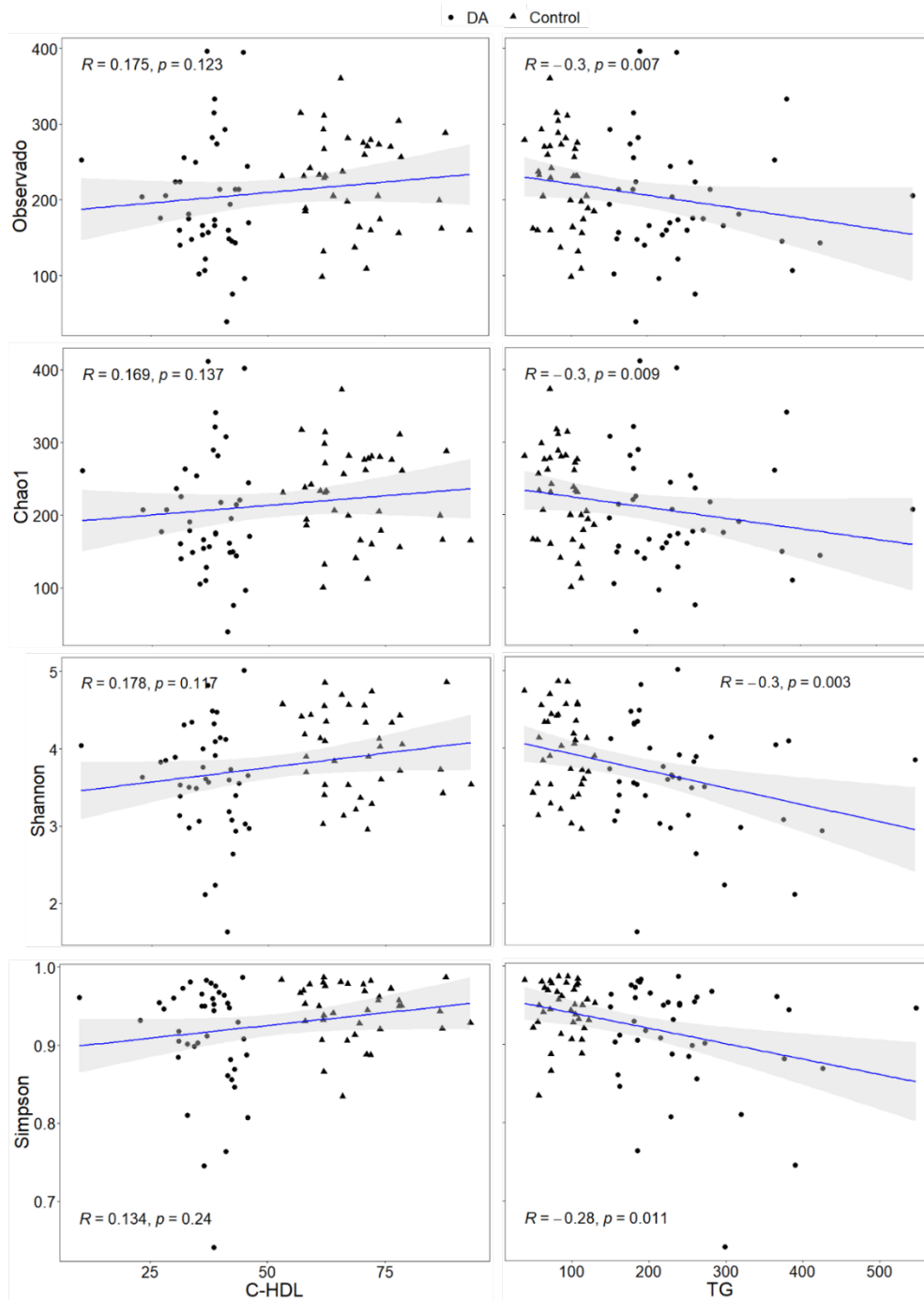
**Figura suplementaria S2.** Fragmento de la secuencia del gen 16s rRNA de *Lactobacillus acidophilus* (EF533992.1), donde se muestra como ejemplo los segmentos amplificados de las regiones hipervariables V4 y V3-V4.



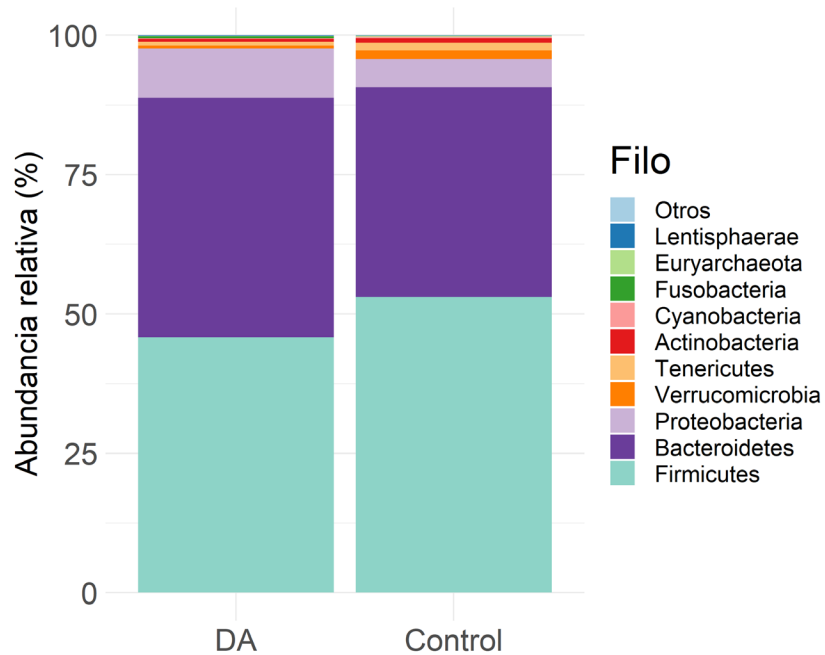
**Figura suplementaria S3. Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles, respecto al estuche de extracción empleado.** En el gráfico se muestran las medianas y rangos intercuartiles de las especies observadas y los índices Chao1, Shannon y Simpson entre los grupos de estudio (n=41 y n=38, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante la prueba  $t$ -Student. DA: dislipidemia aterogénica. \* $p < 0.05$ ; ns: no significativo.



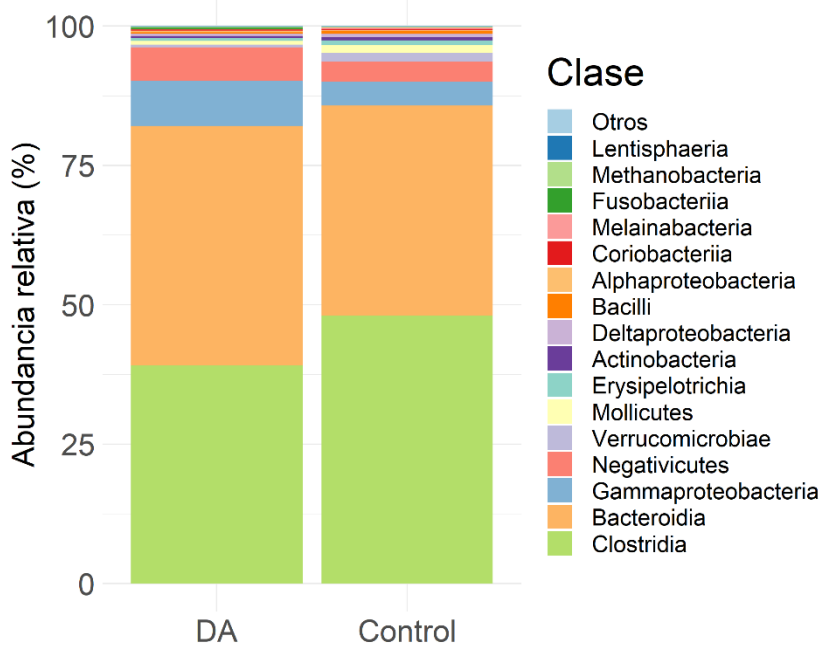
**Figura suplementaria S4. Diversidad alfa de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles, respecto a la región secuenciada.** En el gráfico se muestran las medianas y rangos intercuartiles de las especies observadas y los índices Chao1, Shannon y Simpson entre los grupos de estudio (n=41 y n=38, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante la prueba  $t$ -Student. DA: dislipidemia aterogénica. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; ns: no significativo.



**Figura suplementaria S5. Correlación de los parámetros de la diversidad alfa con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos.** Análisis mediante Rho de Spearman (n=79). DA: dislipidemia aterogénica. C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos.

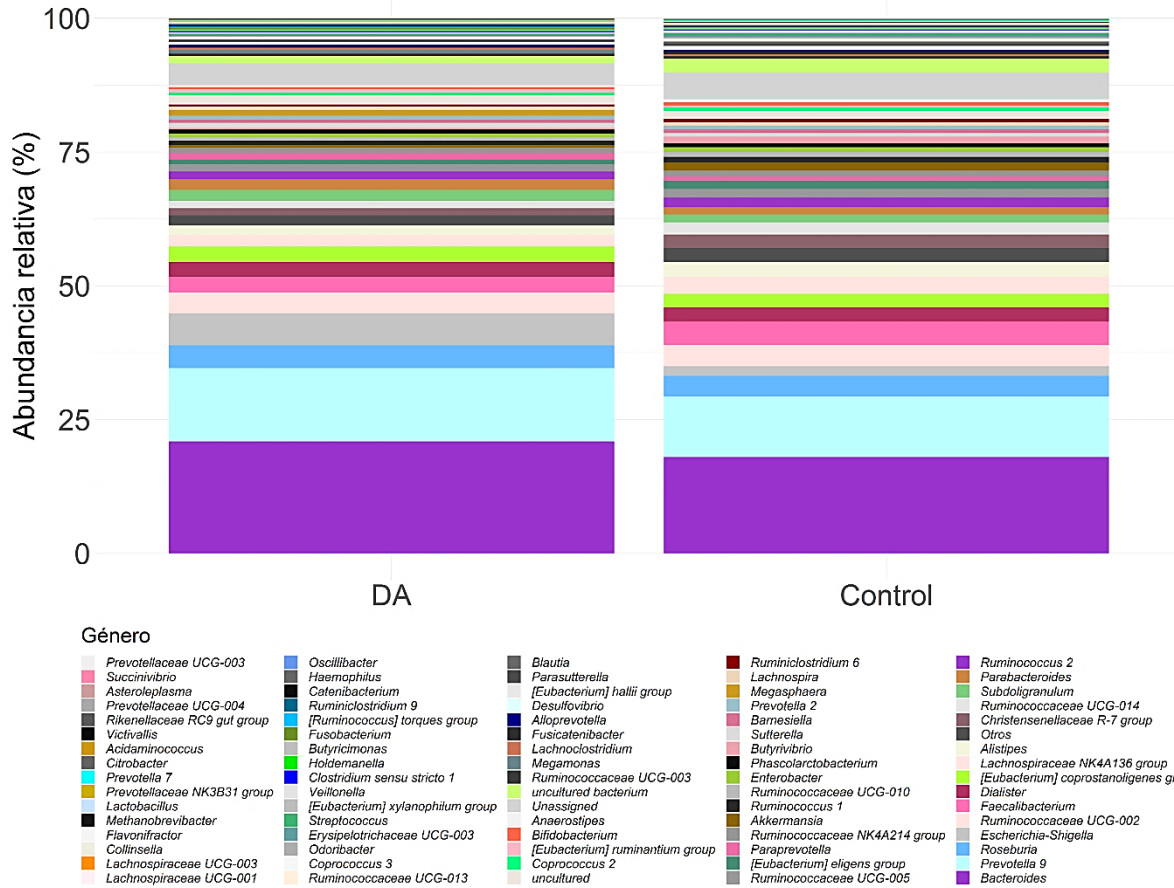


**Figura suplementaria S6. Abundancia relativa (%) a nivel de filo de los sujetos con dislipidemia y controles.** (n=41 y n=38, respectivamente). DA: dislipidemia aterogénica.

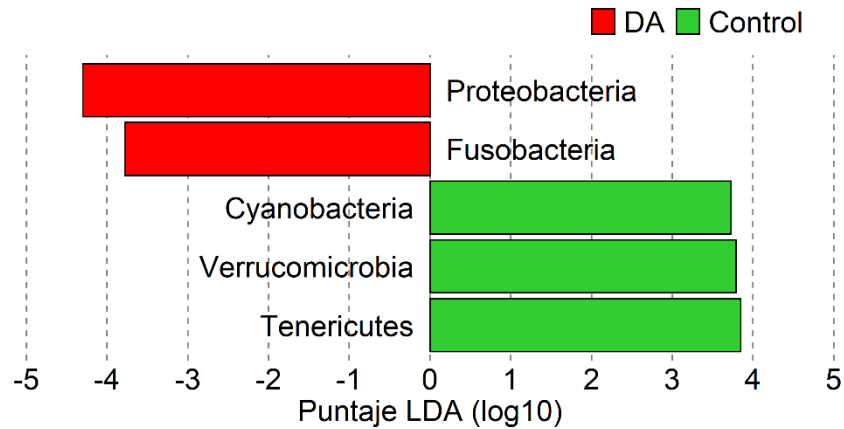


**Figura suplementaria S7. Abundancia relativa (%) a nivel de clase de los sujetos con dislipidemia y controles.** (n=41 y n=38, respectivamente). DA: dislipidemia aterogénica.

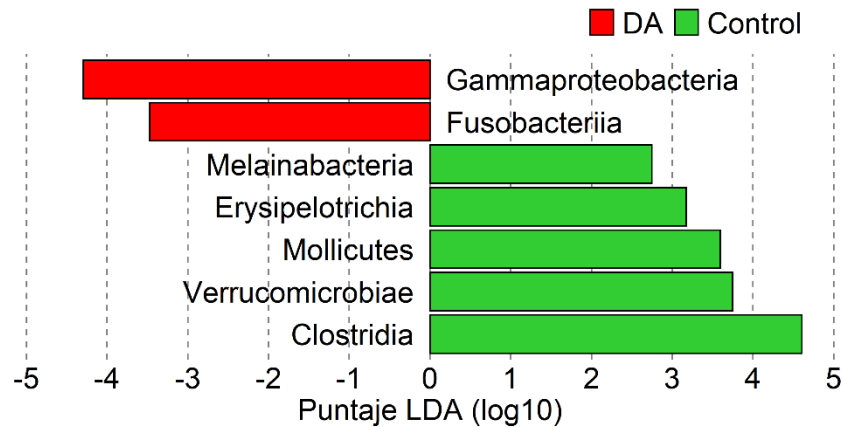




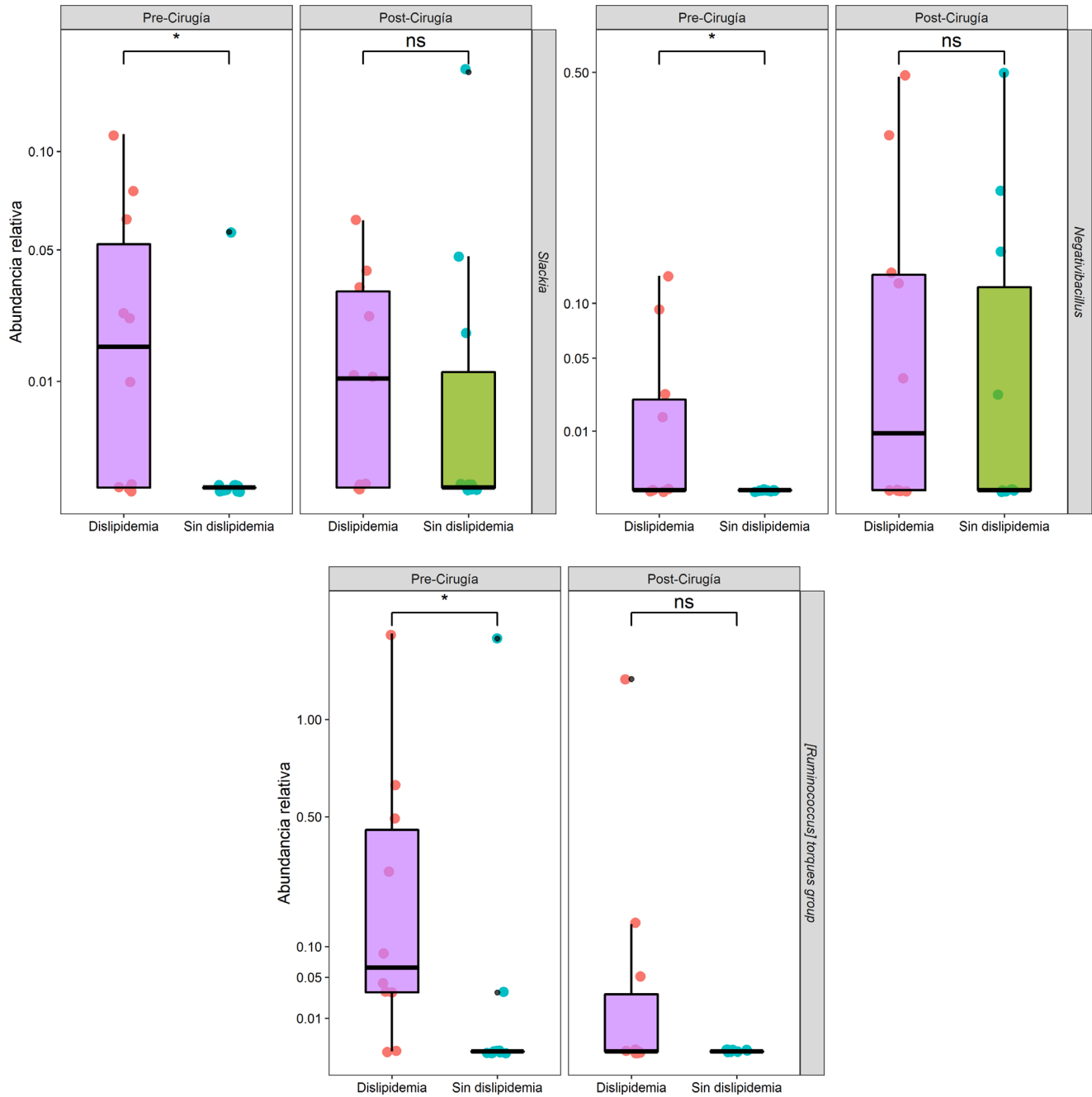
**Figura suplementaria S8. Abundancia relativa (%) a nivel de género de los sujetos con dislipidemia y controles. (n=41 y n=38, respectivamente). DA: dislipidemia aterogénica.**



**Figura suplementaria S9. Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.** En el gráfico se muestran los filos enriquecidos significativamente ( $p < 0.05$ ) con los grupos de estudio ( $n=41$  y  $n=38$ , respectivamente). El puntaje LDA o tamaño de efecto está representado en escala logarítmica. DA: dislipidemia aterogénica.



**Figura suplementaria S10. Análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles.** En el gráfico se muestran las clases enriquecidas significativamente ( $p < 0.05$ ) con los grupos de estudio ( $n=41$  y  $n=38$ , respectivamente). El puntaje LDA o tamaño de efecto está representado en escala logarítmica. DA: dislipidemia aterogénica.



**Figura suplementaria S11. Abundancia relativa de géneros diferenciados (LDA >3,  $p < 0.05$ ) entre pacientes con y sin dislipidemia, previo al bypass gástrico en Y de Roux. (n=10 y n=10, respectivamente). El valor  $p$  se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ .**

## Tablas suplementarias

**Tabla suplementaria S1.** Primers usados en la primera PCR (región V4)

No.	Primers desalados	Secuencia de nucleótidos	Código de Barras (Barcode)
Primer Forward (desalado)			
1	FWD_MB_MHIT	TCT TTC CCT ACA CGA CGC TCT TCC <b>GAT CTG</b> TGC CAG CMG CCG CGG TAA	GATCT
Primers Reverse (desalados)			
1	REV_BC1_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>CG TGA</b> TGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGTGAT
2	REV_BC2_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>AC ATC</b> GGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ACATCG
3	REV_BC3_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>GC CTA</b> AGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GCCTAA
4	REV_BC4_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>TG GTC</b> AGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TGGTCA
5	REV_BC5_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>CA CTG</b> TGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CACTGT
6	REV_BC6_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>AT TGG</b> CGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ATTGGC
7	REV_BC7_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>GA TCT</b> GGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GATCTG
8	REV_BC8_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>TC AAG</b> TGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TCAAGT
9	REV_BC9_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>CT GAT</b> CGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CTGATC
10	REV_BC10_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>AA GCT</b> AGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	AAGCTA
11	REV_BC11_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>T<b>GT AGC</b> CGG</b> ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GTAGCC

12	REV_BC12_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TTA CAA</b> GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TACAAG
13	REV_BC13_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TTT GAC</b> TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TTGACT
14	REV_BC14_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TGG AAC</b> TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGAACT
15	REV_BC15_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TTG ACA</b> TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TGACAT
16	REV_BC16_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TGG ACG</b> GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGACGG
17	REV_BC18_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TGC GGA</b> CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GCGGAC
18	REV_BC19_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TTT TCA</b> CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TTTCAC
19	REV_BC20_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TGG CCA</b> CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGCCAC
20	REV_BC21_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TCG AAA</b> CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGAAAC
21	REV_BC22_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TCG TAC</b> GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGTACG
22	REV_BC23_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TCC ACT</b> CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CCACTC
23	REV_BC25_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TAT CAG</b> TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ATCAGT
24	REV_BC27_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC <b>TAG GAA</b> TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	AGGAAT

**Tabla suplementaria S2.** Primers usados para la amplificación de las regiones V3-V4

Primer Forward	TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG
Primer Reverse	GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C

**Tabla suplementaria S3.** Primers usados en la segunda PCR (región V4)

No.	Primers desalados	Secuencia de nucleótidos	Código de Barras (Barcode)
Primer Forward (HPLC)			
1	UNIV_ILLUMINA_F	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T	-
Primers Reverse (HPLC)			
1	REV_BC22_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AA <b>GGA ATG</b> TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	AGGAAT
2	REV_BC23_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AA <b>TCA GTG</b> TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	ATCAGT
3	REV_BC25_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AA <b>CAC TCG</b> TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CCACTC
4	REV_BC27_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AA <b>GTA CGG</b> TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CGTACG

**Tabla suplementaria S4.** Valores descriptivos de la diversidad alfa de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio, respecto al estuche de extracción de DNA empleado

Índice de diversidad alfa	DNA Stool Kit			Power Fecal Kit		
	DA (n=32)	Control (n=24)	<i>p</i>	DA (n=9)	Control (n=14)	<i>p</i>
<b>Observado</b>	193.88 ± 84.68	216.83 ± 66.99	0.260	209.78 ± 50.27	240 ± 51.52	0.180
<b>Chao1</b>	197.85 ± 87.75	221.17 ± 68.87	0.270	214.38 ± 52.42	242.08 ± 52.19	0.230
<b>Shannon</b>	3.57 ± 0.73	3.85 ± 0.54	0.110	3.65 ± 0.60	4.19 ± 0.49	<b>0.038</b>
<b>Simpson</b>	0.91 ± 0.08	0.94 ± 0.04	0.067	0.91 ± 0.06	0.95 ± 0.03	0.070

Los datos de presentan como media ± desviación estándar. El valor *p* se calculó mediante la prueba *t*-Student. DA: dislipidemia aterogénica.

**Tabla suplementaria S5.** Valores descriptivos de la diversidad alfa de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio, respecto a la región secuenciada

Índice de diversidad alfa	V4			V3-V4		
	DA (n=30)	Control (n=31)	<i>p</i>	DA (n=11)	Control (n=7)	<i>p</i>
<b>Observado</b>	205.90 ± 85.54	229.42 ± 64.11	0.230	174.09 ± 48.90	208.14 ± 52.82	0.190
<b>Chao1</b>	210.51 ± 88.34	232.63 ± 65.46	0.270	176.85 ± 52.12	212.23 ± 53.90	0.190
<b>Shannon</b>	3.52 ± 0.76	3.98 ± 0.57	<b>0.010</b>	3.77 ± 0.48	3.97 ± 0.43	0.400
<b>Simpson</b>	0.90 ± 0.08	0.94 ± 0.04	<b>0.0086</b>	0.94 ± 0.04	0.95 ± 0.02	0.500

Los datos de presentan como media ± desviación estándar. El valor *p* se calculó mediante la prueba *t*-Student. DA: dislipidemia aterogénica.

**Tabla suplementaria S6.** Valores descriptivos de la diversidad beta de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia y controles, respecto a la influencia de covariables

PERMANOVA	No Ponderada		Ponderada	
	R <sup>2</sup>	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	<i>p</i>
Dislipidemia		<b>0.041</b>		0.092
Dislipidemia + Región		<b>0.033</b>		0.087
Dislipidemia + Kit		<b>0.029</b>		0.079
Dislipidemia + Edad + Sexo + IMC	0.02898	<b>0.029</b>	0.0166	0.086
Dislipidemia + Edad + Sexo + IMC + Región		<b>0.030</b>		0.078
Dislipidemia + Edad + Sexo + IMC + Estuche		<b>0.029</b>		0.084
Dislipidemia + Edad + Sexo + IMC + Estuche + Región		<b>0.027</b>		0.072

**Tabla suplementaria S7.** Correlación de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos saturados y parámetros lipídicos

		C-HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)
<b>PUFA (%)</b>	R	0.139	-0.210	0.067
	<i>p</i>	0.222	0.063	0.556
<b>SFA (%)</b>	R	-0.182	0.042	-0.055
	<i>p</i>	0.109	0.716	0.632
<b>PUFA/SFA</b>	R	0.256	-0.240	0.113
	<i>p</i>	<b>0.023</b>	<b>0.033</b>	0.320

Análisis mediante Rho de Spearman (n=79). C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; CT: colesterol total; C-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados.



**Tabla suplementaria S8.** Valores descriptivos de la diversidad alfa de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio

<b>Índice de diversidad alfa</b>	<b>DA (n=41)</b>	<b>Control (n=38)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Observado</b>	197.37 ± 78.14	225.50 ± 62.09	0.079
<b>Chao1</b>	201.48 ± 81.03	228.87 ± 63.33	0.097
<b>Shannon</b>	3.59 ± 0.70	3.98 ± 0.54	<b>0.007</b>
<b>Simpson</b>	0.91 ± 0.07	0.94 ± 0.04	<b>0.0095</b>

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. El valor *p* se calculó mediante la prueba *t*-Student. DA: dislipidemia aterogénica.

**Tabla suplementaria S9.** Resultados del análisis de discriminación lineal de tamaño de efecto (LEfSe) de la microbiota intestinal de sujetos con dislipidemia aterogénica (DA) y control

Taxón	Grupo	LDA	p
Bacteria_Bacteroidetes_Bacteroidia_Bacteroidales_Marinifilaceae_Odoribacter	Control	2.75	<b>0.048</b>
Bacteria_Cyanobacteria	Control	3.27	<b>0.037</b>
Bacteria_Cyanobacteria_Melainabacteria	Control	3.23	<b>0.037</b>
Bacteria_Cyanobacteria_Melainabacteria_Gastranaerophilales	Control	3.33	<b>0.037</b>
Bacteria_Firmicutes_Bacilli_Lactobacillales_Leuconostocaceae_Weissella	Control	2.64	<b>0.034</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia	Control	4.66	<b>0.019</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales	Control	4.66	<b>0.019</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Christensenellaceae	Control	3.81	<b>0.010</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Christensenellaceae_Christensenellaceae R-7 group	Control	3.80	<b>0.010</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Clostridiales vadin BB60 group	Control	3.44	<b>0.050</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Clostridiales vadin BB60group_uncultured bacterium	Control	3.47	<b>0.008</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_FamilyXI	Control	3.04	<b>0.028</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_FamilyXIII	Control	3.04	<b>0.032</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_FamilyXIII_Unassigned	Control	2.53	<b>0.003</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Anaerostipes	Control	3.15	<b>0.025</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Blautia	Control	2.95	<b>0.045</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Coprococcus 1	Control	2.65	<b>0.033</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_[Eubacterium] eligens group	Control	3.39	<b>0.003</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_[Eubacterium] xylanophilum group	Control	2.88	<b>0.004</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Fusicatenibacter	Control	3.31	<b>0.004</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Lachnospiraceae FCS020 group	Control	3.25	<b>0.028</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Lachnospiraceae UCG-004	Control	2.68	<b>0.018</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Ruminococcus gauvreauii group	Control	2.46	<b>0.030</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Peptococcaceae	Control	2.51	<b>0.039</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Ruminococcaceae_Hydrogenoanaerobacterium	Control	3.04	<b>0.032</b>

Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Ruminococcaceae_Ruminiclostridium	Control	3.10	<b>0.007</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Ruminococcaceae_Ruminiclostridium 6	Control	3.05	<b>0.011</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Ruminococcaceae_Ruminococcaceae UCG-013	Control	2.68	<b>0.010</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Ruminococcaceae_Ruminococcaceae UCG-014	Control	3.76	<b>0.027</b>
Bacteria_Firmicutes_Erysipelotrichia	Control	3.25	<b>0.005</b>
Bacteria_Firmicutes_Erysipelotrichia_Erysipelotrichales	Control	3.25	<b>0.005</b>
Bacteria_Firmicutes_Erysipelotrichia_Erysipelotrichales_Erysipelotrichaceae	Control	3.25	<b>0.005</b>
Bacteria_Firmicutes_Erysipelotrichia_Erysipelotrichales_Erysipelotrichaceae_Erysipelotrichaceae UCG-003	Control	3.00	<b>0.004</b>
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Betaproteobacteriales_Burkholderiaceae_Parasutterella	Control	2.87	<b>0.003</b>
Bacteria_Tenericutes	Control	3.61	<b>0.017</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes	Control	3.61	<b>0.017</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes_Izimaplasmatales_Unassigned	Control	3.30	<b>0.032</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes_Izimaplasmatales_Unassigned_Unassigned	Control	3.31	<b>0.032</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes_Mollicutes RF39	Control	3.70	<b>0.013</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes_Mollicutes RF39_Unassigned	Control	3.52	<b>0.010</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes_Mollicutes RF39_Unassigned_Unassigned	Control	3.51	<b>0.010</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes_Mollicutes RF39_uncultured bacterium	Control	3.38	<b>0.028</b>
Bacteria_Tenericutes_Mollicutes_Mollicutes RF39_uncultured bacterium_uncultured bacterium	Control	3.38	<b>0.028</b>
Bacteria_Verrucomicrobia	Control	3.71	<b>0.010</b>
Bacteria_Verrucomicrobia_Verrucomicrobiae	Control	3.71	<b>0.010</b>
Bacteria_Verrucomicrobia_Verrucomicrobiae_Verrucomicrobiales	Control	3.70	<b>0.027</b>
Bacteria_Verrucomicrobia_Verrucomicrobiae_Verrucomicrobiales_Akkermansiaceae	Control	3.70	<b>0.027</b>
Bacteria_Verrucomicrobia_Verrucomicrobiae_Verrucomicrobiales_Akkermansiaceae_Akkermansia	Control	3.70	<b>0.027</b>
Bacteria_Actinobacteria_Coriobacteriia_Coriobacteriales_Atopobiaceae	DA	-3.29	<b>0.047</b>
Bacteria_Actinobacteria_Coriobacteriia_Coriobacteriales_Atopobiaceae_Olsenella	DA	-3.34	<b>0.046</b>
Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Clostridiales_Lachnospiraceae_Tyzzera 3	DA	-2.83	<b>0.027</b>
Bacteria_Firmicutes_Negativicutes_Selenomonadales_Veillonellaceae_Megasphaera	DA	-3.71	<b>0.006</b>
Bacteria_Firmicutes_Negativicutes_Selenomonadales_Veillonellaceae_uncultured	DA	-2.66	<b>0.015</b>
Bacteria_Fusobacteria	DA	-3.50	<b>0.007</b>

Bacteria_Fusobacteria_Fusobacteriia	DA	-3.62	<b>0.007</b>
Bacteria_Fusobacteria_Fusobacteriia_Fusobacteriales	DA	-3.45	<b>0.007</b>
Bacteria_Fusobacteria_Fusobacteriia_Fusobacteriales_Fusobacteriaceae	DA	-3.49	<b>0.049</b>
Bacteria_Fusobacteria_Fusobacteriia_Fusobacteriales_Fusobacteriaceae_ <i>Fusobacterium</i>	DA	-3.56	<b>0.049</b>
Bacteria_Proteobacteria	DA	-4.22	<b>0.049</b>
Bacteria_Proteobacteria_Deltaproteobacteria_Desulfovibrionales_Desulfovibrionaceae_ <i>Mailhella</i>	DA	-3.12	<b>0.050</b>
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria	DA	-4.23	<b>0.047</b>
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Enterobacteriales_Enterobacteriaceae_ <i>Escherichia-Shigella</i>	DA	-4.23	<b>0.029</b>

**Tabla suplementaria S10.** Asociación de la abundancia relativa de género identificados en el análisis LEfSe con la dislipidemia aterogénica, ajustada por edad, sexo, índice de masa corporal, estuche de extracción y región secuenciada

Género	Ajustado por edad, sexo e IMC			Ajustado por edad, sexo, IMC, estuche y región		
	Coeficiente	<i>p</i>	<i>q</i>	Coeficiente	<i>p</i>	<i>q</i>
<i>[Eubacterium] eligens group</i>	-2.005	<b>0.002</b>	<b>0.045</b>	-2.060	<b>0.002</b>	<b>0.036</b>
<i>Parasutterella</i>	-2.394	<b>0.003</b>	<b>0.046</b>	-2.348	<b>0.002</b>	<b>0.036</b>
<i>Lachnospiraceae FCS020 group</i>	-0.795	<b>0.004</b>	<b>0.046</b>	-0.772	<b>0.005</b>	<b>0.071</b>
<i>Ruminococcaceae UCG 014</i>	-2.175	<b>0.008</b>	<b>0.080</b>	-1.691	<b>0.007</b>	<b>0.071</b>
<i>[Eubacterium] xylanophilum.group</i>	-1.661	<b>0.007</b>	<b>0.080</b>	-2.196	<b>0.007</b>	<b>0.071</b>
<i>Escherichia-Shigella</i>	1.753	<b>0.010</b>	<b>0.082</b>	1.822	<b>0.007</b>	<b>0.071</b>
<i>Fusicatenibacter</i>	-1.527	<b>0.010</b>	<b>0.082</b>	-1.321	<b>0.009</b>	<b>0.078</b>
<i>Christensenellaceae R 7 group</i>	-2.091	<b>0.013</b>	<b>0.086</b>	-2.049	<b>0.014</b>	0.119
<i>Erysipelotrichaceae UCG 003</i>	-1.725	<b>0.014</b>	<b>0.086</b>	-1.503	<b>0.015</b>	0.119
<i>Megasphaera</i>	2.128	<b>0.022</b>	0.111	1.937	<b>0.029</b>	0.189
<i>Olsenella</i>	0.606	<b>0.026</b>	0.125	0.578	<b>0.028</b>	0.189
<i>Ruminiclostridium 6</i>	-1.855	<b>0.033</b>	0.139	-2.030	<b>0.016</b>	0.119
<i>Lachnospiraceae UCG 004</i>	-1.157	<b>0.033</b>	0.139	-1.187	<b>0.031</b>	0.189
<i>Ruminococcaceae UCG 013</i>	-1.399	<b>0.038</b>	0.152	-1.369	<b>0.045</b>	0.241
<i>Coprococcus 1</i>	-1.057	<b>0.042</b>	0.156	-0.906	0.053	0.263
<i>Fusobacterium</i>	1.206	0.051	0.178	1.193	0.055	0.263
<i>[Ruminococcus] gauvreauii.group</i>	-0.585	0.087	0.253	-0.575	0.096	0.383
<i>Anaerostipes</i>	-1.313	0.097	0.263	-0.997	0.106	0.383
<i>Odoribacter</i>	-0.734	0.116	0.304	-0.691	0.140	0.420
<i>Akkermansia</i>	-1.294	0.157	0.336	-1.396	0.127	0.409
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	-0.379	0.221	0.414	-0.347	0.263	0.541
<i>Weissella</i>	-0.341	0.239	0.423	-0.322	0.267	0.541
<i>Blautia</i>	-0.628	0.349	0.573	-0.443	0.471	0.706

Los datos se presentan como coeficientes del modelo lineal generalizado (MaAslin2) en pruebas por pares entre grupos DA y control. Se analizaron 23/26 géneros, presentes en al menos el 25% de los sujetos. Los valores *q* se calcularon mediante la corrección por pruebas múltiples. DA: dislipidemia aterogénica.









**Tabla suplementaria S11.** Correlaciones de la abundancia relativa de géneros identificados en el análisis LEfSe con las concentraciones séricas del C-HDL y triacilglicéridos, cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados e índice de masa corporal

Género	C-HDL			TG			PUFA/SFA				IMC		
	Rho	<i>p</i>	<i>q</i>	Rho	<i>p</i>	<i>q</i>	Rho	<i>p</i>	ajustado por IMC	<i>q</i>	Rho	<i>p</i>	<i>q</i>
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	0.242	<b>0.031</b>	0.132	-0.354	<b>0.001</b>	<b>0.029</b>	0.123	0.281	0.366	0.424	-0.081	0.478	0.572
<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	0.183	0.107	0.270	-0.281	<b>0.012</b>	0.084	0.187	0.098	0.134	0.256	-0.082	0.474	0.572
<i>Akkermansia</i>	0.256	<b>0.023</b>	0.112	-0.209	0.064	0.210	0.242	<b>0.032</b>	0.111	0.132	-0.247	<b>0.028</b>	0.131
<i>[Eubacterium] eligens group</i>	0.311	<b>0.005</b>	0.079	-0.363	<b>0.001</b>	<b>0.026</b>	0.153	0.178	0.336	0.342	-0.165	0.147	0.299
<i>Fusicatenibacter</i>	0.187	0.098	0.256	-0.213	0.059	0.210	-0.046	0.688	0.728	0.778	0.026	0.821	0.907
<i>Lachnospiraceae FCS020 group</i>	0.178	0.118	0.278	-0.211	0.062	0.210	-0.011	0.924	0.952	0.970	0.059	0.608	0.695
<i>Anaerostipes</i>	0.129	0.256	0.420	-0.137	0.228	0.399	-0.116	0.308	0.167	0.445	-0.113	0.323	0.461
<i>Ruminiclostridium</i>	0.090	0.431	0.553	-0.164	0.150	0.300	0.082	0.473	0.672	0.572	-0.120	0.293	0.429
<i>Ruminiclostridium 6</i>	0.246	<b>0.029</b>	0.131	-0.369	<b>0.001</b>	<b>0.026</b>	0.276	<b>0.014</b>	0.052	0.084	-0.237	<b>0.035</b>	0.142
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0.194	0.087	0.256	-0.312	<b>0.005</b>	0.079	0.222	<b>0.049</b>	0.181	0.190	-0.272	<b>0.015</b>	0.084
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	0.200	0.077	0.241	-0.190	0.093	0.256	0.023	0.839	0.788	0.909	0.021	0.853	0.915
<i>Blautia</i>	0.135	0.234	0.399	-0.140	0.220	0.399	-0.098	0.392	0.243	0.516	-0.098	0.392	0.516
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	0.284	<b>0.011</b>	0.084	-0.418	<b>1x10<sup>-4</sup></b>	<b>0.007</b>	0.138	0.224	0.414	0.399	-0.168	0.139	0.299
<i>Parasutterella</i>	0.272	<b>0.015</b>	0.084	-0.275	<b>0.014</b>	0.084	0.030	0.793	0.952	0.886	-0.122	0.283	0.424
<i>Odoribacter</i>	0.265	<b>0.018</b>	0.096	-0.165	0.145	0.299	0.284	<b>0.011</b>	<b>0.033</b>	0.084	-0.191	0.092	0.256
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	0.178	0.117	0.278	-0.180	0.112	0.278	-0.087	0.446	0.272	0.559	-0.108	0.343	0.475
<i>Ruminococcaceae UCG-013</i>	0.278	<b>0.013</b>	0.084	-0.423	<b>1x10<sup>-4</sup></b>	<b>0.007</b>	0.002	0.984	0.965	0.984	0.008	0.942	0.970
<i>Coprococcus 1</i>	0.146	0.201	0.372	-0.298	<b>0.008</b>	0.084	-0.102	0.370	0.347	0.500	-0.003	0.980	0.984
<i>Weissella</i>	0.107	0.347	0.475	-0.166	0.145	0.299	-0.004	0.974	0.764	0.984	0.122	0.286	0.424
<i>[Ruminococcus] gauvreauii group</i>	0.129	0.258	0.420	-0.133	0.243	0.408	0.084	0.462	0.428	0.572	0.009	0.935	0.970
<i>Escherichia-Shigella</i>	-0.123	0.279	0.424	0.214	0.059	0.210	-0.074	0.519	0.739	0.613	0.125	0.274	0.424
<i>Megasphaera</i>	-0.273	<b>0.015</b>	0.084	0.284	<b>0.011</b>	0.084	-0.136	0.234	0.443	0.399	0.176	0.120	0.278
<i>Fusobacterium</i>	-0.167	0.141	0.299	0.211	0.063	0.210	-0.093	0.414	0.540	0.538	0.088	0.443	0.559
<i>Olsenella</i>	-0.189	0.095	0.256	0.122	0.286	0.424	-0.062	0.588	0.792	0.679	0.111	0.331	0.465
<i>Mailhella</i>	-0.146	0.198	0.372	0.196	0.084	0.255	-0.064	0.576	0.872	0.673	0.155	0.172	0.337
<i>Tyzzerella 3</i>	-0.171	0.132	0.298	0.284	<b>0.011</b>	0.084	0.016	0.890	0.832	0.945	0.025	0.828	0.907

Correlación por Rho de Spearman de la abundancia relativa (%) de géneros identificados con las concentraciones séricas de C-HDL y TG (mg/dL), cociente PUFA/SFA e IMC (n=79). Se muestran el coeficiente de correlación (Rho), valor *p* sin corregir y corregido por pruebas múltiples (*q*). C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; TG: triacilglicéridos; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados; IMC: índice de masa corporal.

## Article

# Association of Gut Microbiota with Atherogenic Dyslipidemia, and Its Impact on Serum Lipid Levels after Bariatric Surgery

Priscilla López-Montoya <sup>1,2,3,†</sup>, Daniel Cerqueda-García <sup>1,2,†</sup>, Marcela Rodríguez-Flores <sup>4</sup>, Blanca López-Contreras <sup>1,2</sup>, Hugo Villamil-Ramírez <sup>1,2</sup>, Sofía Morán-Ramos <sup>1,2</sup>, Selene Molina-Cruz <sup>1,2,5</sup>, Berenice Rivera-Paredes <sup>6</sup>, Bárbara Antuna-Puente <sup>7</sup>, Rafael Velázquez-Cruz <sup>8</sup>, Teresa Villarreal-Molina <sup>9</sup>, and Samuel Canizales-Quinteros <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 14610, Mexico
- <sup>2</sup> Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City 14610, Mexico
- <sup>3</sup> Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico
- <sup>4</sup> Unidad de Investigación de Enfermedades Metabólicas, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City 14080, Mexico
- <sup>5</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico
- <sup>6</sup> Centro de Investigación en Políticas, Población y Salud (CIPPS), Facultad de Medicina-UNAM, Mexico City 04510, Mexico
- <sup>7</sup> Infection Disease Division, Department of Medicine, Queen's University, Kingston, ON K7L3N6, Canada
- <sup>8</sup> Laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo, INMEGEN, Mexico City 14610, Mexico
- <sup>9</sup> Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares, INMEGEN, Mexico City 14610, Mexico
- \* Correspondence: canizales@unam.mx
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** López-Montoya, P.; Cerqueda-García, D.; Rodríguez-Flores, M.; López-Contreras, B.; Villamil-Ramírez, H.; Morán-Ramos, S.; Molina-Cruz, S.; Rivera-Paredes, B.; Antuna-Puente, B.; Velázquez-Cruz, R.; et al. Association of Gut Microbiota with Atherogenic Dyslipidemia, and Its Impact on Serum Lipid Levels after Bariatric Surgery. *Nutrients* **2022**, *14*, 3545.

<https://doi.org/10.3390/nu14173545>

Academic Editor: Emile Levy

Received: 26 July 2022

Accepted: 23 August 2022

Published: 28 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Gut microbiota has been suggested to modulate circulating lipids. However, the relationship between the gut microbiota and atherogenic dyslipidemia (AD), defined as the presence of both low HDL-C and hypertriglyceridemia, is not fully understood. Moreover, because obesity is among the main causes of secondary AD, it is important to analyze the effect of gut microbiota composition on lipid profiles after a weight loss intervention. We compared the microbial diversity and taxonomic composition in patients with AD ( $n = 41$ ) and controls ( $n = 38$ ) and sought correlations of genera abundance with serum lipid levels in 20 patients after weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) surgery. Gut microbiota composition was profiled using next-generation sequencing of 16S rRNA. Gut microbiota diversity was significantly lower in atherogenic dyslipidemia. Moreover, relative abundance of two genera with LDA score  $>3.5$  (*Megasphaera* and LPS-producing *Escherichia-Shigella*), was significantly higher in AD subjects, while the abundance of four short chain fatty acids (SCFA) producing-genera (*Christensenellaceae R-7*, *Ruminococcaceae UCG-014*; *Akkermansia* and [*Eubacterium*] *eligens* group) was significantly higher in controls. Notably, [*Eubacterium*] *eligens* group abundance was also significantly associated with higher HDL-C levels in RYGB patients one year after surgery. Although dietary polyunsaturated fatty acid/saturated fatty acid (PUFA/SFA) ratio and PUFA intake were higher in controls than in AD subjects, of the four genera differentiated in cases and controls, only *Akkermansia* abundance showed a positive and significant correlation with PUFA/SFA ratio. Our results suggest that SCFA-producing bacteria promote a healthy lipid homeostasis, while the presence of LPS-producing bacteria such *Escherichia-Shigella* may contribute to the development of atherogenic dyslipidemia.

**Keywords:** gut microbiota; dyslipidemia; HDL-C; triglycerides; 16S rRNA

## 1. Introduction

Dyslipidemia characterized by elevated triglyceride (TG), low HDL cholesterol (HDL-C), and high LDL cholesterol (LDL-C) plasma concentrations are among the main risk factors for cardiovascular disease (CVD) [1,2]. The prevalence of these dyslipidemias varies among ethnic groups and Mexican Americans show a higher prevalence of elevated TG and low HDL-C levels as compared to other ethnic groups in the USA [3]. Low HDL-C levels are a well-known independent epidemiological risk factor for CVD, and this dyslipidemia is highly prevalent in Mexican adults [4–6]. Moreover, the combination of low HDL-C and elevated triglyceride levels is considered as atherogenic dyslipidemia (AD) [7,8].

Among the various lifestyle factors affecting serum lipid levels, habitual intake of nutrients such as dietary fat and unsaturated/saturated fatty acids is closely related to lipid metabolism [9,10], and has been recognized as an important determinant in the development of dyslipidemia [11]. Moreover, it has recently become clear that the gut microbiota contributes to host metabolism regulation, including circulating lipid levels [12–16]. Gut microbiota was found to explain 6% variance of triglyceride and 4% of variance of HDL-C serum levels but has a small effect on LDL-C and total cholesterol levels [12]. Gut microbiota produces enzymes involved in dietary lipid and bile acid metabolism that affect the blood lipid profile of the host. Moreover, gut microbiota may modulate lipid absorption, potentially altering intestinal lipoprotein formation [17]. However, how the plasma lipid profile is modified by the gut microbiota to date is not fully understood.

There are few studies seeking associations between gut microbiota and lipid concentrations in humans, which have consistently reported that lower gut microbiota alpha-diversity is associated with higher triglyceride and lower HDL-C levels. Although several genera have been associated with lipid levels, these associations have been inconsistent [12,16,18]. Furthermore, because certain bacterial genera vary in abundance among different ethnicities, it is important to seek these associations in populations with a high prevalence of dyslipidemias, such as the Mexican population.

Obesity is intimately associated with the development of dyslipidemia [19,20]. Different weight loss interventions are known to improve triglyceride and HDL-C levels [21,22]. Notably, patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) surgery show significant changes in the gut microbiota along with improved lipid levels [23]. However, whether the post-RYGB gut microbiota profile is associated with improvement of lipid levels after bariatric surgery requires further study.

Thus, we analyzed case–control associations of gut microbiota with atherogenic dyslipidemia (low HDL-C and hypertriglyceridemia), and its effect on serum lipid levels after bariatric surgery.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Populations

We studied 41 subjects with AD, and 38 controls aged 18 or older recruited as part of the Health Workers Cohort Study and at the Hospital Infantil de México Federico Gómez in Mexico City. Participants were recruited as described elsewhere [24,25]. Exclusion criteria included the use of antibiotics three months before recruitment or the use of lipid lowering drugs in subjects without a diagnosis of dyslipidemia. Additionally, 20 patients with obesity undergoing laparoscopic RYGB were recruited from the Bariatric Surgery Program at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición in Mexico City.

The project was approved by the Ethics Committees of participant Institutions, and all participants signed informed consent.

For patients with AD and controls, anthropometric parameters such as weight, height, waist and hip circumferences were measured by trained personnel following standardized procedures and calibrated equipment. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by squared height (meters) and obesity was considered as BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> according to the World Health Organization (WHO) classification (WHO, 2021). For



patients undergoing bariatric surgery, all measurements were taken by nutritionists of a multidisciplinary team, before and 12 months after the intervention.

### 2.2. Habitual Dietary Intake Assessment

A semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) previously validated in the Mexican population [26] was used to evaluate habitual dietary intake. This questionnaire assesses the consumption of 116 food items during the previous year. For calculating average daily energy and nutrient intake, data from the FFQ were captured and computed through the Evaluation System of Nutritional Habits and Nutrient Intake software [27]. Daily consumed grams of proteins, carbohydrates and different types of fats such as monounsaturated fatty acids (MUFAs), polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and saturated fatty acids (SFAs) were converted to kilocalories using the corresponding Atwater factor [28]. In this way, consumption of each macronutrient was expressed as the percentage of the daily energy intake. The total dietary fiber intake in grams was standardized per 1000 kilocalories to reduce inter-individual energy intake variation.

### 2.3. Biochemical Determinations

Blood samples were drawn after 8–12 h of overnight fasting to determine serum levels of glucose, total cholesterol, triglycerides, and HDL-C. Atherogenic dyslipidemia was defined as the simultaneous presence of elevated levels of triglycerides  $\geq 150$  mg/dL and low HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol)  $< 40$  mg/dL in men and  $< 45$  mg/dL in women [29]. Type 2 diabetes was defined considering a fasting glucose measurement  $\geq 126$  mg/dL or previous self-reported diagnosis [30].

### 2.4. Stool Sampling

Fecal samples were collected at home in a sterile polypropylene container following printed instructions to avoid contamination. Aliquots of 180–220 mg were stored at  $-70$  °C until processing. DNA was extracted from aliquots using QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool or Power fecal kit (Qiagen, Hilden, Germany.) adding a previous step of mechanical sample lysis with a FastPrep device. The final elution volume was 200  $\mu$ L and was stored at  $-20$  °C until further analysis. DNA concentration and purity were determined by spectrophotometry (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

### 2.5. 16S rRNA Sequencing

DNA samples from 30 AD patients and 31 controls were sequenced using the primers 515F and 806R of the 16S rRNA gene V4 hypervariable region as described elsewhere [31]. Samples from the remaining 11 AD cases, 7 controls and the 20 RYGB patients before and 12 months after surgery were sequenced to amplify the 16S rRNA gene V3-V4 region, following the protocol for Illumina library preparation. Briefly, a first PCR was run using the primers with attached overhang adapters. The amplicons were purified using AMPure XP beads (Beckman Coulter). A second PCR was executed employing the Nextera XT Index Kit (Illumina) to incorporate dual indices and the Illumina sequencing adapters. The resulting libraries were purified with AMPure XP beads, amplicon size and concentrations were assessed with an Agilent D1000 ScreenTape for 4200 TapeStation System (Agilent Technologies) and a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen), respectively. Both sequencing protocols were carried out at the Sequencing Unit of the National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN) using the Illumina MiSeq platform.

### 2.6. Sequence Processing

The paired-end raw reads were processed using the QIIME2 pipeline [32]. Forward reads of the V3-V4 region were trimmed at position 194 in the 5' and reverse reads were trimmed at position 20 in the 5', with truncation at position 240 in the 3'. Forward V4 region reads were trimmed at position 20 in the 5', the reverse reads at position 38 in the 5', with truncation at position 220 in the 3'. A 220 bp segment was shared by reads obtained

from the V3-V4 and V4 sequence protocols and was used for all analyses. The DADA2 plugin [33] was used for error correction and resolution of the amplicon sequence variants (ASVs), chimeric sequences were removed with the “consensus” method. After resolution, ASVs were grouped in operational taxonomic units (OTUs) at 97% identity using the “cluster-features-open-reference” plugin with the V-SEARCH algorithm [34] and the SILVA database (v.132). A phylogenetic tree was built with OTU representative sequences using the “align-to.three-mafft-fasttree” plugin [35,36]. Thereafter, samples were standardized by rarefaction at a 19,000 high-quality read depth, with a total of 2,261,000 reads.

### 2.7. Bioinformatic Analysis

The OTU abundance table and phylogeny tree were exported to the R (v. 4.1.1) environment for further analysis with the phyloseq package (v1.38.0) [37]. Alpha diversity was evaluated with the number of observed OTUs, Chao1, Shannon and Simpson indices. Weighted and unweighted UniFrac distance metrics were used to estimate beta diversity. A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was used to test differences in beta diversity between groups, using the Vegan package (v2.5.7) and applying the adonis function and 9999 permutations [38].

Microbial composition differences between AD cases and controls from the phylum to genus level groups were assessed by Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe v1.0) [39]. A LDA score  $>2.0$  and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The possible effect of age, sex and BMI as covariates was assessed using multivariate linear models (MaAsLin2 v1.4.0) [40]. Analyses in MaAsLin2 were performed using default parameters. Predicted functional microbiota profiling was achieved using PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States; Version 2.2.0) [41]. The metabolic pathways were annotated by MetaCyc database [42], and differences between AD and controls were assessed using LEfSe v1.0. Metabolic pathways with LDA score  $> 2.0$  and  $p < 0.05$  were considered as statistically significant. All plots were created using R (v4.1.1).

### 2.8. Statistical Analysis

Shapiro–Wilk and Levene tests were used to verify normal distribution of the data. The Mann–Whitney U test was conducted to compare non-normally distributed variables between AD patients and controls and the Wilcoxon signed rank test to compare variables before and after RYGB surgery. A two-tailed Student’s *t*-test was used to compare diversity indices, and  $X^2$  test was used to compare categorical variables. These analyses were performed using SPSS (version 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R (version 4.1.1). Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ . Spearman correlations between relative genera abundance, BMI, HDL-C and triglyceride serum levels, PUFA/SFA ratio and nutrient intake were tested in R (version 4.1.1). For bariatric surgery analyses, only genera with a relative abundance  $>1\%$  in at least 25% of participants were analyzed. Pearson partial correlation analyses were implemented adjusting for BMI. *p*-values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method [43].

## 3. Results

As expected, individuals with atherogenic dyslipidemia showed higher TG and lower HDL-C serum levels compared to control group. Moreover, the AD group showed higher BMI and lower total cholesterol serum levels (Table 1).

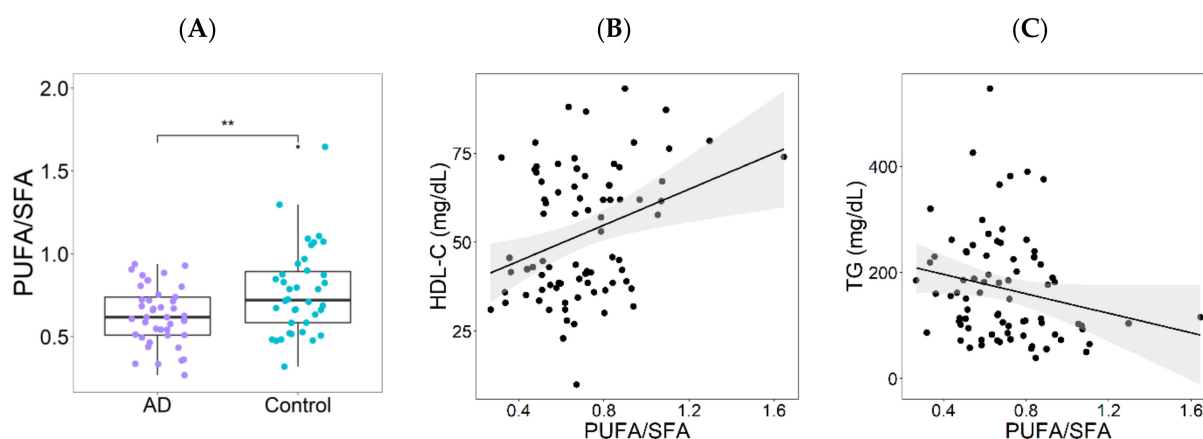
**Table 1.** Comparison of anthropometric and biochemical characteristics in atherogenic dyslipidemia subjects and controls.

Trait	Atherogenic Dyslipidemia (n = 41)	Control (n = 38)	p
Female, n (%)	31 (75.6)	32 (84.2)	0.342
Age, years	59.0 (48.0–69.5)	55.0 (35.0–64.0)	0.160
BMI, kg/m <sup>2</sup>	27.9 (26.3–30.7)	24.1 (21.9–26.9)	1.0 × 10 <sup>−5</sup>
HDL-C, mg/dL	38.0 (33.0–41.8)	67.9 (61.9–73.9)	2.1 × 10 <sup>−14</sup>
Triglycerides, mg/dL	229.0 (183.5–267.5)	90.0 (71.3–108.0)	2.1 × 10 <sup>−14</sup>
Non HDL-C, mg/dL	139.0 (122.6–163.5)	137.7 (115.9–160.9)	0.312
Total cholesterol, mg/dL	179.0 (161.0–197.5)	208.0 (180.0–229.3)	0.004
Fasting glucose, mg/dL	99.0 (92.5–109.5)	92.5 (85.8–97.3)	0.002
Diabetes, n (%)	6 (14.6)	3 (7.9)	0.207
Hypolipidemic treatment, n (%)	9 (22.0)	0 (0)	0.002

Data are presented as median (interquartile range) or as number (percentage). BMI, Body mass index; HDL-C, High density lipoprotein cholesterol.

### 3.1. Dietary Patterns in the Atherogenic Dyslipidemia and Control Groups

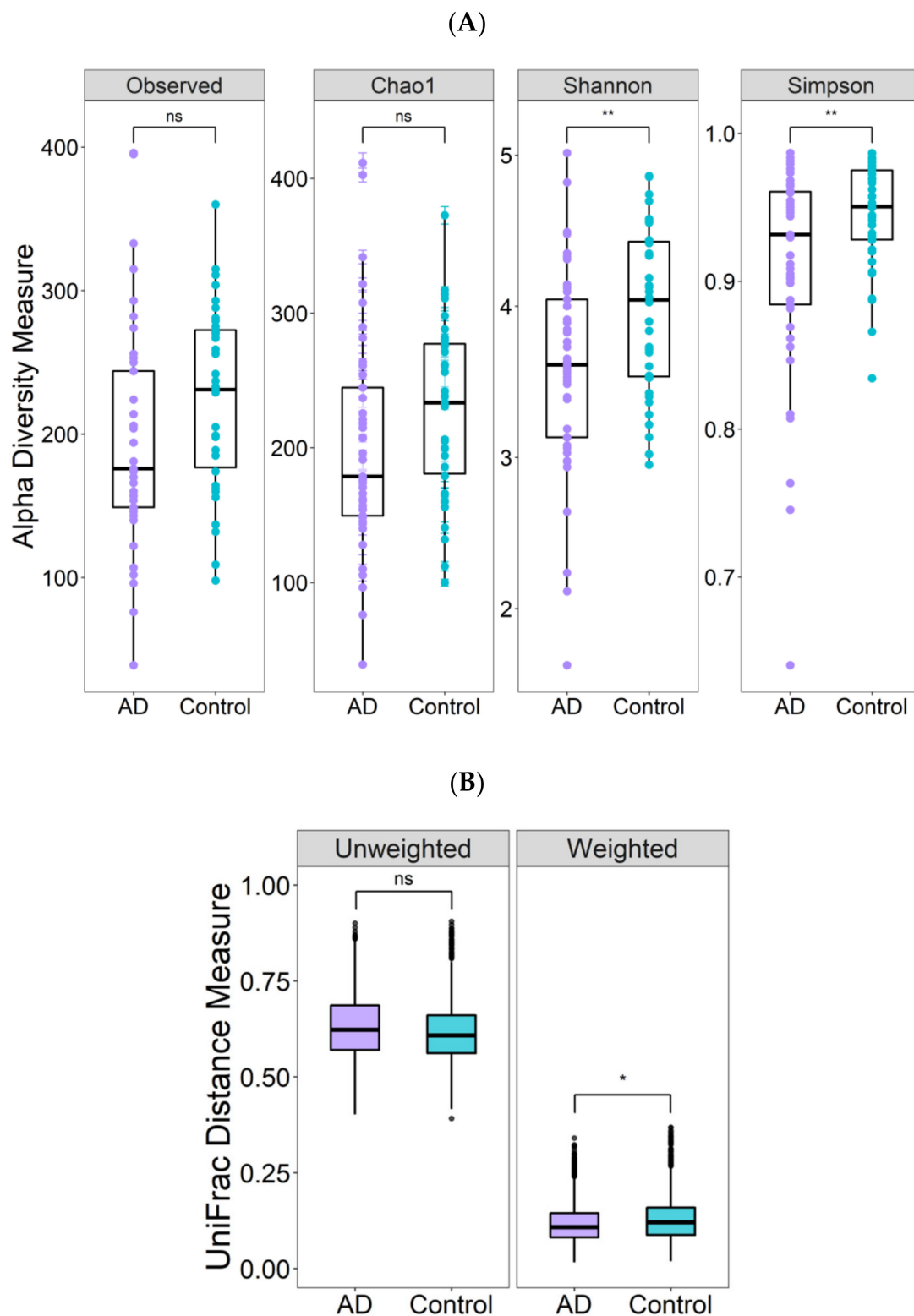
Median dietary carbohydrate percentage in AD individuals was slightly higher, while median dietary fat percentage was lower than macronutrient proportion recommendations for a healthy diet in both groups [44]. Differences in macronutrient proportions between groups were not significant. Notably, the only significant difference in nutrient intake identified between groups was higher proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA) intake in controls (Supplementary Table S1). PUFA/SFA ratio was significantly lower in individuals with atherogenic dyslipidemia as compared to the control group (Figure 1A). Moreover, in the whole population PUFA/SFA ratio showed a positive correlation with HDL-C levels (Rho = 0.256,  $p = 0.023$ ) and a negative correlation with triglyceride serum levels (Rho = −0.240,  $p = 0.033$ ; Figure 1B,C).



**Figure 1.** PUFA/SFA ratio and atherogenic dyslipidemia (AD). (A) Median PUFA/SFA ratio in study groups. (B) Spearman correlation between HDL-C serum levels and PUFA/SFA ratio including the whole study population (Rho = 0.256;  $p = 0.023$ ). (C) Spearman correlation between TG serum levels and PUFA/SFA ratio (Rho = −0.240;  $p = 0.033$ ). PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; HDL-C, high density lipoprotein -cholesterol; TG triglycerides. \*\*  $p < 0.005$ .

### 3.2. Differences in Gut Microbiota Diversity

Alpha diversity estimated by the number of observed species, Chao1, Shannon and Simpson indices was lower in the AD group, although only the comparisons of the Shannon and Simpson indices were statistically significant (Figure 2A;  $p < 0.005$ ). Regarding beta-diversity, significant differences between AD individuals and controls were observed only for the weighted Unifrac distance ( $p < 0.05$ , Figure 2B).



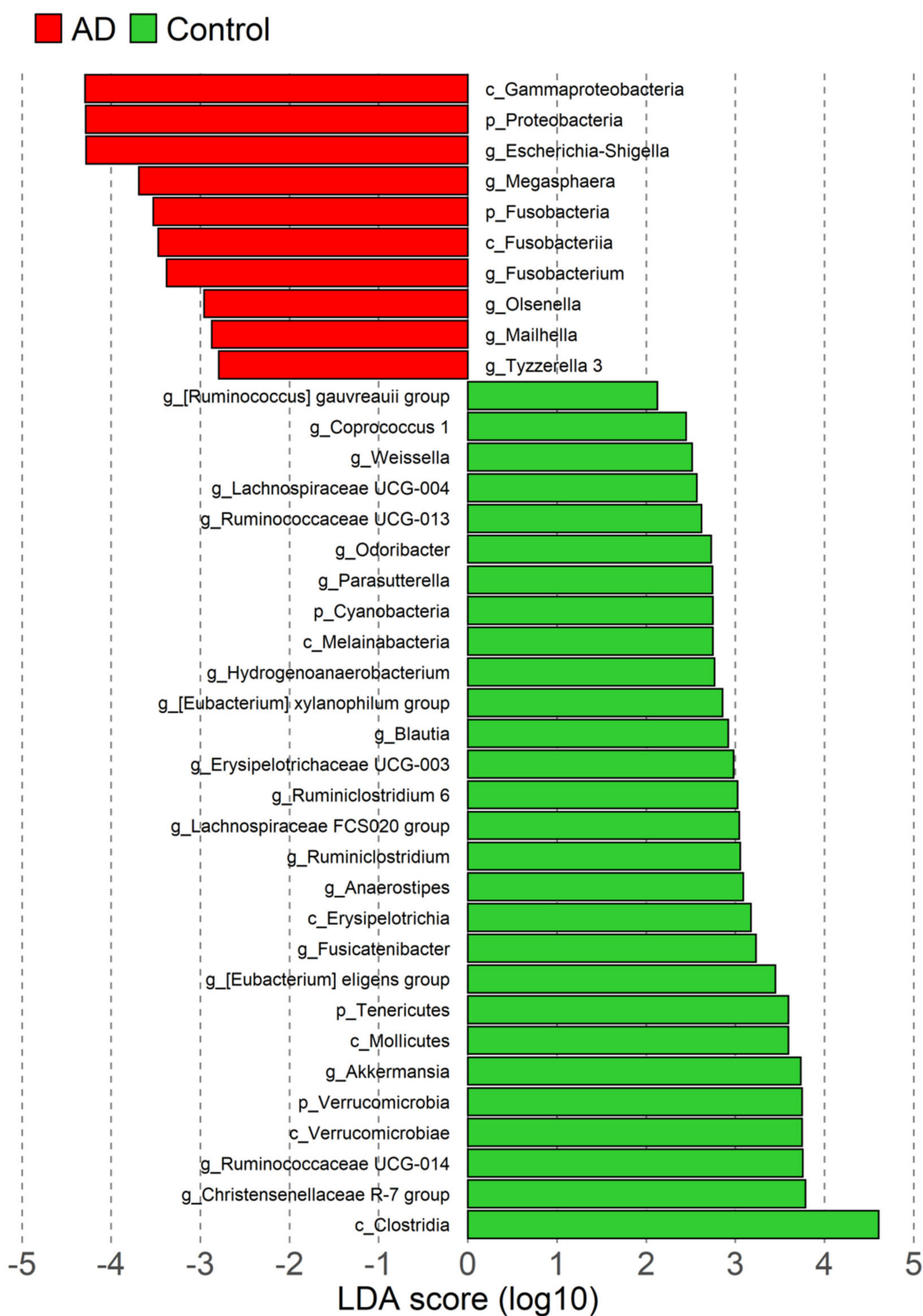
**Figure 2.** Comparison of gut microbiota diversity in atherogenic dyslipidemia (AD) patients and controls. **(A)** Alpha diversity estimates: Observed OTUs, Chao1, Shannon and Simpson indices; the plotted data represent medians and interquartile ranges. **(B)** Beta diversity estimates; the plotted data represent the weighted (F-value= 2.298; R-value= 0.0289) and unweighted (F-value= 1.299; R-value= 0.017) UniFrac distances; *p*-value was obtained using a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.05; ns, not significant.

### 3.3. Taxonomic Gut Microbiota Differences

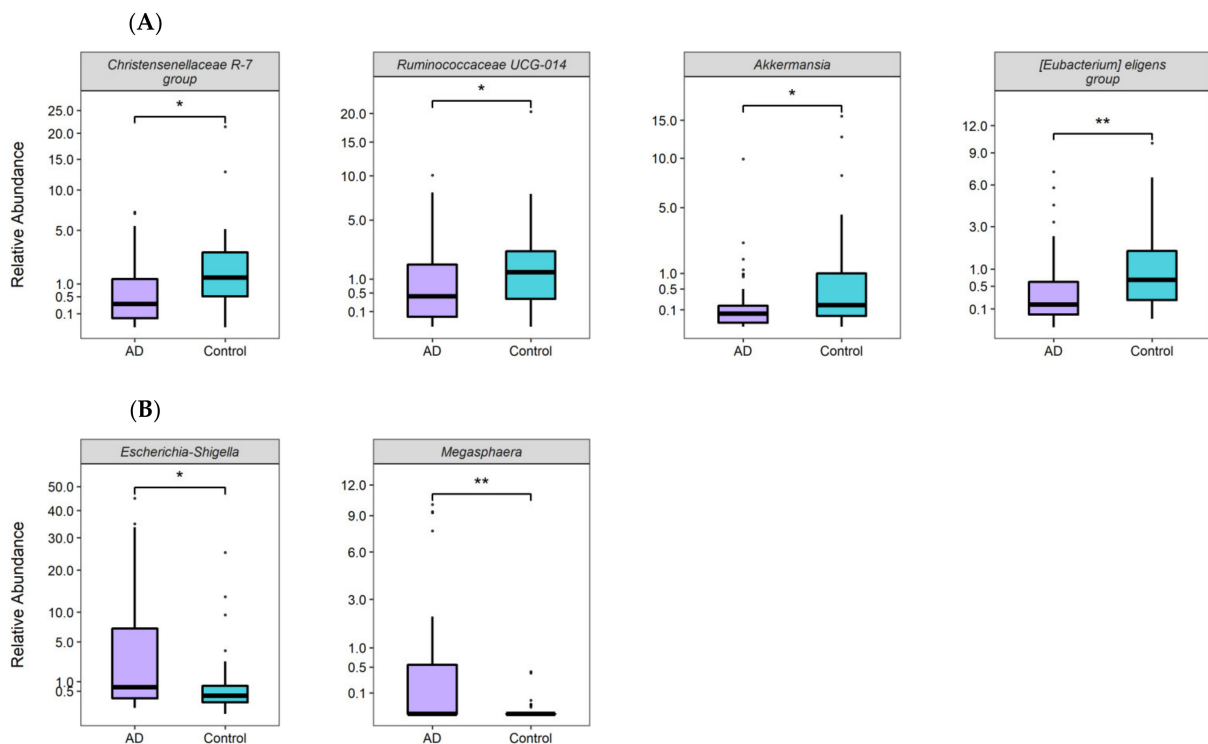
The average relative abundance of the gut microbiota at the phylum, class and genus levels in AD patients and controls is shown in Supplementary Figures S1–S3. The most abundant phyla in AD subjects and controls were Firmicutes (46.7% and 53.0%, respectively) and Bacteroidetes (43.5% and 37.2%, respectively); the most abundant classes were Clostridia (40.2% in AD and 48.5% in controls) and Bacteroidia (43.5% in AD and 37.2% in controls); while the most abundant genera were *Bacteroides* (20.9% in AD and 18.0% in controls) and *Prevotella* 9 (13.7% in AD and 11.3% in controls).

LEfSe analysis revealed that the relative abundance of five of the ten most abundant phyla showed significant differences between AD patients and controls, Proteobacteria and Fusobacteria were more abundant in AD subjects, while Cyanobacteria, Verrucomicrobia and Tenericutes were more abundant in controls. In addition, the relative abundance of two classes was higher in AD subjects (Gammaproteobacteria and Fusobacteria), and 5 classes were more abundant in controls (Clostridia, Verrocomicrobiae, Mollicutes, Erysipelotrichiae and Melainabacteria). Finally, relative abundance of 20/198 genera was significantly higher in controls (Figure 3), including 4 with LDA score  $>3.5$  (*Christensenellaceae* R-7, *Ruminococcaceae* UCG-014, *Akkermansia* and [*Eubacterium*] *eligens* group); while 6/198 genera were significantly more abundant in the AD group, including 2 with LDA  $> 3.5$  (*Escherichia-Shigella* and *Megasphaera*) (Figure 4). Afterwards, 23 of the 26 genera differentiated by LEfSe were analyzed with MaAsLin2. After adjusting for age, sex and BMI, 12 genera were significantly more abundant in controls and 3 were more abundant in AD. Notably, all associated genera with LDA score  $> 3.5$  were concordant in the MaAsLin2 analysis ( $p \leq 0.01$ ,  $q \leq 0.1$ ), except for *Akkermansia*, as its association lost significance after adjusting for confounders ( $p = 0.156$ ,  $q = 0.335$ ; Supplementary Table S2).

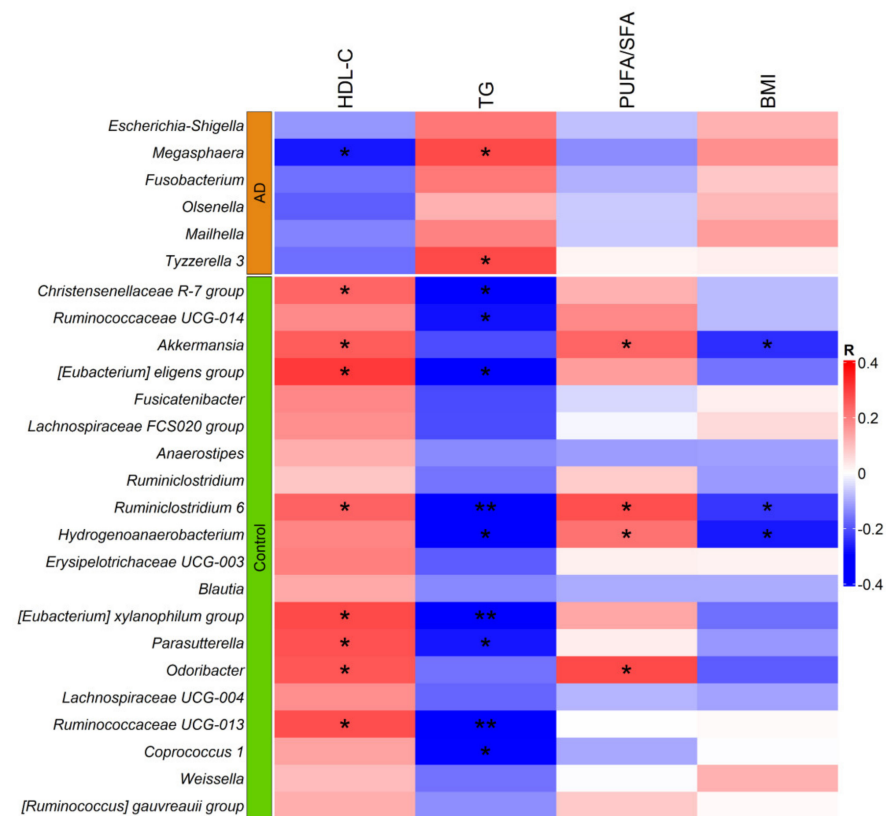
The relative abundance of these 26 genera was then tested for correlations with HDL-C and TG levels in the entire sample (AD patients and controls). As expected, all 6 genera found to be more abundant in subjects with AD correlated negatively with HDL-C levels and positively with TG levels, although only the correlations of *Megasphaera* genus abundance with both lipid parameters were significant. Similarly, all 20 genera more abundant in controls correlated positively with HDL-C and negatively with TG levels. Six of these genera correlated significantly with both lipid parameters ( $p < 0.05$ ). Notably, the negative correlations of *Ruminococcaceae* UCG-013, [*Eubacterium*] *xylanophilum* group, *Ruminiclostridium* 6, [*Eubacterium*] *eligens* group and *Christensenellaceae* R-7 group with TG levels remained significant after correcting for multiple tests ( $q < 0.05$ ). Moreover, 4 microbial genera found to be more abundant in controls (*Akkermansia*, *Ruminiclostridium*-6, *Hydrogenoanearobacterium* and *Odoribacter*), showed a positive correlation with PUFA/SFA ratio ( $p < 0.05$ ;  $q < 0.2$ ). Notably, only the correlation with *Odoribacter* remained significant after adjusting for BMI ( $p = 0.025$ ), consistent with the negative and significant correlation of *Akkermansia*, *Ruminiclostridium*-6, and *Hydrogenoanearobacterium* abundances with BMI (Figure 5).



**Figure 3.** LEfSe plot showing differentially abundant phyla (p), classes (c) and genera (g) between controls (green) and atherogenic dyslipidemia (AD) subjects (red). LDA score > 2.0 and  $p < 0.05$  indicate statistically significant differences.



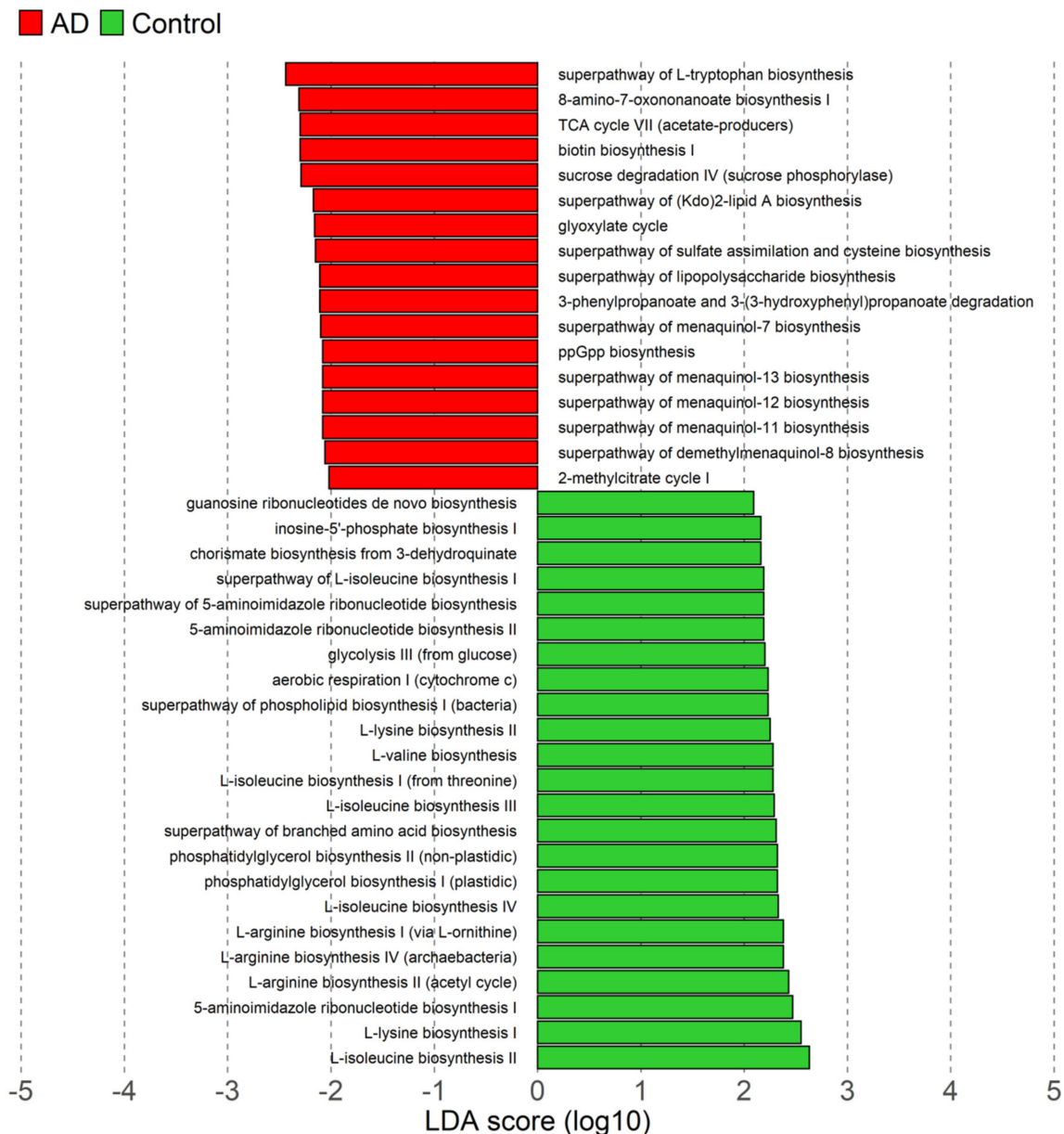
**Figure 4.** Relative abundance of differentiated genera (LDA score >3.5;  $p$ -value < 0.05) between AD individuals and controls. (A) Bacterial genera significantly more abundant in controls; (B) bacterial genera significantly more abundant in subjects with AD. \*  $p$  < 0.05; \*\*  $p$  < 0.005.



**Figure 5.** Heatmap showing correlations of relative genera abundance with HDL-C, TG, PUFA/SFA ratio, and BMI. HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SAF, saturated fatty acids and BMI, body mass index. \*  $p$  < 0.05; \*\*  $p$  < 0.005.

### 3.4. Differences in Microbiota Functional Profiles

To further investigate the potential mechanistic links between the gut microbiota, diet components and AD, a predictive functional analysis was performed. We identified 40 differentiated microbial MetaCyc metabolic pathways between AD and control groups. Overall, 17 pathways were found to be enriched in atherogenic dyslipidemia, including lipopolysaccharide and Kdo2-Lipid A biosynthesis (Figure 6). Moreover, the relative abundance of *Escherichia-Shigella* showed a strong and positive correlation with LPS (Rho = 0.984;  $p = 2.3 \times 10^{-59}$ ) and Kdo2-Lipid A (Rho = 0.787;  $p = 8.0 \times 10^{-18}$ ) biosynthesis pathways.



**Figure 6.** Pathway enrichment analyses and functional categories in AD cases. Pathways and functional categories with LDA score > 2 and  $p < 0.05$  are shown.

### 3.5. Gut Microbiota Associated with TG and HDL-C Levels before and after RYGB Surgery

In patients with RYGB, TG levels decreased while HDL-C levels increased significantly 12 months after surgery ( $p < 0.01$ ; Table 2).

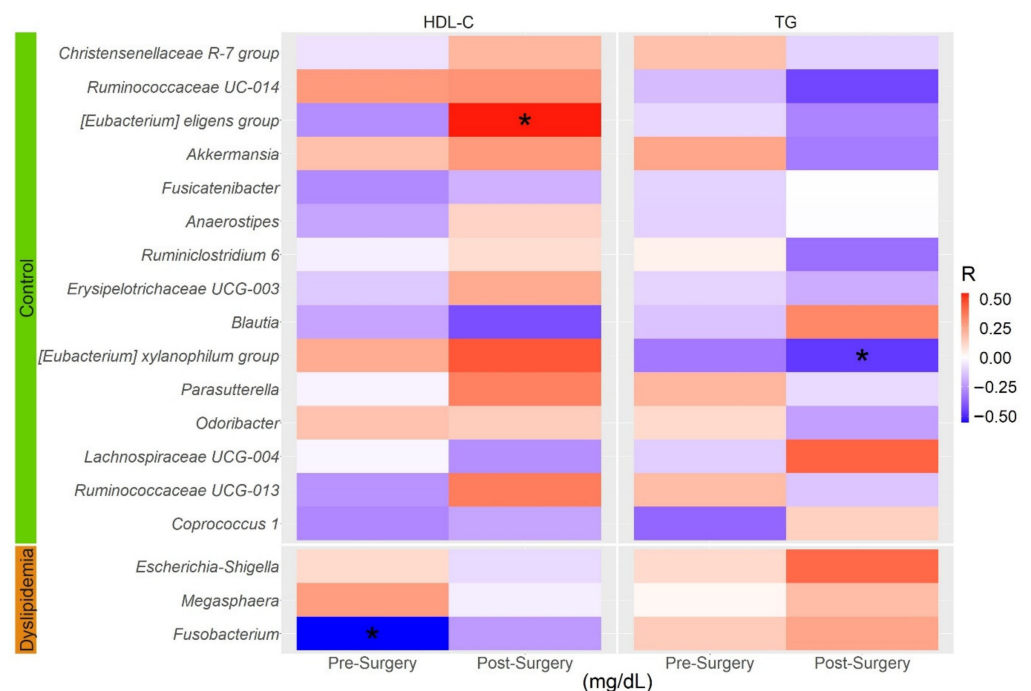


**Table 2.** Comparison of anthropometric and biochemical parameters before and after bariatric surgery.

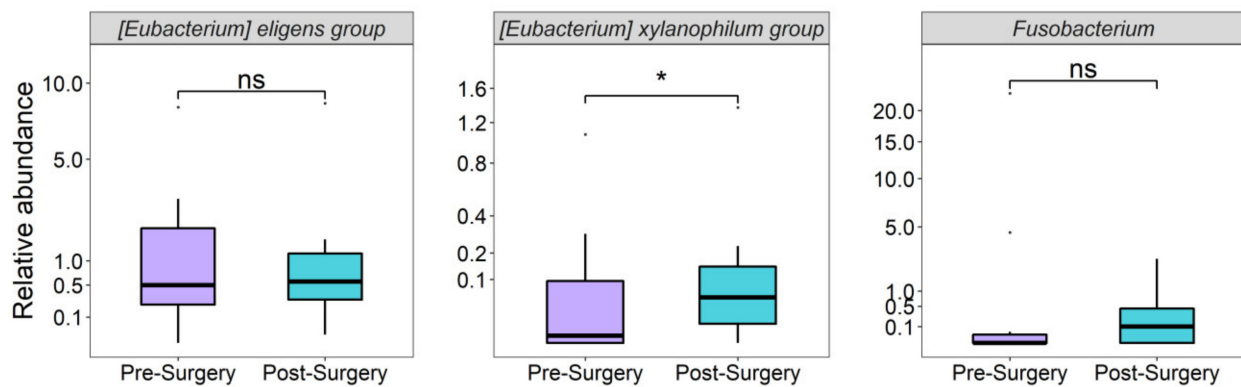
Trait	Pre-Surgery (n = 20)	Post-Surgery (n = 20)	p
Female, n (%)	13 (65.0)	-	-
Age, years	40.0 (31.3–44.8)	-	-
BMI, kg/m <sup>2</sup>	45.7 (42.3–51.9)	32.9 (28.7–36.2)	5.0 × 10 <sup>-6</sup>
HDL-C, mg/dL	35.0 (31.3–41.8)	45.0 (37.0–49.0)	0.001
Triglycerides, mg/dL	159.5 (104.3–180.8)	100.0 (67.0–144.0)	0.011
Total cholesterol, mg/dL	154.5 (136.3–186.5)	86.0 (78.0–96.0)	0.097
Hypolipidemic treatment, n (%)	4 (20.0)	1 (5.0)	0.151

Data are presented as median (interquartile range) or as number (percentage). BMI, Body mass index; HDL-C, High density lipoprotein cholesterol.

We thus sought correlations of the genera differentiated between AD patients and controls found in at least 25% of RYGB participants (18 of the 26 genera), with HDL-C and TG levels in these patients. Before surgery, only a negative and significant correlation between *Fusobacterium* relative abundance and HDL-C levels was observed, consistent with the higher abundance of this genus in AD patients (Figure 7). After surgery, two significant correlations were observed: a positive correlation of *[Eubacterium] eligens* group with HDL-C levels, and a negative correlation of *[Eubacterium] xylanophilum* group with TG levels (Figure 5), which remained significant after adjusting for BMI ( $p < 0.05$ ). Only 10 of the 20 bariatric surgery patients met the diagnostic criteria for AD, whose lipid profiles improved significantly after surgery (Supplementary Table S3). We then compared the relative abundance of these three genera before and after surgery in these 10 patients. Only the relative abundance of *[Eubacterium] xylanophilum* group increased significantly after bariatric surgery in AD subjects ( $p = 0.03$ ; Figure 8), consistent with the positive and negative correlations of this genus with HDL-C and TG levels, respectively, in both study groups (AD cases/controls and bariatric surgery).



**Figure 7.** Heatmap of Spearman's pairwise correlation coefficients between bacterial genera identified by LEfSe and lipid levels. Blue squares indicate negative correlations, and red squares indicate positive correlations. BMI, body mass index; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; TG, triglycerides \*  $p < 0.05$ .



**Figure 8.** Relative abundance of *[Eubacterium] eligens* group, *[Eubacterium] xylanophilum* group and *Fusobacterium* in patients with AD before and after bariatric surgery. \*  $p < 0.05$ , ns; not significant.

#### 4. Discussion

In this study, we found that gut microbiota diversity and abundance were significantly associated with atherogenic dyslipidemia. Decreased alpha diversity was observed in subjects with atherogenic dyslipidemia, in consistency with previous studies in European and Asian populations reporting a negative correlation between gut microbiota diversity and TG levels, and positive correlation with HDL-C levels [12,16,45].

The association of lower abundance of three genera (*Coprococcus 1*, *Christensenellaceae R-7* and *Odoribacter*) with atherogenic dyslipidemia found in the present study is in line with a previous report in a European population from the LifeLines-DEEP cohort [12]. In this cohort, *Coprococcus* abundance showed a strong and negative association with triglyceride levels ( $p = 6 \times 10^{-5}$ ) [12]. *Coprococcus* species are SCFA-producing bacteria, known to decrease lipogenesis and to improve insulin resistance [46]. A recent study reported that omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation increases *Coprococcus* abundance, positively associated with serum levels of SCFA and branched-chain fatty acids, and negatively associated with triglyceride levels [47]. These findings suggest that the cardiovascular benefits associated with a higher PUFA intake may be at least partially mediated by the gut microbiome. However, in the present study *Coprococcus* abundance was not significantly associated with PUFA/SFA ratio. Moreover, *Christensenellaceae* abundance was associated with lower triglyceride levels ( $p = 2 \times 10^{-5}$ ) and higher HDL-C levels ( $p = 0.004$ ) in Europeans. *Christensenellaceae* has been inversely related to host body mass index (BMI) in different populations including Mexican children [48,49]. Because increased BMI is associated with dyslipidemia, an inverse association of *Christensenellaceae R-7* group abundance with dyslipidemia dependent of BMI would be expected [50]. However, we observed that the association *Christensenellaceae* with AD remained significant after adjusting for BMI, suggesting that this association could be independent of BMI. Nevertheless, the mechanism underlying its negative association with atherogenic dyslipidemia remains to be elucidated. Finally, *Odoribacter* genus was associated with lower triglyceride levels in the LifeLines-DEEP cohort ( $p = 0.001$ ) [12]. *Odoribacter* was also found to be associated with a healthy fasting serum lipid profile in European women with obesity [51]. In our study, the association of *Odoribacter* with a healthy lipid profile lost significance after adjusting for BMI. This is consistent with a previous report, where *Odoribacter* abundance was inversely associated with obesity in Mexican children [49]. Interestingly, *Odoribacter*, a SCFA-producing bacterium, has been associated with a healthy fasting serum lipid profile jointly with the SCFA-producing *Akkermansia* [12,51]. Thus, their possible SCFA-mediated role in metabolic disorders such as dyslipidemia, could be BMI dependent.

Notably, we observed higher abundance of *Eubacterium* (*eligens* and *xylanophilum*), *Ruminococcaceae*, *Ruminiclostridium* and *Blautia* genera in controls. All these genera are known to produce different types of SCFAs [52]. Although functional prediction of gut microbiota profiles in controls did not identify enrichment of any metabolic pathway

directly related with SCFA biosynthesis, our results suggest that SCFA-producing bacteria may confer protection against atherogenic dyslipidemia.

In contrast with the control group findings, all genera with increased abundance in AD subjects are not known SCFA-producing bacteria. AD patients showed gut microbiota dysbiosis characterized by an overall reduction in microbial richness and diversity as compared to control subjects. Moreover, 6 genera showed higher abundance in this group, *Escherichia-Shigella* with the highest LDA score. In line with our findings, *Escherichia coli* has been associated with metabolic traits such as higher triglyceride levels [53] and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [54]. It has been suggested that *Escherichia-Shigella* increases intestinal permeability in humans by elevating LPS levels in the gut lumen [55,56]. This is in line with our functional prediction results showing enriched lipopolysaccharide and Kdo2-Lipid A biosynthesis pathways in atherogenic dyslipidemia patients, although bacterial gene expression studies are required to validate the role of these pathways in AD. In animal models, LPS administration produced hypertriglyceridemia by increasing hepatic fatty acid synthesis and adipose tissue lipolysis, while suppressing fatty acid oxidation [57]. Interestingly, increased *Escherichia-Shigella* abundance has been observed following RYGB surgery, with no apparent detrimental effects on the host [58]. However, in an independent study, *Escherichia-Shigella* abundance was significantly correlated with increased LDL-cholesterol levels 3 months after RYGB surgery [23]. In our study, relative *Escherichia-Shigella* abundance increased significantly after RYGB and correlated positively with triglyceride levels and negatively with HDL-C levels, without reaching statistical significance. Further studies with a longer follow-up are needed to assess whether the increased abundance of this genus is in fact metabolically detrimental to the host.

*Fusobacterium* abundance was also significantly increased in the atherogenic dyslipidemia group and showed a negative correlation with HDL-C levels before bariatric surgery. This is consistent with previous studies reporting higher abundance of this genus in subjects with metabolic unhealthy obesity, hypertriglyceridemia and T2D [16,45,59]. Although the mechanism is unclear, several studies suggest that genera highly abundant in metabolic disorders such as *Fusobacterium* are involved in inflammatory processes, possibly altering gut barrier permeability [60].

Of all macronutrients assessed in the FFQ, PUFA intake and PUFA/SFA ratio were significantly lower AD cases than in controls, as previously described for dyslipidemia and other metabolic diseases [61]. Although dietary factors are known to modulate gut microbiota composition, only four of the 26 genera were significantly associated with PUFA/SFA intake ratio: *Akkermansia*, *Ruminiclostridium 6*, *Hydrogenoanaerobacterium* and *Odoribacter*. This suggests that external factors other than diet, and host-related factors such as genetic variation, also can modulate gut microbiota composition [18]. In this regard, *Christensenellaceae*, *Odoribacter* and *Tenericutes* phylum abundance, which was increased in controls, has been found to be highly heritable across multiple populations [48,62]. Because the Mexican population has a high prevalence of atherogenic dyslipidemia, and a particular genetic architecture conferring increased risk of dyslipidemia, studies analyzing the relationships of genetic variation, microbiota composition and dyslipidemia are required in this population.

Several studies have reported that RYGB causes significant changes in microbiota composition [63]. In the present study, one year after surgery only 2 SCFA-producing genera, which were decreased in AD patients, were significantly associated with lipid levels: *[Eubacterium] eligens* group with higher HDL-C levels and *[Eubacterium] xylanophilum* group with lower triglyceride levels. In a previous study, *[Eubacterium] eligens* group showed a strong and negative correlation with visceral abdominal fat area and triglyceride levels, and a positive correlation with HDL-C levels [64]. Likewise, *[Eubacterium] xylanophilum* group showed a negative association with body weight and total serum cholesterol levels [65]. *[Eubacterium] xylanophilum* is a potent butyrate-producing bacterium in the gut. Butyrate increases after RYGB surgery in humans and murine models [66]. It has been suggested that the beneficial effect of butyrate on diet-induced obesity and atherosclerosis

risk is mediated by the regulation of the expression of genes involved in lipid and glucose metabolism [67,68]. Although the abundance of these genera increased after surgery in our AD patients, only [*Eubacterium*] *xylanophilum* was significantly more abundant. Whether these SCFA-producing genera play a relevant role in lipid profile improvement after RYGB surgery requires further study.

Some limitations of the study should be acknowledged. Firstly, this was a cross-sectional study, not allowing to establish a causal relationship between the identified genera and AD. The associations were adjusted for confounders such as BMI, but not for other microbiota modulators such as statin use [69]. Because we used 16rRNA gene sequencing, bacterial metagenome sequencing is required to better identify the species and metabolic pathways associated with atherogenic dyslipidemia. Moreover, gut microbiota metabolites with a possible role in dyslipidemia-related mechanisms such as SCFA and LPS were not measured, and PUFA/SFA intake was not determined in subjects with obesity undergoing bariatric surgery. Finally, as we only included 20 RYGB patients, the associations with lipid profiles found in RYGB patients need to be confirmed in larger cohorts.

## 5. Conclusions

In conclusion, SCFA-producing genera were significantly more abundant in the control group without atherogenic dyslipidemia, and some were associated with a better lipid profile in RYGB patients 12 months after surgery. The significantly lower diversity of the gut microbiota observed in atherogenic dyslipidemia patients was accompanied by increased abundance of potentially pathogenic LPS-producing bacteria such as *Escherichia-shigella*. To our knowledge, this is the first study assessing the association of gut microbiota with atherogenic dyslipidemia, and its impact on serum lipid levels after bariatric surgery.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14173545/s1>, Table S1: Comparison of dietary macronutrient intake in AD cases and controls; Figure S1: Comparison of dietary macronutrient intake in AD cases and controls; Figure S2: LEfSe plot showing differentially abundant phyla between controls and atherogenic dyslipidemia subjects (AD); Table S2: Association of genera abundance adjusting for age, sex and BMI; Figure S3: Pathway enrichment analyses and functional categories in AD cases and controls.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.C.-Q.; study and data analysis, P.L.-M., D.C.-G., M.R.-F., B.L.-C., H.V.-R., S.M.-R., S.M.-C., B.R.-P., B.A.-P., R.V.-C. and T.V.-M.; original draft preparation, P.L.-M., D.C.-G., T.V.-M. and S.C.-Q.; writing—review and editing, M.R.-F., B.L.-C., S.M.-R., S.M.-C., B.R.-P., B.A.-P. and R.V.-C.; funding acquisition, S.C.-Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by a grant from the Mexican National Council for Science and Technology (CONACyT)—Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT (FOSISS), grant number 289699. Daniel Cerqueda-García was supported by a postdoctoral fellowship by Dirección General de Asuntos de Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM). Priscilla López-Montoya and Selene Molina-Cruz were supported by CONACyT scholarships (No. 736470 and No. 620032).

**Institutional Review Board Statement:** Protocols and informed consent forms for each study group were approved as follows: Atherogenic dyslipidemia cases and controls by the Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social (No. 12 CEI 09 006 14, 17 May 2016) and by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Medicina Genómica (CEI 2017/13, 19 July 2017) and bariatric surgery by Ethics Committee at Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (Ref. 1468, 8 April 2015).

**Informed Consent Statement:** All participants provided written informed consent.

**Data Availability Statement:** Data supporting the findings of this study are available on reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors thank Blanca del Río-Navarro from Hospital Infantil de México for her support in obtaining biological samples.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Brown, T.M.; Bittner, V. Biomarkers of atherosclerosis: Clinical applications. *Curr. Cardiol. Rep.* **2008**, *10*, 497–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Aday, A.W.; Everett, B.M. Dyslipidemia Profiles in Patients with Peripheral Artery Disease. *Curr. Cardiol. Rep.* **2019**, *21*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Carroll, M.; Kit, B.; Lacher, D. Trends in elevated triglyceride in adults: United States, 2001–2012. *NCHS Data Brief.* **2015**, *198*, 198.
4. Mahdy Ali, K.; Wonnerth, A.; Huber, K.; Wojta, J. Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol—current therapies and future opportunities. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1177–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Aguilar-Salinas, C.A.; Olaiz, G.; Valles, V.; Torres, J.M.; Gómez Pérez, F.J.; Rull, J.A.; Rojas, R.; Franco, A.; Sepulveda, J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1298–1307. [[CrossRef](#)]
6. Hernández-Alcaraz, C.; Aguilar-Salinas, C.A.; Mendoza-Herrera, K.; Pedroza-Tobías, A.; Villalpando, S.; Shamah-Levy, T.; Rivera-Dommarco, J.; Hernández-Ávila, M.; Barquera, S. Dyslipidemia prevalence, awareness, treatment and control in Mexico: Results of the Ensanut 2012. *Salud. Publica Mex.* **2020**, *62*, 137–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Ballantyne, C.M.; Olsson, A.G.; Cook, T.J.; Mercuri, M.F.; Pedersen, T.R.; Kjekshus, J. Influence of low high-density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on coronary heart disease events and response to simvastatin therapy in 4S. *Circulation* **2001**, *104*, 3046–3051. [[CrossRef](#)]
8. Caselli, C.; De Caterina, R.; Smit, J.M.; Campolo, J.; El Mahdiui, M.; Ragusa, R.; Clemente, A.; Sampietro, T.; Clerico, A.; Liga, R.; et al. Triglycerides and low HDL cholesterol predict coronary heart disease risk in patients with stable angina. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Suburu, J.; Gu, Z.; Chen, H.; Chen, W.; Zhang, H.; Chen, Y.Q. Fatty acid metabolism: Implications for diet, genetic variation, and disease. *Food Biosci.* **2013**, *4*, 1–12. [[CrossRef](#)]
10. Wu, J.H.Y.; Micha, R.; Mozaffarian, D. Dietary fats and cardiometabolic disease: Mechanisms and effects on risk factors and outcomes. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 581–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Pigsborg, K.; Gürdeniz, G.; Rangel-Huerta, O.D.; Holven, K.B.; Dragsted, L.O.; Ulven, S.M. Effects of changing from a diet with saturated fat to a diet with n-6 polyunsaturated fat on the serum metabolome in relation to cardiovascular disease risk factors. *Eur. J. Nutr.* **2022**, *61*, 2079–2089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fu, J.; Bonder, M.J.; Cenit, M.C.; Tigchelaar, E.F.; Maatman, A.; Dekens, J.A.; Brandsma, E.; Marczyńska, J.; Imhann, F.; Weersma, R.K.; et al. The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 817–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rebollo, C.; Cuevas, A.; Zambrano, T.; Acuña, J.J.; Jorquera, M.A.; Saavedra, K.; Martínez, C.; Lanas, F.; Serón, P.; Salazar, L.A.; et al. Bacterial Community Profile of the Gut Microbiota Differs between Hypercholesterolemic Subjects and Controls. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 8127814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Vojinovic, D.; Radjabzadeh, D.; Kurilshikov, A.; Amin, N.; Wijmenga, C.; Franke, L.; Ikram, M.A.; Uitterlinden, A.G.; Zhernakova, A.; Fu, J.; et al. Relationship between gut microbiota and circulating metabolites in population-based cohorts. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5813. [[CrossRef](#)]
15. Le Roy, T.; Lécuyer, E.; Chassaing, B.; Rhimi, M.; Lhomme, M.; Boudebouze, S.; Ichou, F.; Haro Barceló, J.; Huby, T.; Guerin, M.; et al. The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yun, K.E.; Kim, J.; Kim, M.H.; Park, E.; Kim, H.L.; Chang, Y.; Ryu, S.; Kim, H.N. Major Lipids, Apolipoproteins, and Alterations of Gut Microbiota. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Staley, C.; Weingarden, A.R.; Khoruts, A.; Sadowsky, M.J. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 47–64. [[CrossRef](#)]
18. Granado-Serrano, A.B.; Martín-Garí, M.; Sánchez, V.; Riart Solans, M.; Berdún, R.; Ludwig, I.A.; Rubió, L.; Vilaprinyó, E.; Portero-Otín, M.; Serrano, J.C.E. Faecal bacterial and short-chain fatty acids signature in hypercholesterolemia. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bamba, V.; Rader, D.J. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2181–2190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Vekic, J.; Zeljkovic, A.; Stefanovic, A.; Jelic-Ivanovic, Z.; Spasojevic-Kalimanovska, V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* **2019**, *92*, 71–81. [[CrossRef](#)]
21. Chawla, S.; Tessarolo Silva, F.; Amaral Medeiros, S.; Mekary, R.A.; Radenkovic, D. The Effect of Low-Fat and Low-Carbohydrate Diets on Weight Loss and Lipid Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2020**, *12*, 3774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vest, A.R.; Heneghan, H.M.; Agarwal, S.; Schauer, P.R.; Young, J.B. Bariatric surgery and cardiovascular outcomes: A systematic review. *Heart* **2012**, *98*, 1763–1777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Steinert, R.E.; Rehman, A.; Souto Lima, E.J.; Agamennone, V.; Schuren, F.H.J.; Gero, D.; Schreiner, P.; Vonlanthen, R.; Ismaeil, A.; Tzafos, S.; et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery changes fungal and bacterial microbiota in morbidly obese patients—A pilot study. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236936. [CrossRef] [PubMed]
24. Denova-Gutiérrez, E.; Flores, Y.N.; Gallegos-Carrillo, K.; Ramírez-Palacios, P.; Rivera-Paredes, B.; Muñoz-Aguirre, P.; Velázquez-Cruz, R.; Torres-Ibarra, L.; Meneses-León, J.; Méndez-Hernández, P.; et al. Health workers cohort study: Methods and study design. *Salud. Publica Mex.* **2016**, *58*, 708–716. [CrossRef] [PubMed]
25. Martínez-Medina, J.N.; Flores-Lopez, R.; López-Contreras, B.E.; Villamil-Ramirez, H.; Guzman-Muñoz, D.; Macias-Kauffer, L.R.; León-Mimila, P.; Granados-Portillo, O.; Del-Rio-Navarro, B.E.; Gómez-Perez, F.J.; et al. Effect of Gut Microbial Enterotypes on the Association between Habitual Dietary Fiber Intake and Insulin Resistance Markers in Mexican Children and Adults. *Nutrients* **2021**, *13*, 3892. [CrossRef] [PubMed]
26. Hernández-Avila, M.; Romieu, I.; Parra, S.; Hernández-Avila, J.; Madrigal, H.; Willett, W. Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico City. *Salud. Publica Mex.* **1998**, *40*, 133–140. [CrossRef]
27. Hernández-Ávila, J.E.; González-Avilés, L.; Rosales-Mendoza, E. Manual de usuario. In *SNUT Sistema de Evaluación de Hábitos Nutricionales y Consumo de Nutrimientos*; Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, México, 2003.
28. Capuano, E.; Oliviero, T.; Fogliano, V.; Pellegrini, N. Role of the food matrix and digestion on calculation of the actual energy content of food. *Nutr. Rev.* **2018**, *76*, 274–289. [CrossRef]
29. National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **2002**, *106*, 3143–3421.
30. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **2010**, *33* (Suppl. S1), S62–S69. [CrossRef]
31. Moran-Ramos, S.; Lopez-Contreras, B.E.; Villarruel-Vazquez, R.; Ocampo-Medina, E.; Macias-Kauffer, L.; Martinez-Medina, J.N.; Villamil-Ramirez, H.; León-Mimila, P.; Del Rio-Navarro, B.E.; Ibarra-Gonzalez, I.; et al. Environmental and intrinsic factors shaping gut microbiota composition and diversity and its relation to metabolic health in children and early adolescents: A population-based study. *Gut. Microbes* **2020**, *11*, 900–917. [CrossRef] [PubMed]
32. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [CrossRef] [PubMed]
33. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [CrossRef]
34. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584. [CrossRef]
35. Katoh, K.; Toh, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinform.* **2008**, *9*, 286–298. [CrossRef] [PubMed]
36. Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9490. [CrossRef] [PubMed]
37. McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef] [PubMed]
38. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; et al. VEGAN: Community Ecology Package. 2020. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html> (accessed on 25 July 2022).
39. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome. Biol.* **2011**, *12*, R60. [CrossRef] [PubMed]
40. Mallick, H.; Rahnavard, A.; McIver, L.J. MaAsLin 2: Multivariable Association in Population-Scale Meta-Omics Studies. R/Bioconductor Package. 2020. Available online: <http://huttenhower.sph.harvard.edu/maaslin2> (accessed on 25 July 2022).
41. Douglas, G.M.; Maffei, V.J.; Zaneveld, J.R.; Yurgel, S.N.; Brown, J.R.; Taylor, C.M.; Huttenhower, C.; Langille, M.G.I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 685–688. [CrossRef] [PubMed]
42. Caspi, R.; Billington, R.; Fulcher, C.A.; Keseler, I.M.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Midford, P.E.; Ong, Q.; Ong, W.K.; et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D633–D639. [CrossRef] [PubMed]
43. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **1995**, *57*, 289–300. [CrossRef]
44. Trumbo, P.; Schlicker, S.; Yates, A.A.; Poos, M.; Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, T.e.N.A. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J. Am. Diet Assoc.* **2002**, *102*, 1621–1630. [CrossRef]
45. Kim, M.H.; Yun, K.E.; Kim, J.; Park, E.; Chang, Y.; Ryu, S.; Kim, H.L.; Kim, H.N. Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19417. [CrossRef]

46. Agus, A.; Clément, K.; Sokol, H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut* **2021**, *70*, 1174–1182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Vijay, A.; Astbury, S.; Le Roy, C.; Spector, T.D.; Valdes, A.M. The prebiotic effects of omega-3 fatty acid supplementation: A six-week randomised intervention trial. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Goodrich, J.K.; Waters, J.L.; Poole, A.C.; Sutter, J.L.; Koren, O.; Blekhman, R.; Beaumont, M.; Van Treuren, W.; Knight, R.; Bell, J.T.; et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* **2014**, *159*, 789–799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. López-Contreras, B.E.; Morán-Ramos, S.; Villarruel-Vázquez, R.; Macías-Kauffer, L.; Villamil-Ramírez, H.; León-Mimila, P.; Vega-Badillo, J.; Sánchez-Muñoz, F.; Llanos-Moreno, L.E.; Canizalez-Román, A.; et al. Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatr. Obes.* **2018**, *13*, 381–388. [[CrossRef](#)]
50. Waters, J.L.; Ley, R.E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 83. [[CrossRef](#)]
51. Brahe, L.K.; Le Chatelier, E.; Prifti, E.; Pons, N.; Kennedy, S.; Hansen, T.; Pedersen, O.; Astrup, A.; Ehrlich, S.D.; Larsen, L.H. Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. *Nutr. Diabetes* **2015**, *5*, e159. [[CrossRef](#)]
52. Martin-Gallausiaux, C.; Marinelli, L.; Blottière, H.M.; Larraufie, P.; Lapaque, N. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.* **2021**, *80*, 37–49. [[CrossRef](#)]
53. Moreno-Indias, I.; Tinahones, F.J. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J. Diabetes Res.* **2015**, *2015*, 970375. [[CrossRef](#)]
54. Zhu, L.; Baker, S.S.; Gill, C.; Liu, W.; Alkhoury, R.; Baker, R.D.; Gill, S.R. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* **2013**, *57*, 601–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pedersen, C.; Ijaz, U.Z.; Gallagher, E.; Horton, F.; Ellis, R.J.; Jaiyeola, E.; Duparc, T.; Russell-Jones, D.; Hinton, P.; Cani, P.D.; et al. Fecal Enterobacteriales enrichment is associated with increased in vivo intestinal permeability in humans. *Physiol. Rep.* **2018**, *6*, e13649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1761–1772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Feingold, K.R.; Hardardottir, I.; Memon, R.; Krul, E.J.; Moser, A.H.; Taylor, J.M.; Grunfeld, C. Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 2147–2158. [[CrossRef](#)]
58. Graessler, J.; Qin, Y.; Zhong, H.; Zhang, J.; Licinio, J.; Wong, M.L.; Xu, A.; Chavakis, T.; Bornstein, A.B.; Ehrhart-Bornstein, M.; et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: Correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharm. J.* **2013**, *13*, 514–522. [[CrossRef](#)]
59. Sedighi, M.; Razavi, S.; Navab-Moghadam, F.; Khamseh, M.E.; Alaei-Shahmiri, F.; Mehrtash, A.; Amirmozafari, N. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 362–369. [[CrossRef](#)]
60. Gurung, M.; Li, Z.; You, H.; Rodrigues, R.; Jump, D.B.; Morgun, A.; Shulzhenko, N. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine* **2020**, *51*, 102590. [[CrossRef](#)]
61. Buckley, J.D.; Howe, P.R. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity—a review. *Nutrients* **2010**, *2*, 1212–1230. [[CrossRef](#)]
62. Lim, M.Y.; You, H.J.; Yoon, H.S.; Kwon, B.; Lee, J.Y.; Lee, S.; Song, Y.M.; Lee, K.; Sung, J.; Ko, G. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut* **2017**, *66*, 1031–1038. [[CrossRef](#)]
63. Furet, J.P.; Kong, L.C.; Tap, J.; Poitou, C.; Basdevant, A.; Bouillot, J.L.; Mariat, D.; Corthier, G.; Doré, J.; Henegar, C.; et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: Links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* **2010**, *59*, 3049–3057. [[CrossRef](#)]
64. Nie, X.; Chen, J.; Ma, X.; Ni, Y.; Shen, Y.; Yu, H.; Panagiotou, G.; Bao, Y. A metagenome-wide association study of gut microbiome and visceral fat accumulation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 2596–2609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wei, J.; Zhao, Y.; Zhou, C.; Zhao, Q.; Zhong, H.; Zhu, X.; Fu, T.; Pan, L.; Shang, Q.; Yu, G. Dietary Polysaccharide from *Enteromorpha clathrata* Attenuates Obesity and Increases the Intestinal Abundance of Butyrate-Producing Bacterium, *Eubacterium xylanophilum*, in Mice Fed a High-Fat Diet. *Polymers* **2021**, *13*, 3286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Liou, A.P.; Paziuk, M.; Luevano, J.M.; Machineni, S.; Turnbaugh, P.J.; Kaplan, L.M. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 178ra141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lin, H.V.; Frassetto, A.; Kowalik, E.J.; Nawrocki, A.R.; Lu, M.M.; Kosinski, J.R.; Hubert, J.A.; Szeto, D.; Yao, X.; Forrest, G.; et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35240. [[CrossRef](#)]
68. Amiri, P.; Hosseini, S.A.; Ghaffari, S.; Tutunchi, H.; Mosharkesh, E.; Asghari, S.; Roshanravan, N. Role of Butyrate, a Gut Microbiota Derived Metabolite, in Cardiovascular Diseases: A comprehensive narrative review. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 837509. [[CrossRef](#)]
69. Vieira-Silva, S.; Falony, G.; Belda, E.; Nielsen, T.; Aron-Wisnewsky, J.; Chakaroun, R.; Forslund, S.K.; Assmann, K.; Valles-Colomer, M.; Nguyen, T.T.D.; et al. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature* **2020**, *581*, 310–315. [[CrossRef](#)]