



Efecto intestinal del consumo de agua alcalinizada en ratas Zucker obesas y normales.

Laura Doblado¹, Ester Novoa², Sonia Gómez², Ascensión Marcos², Ligia Díaz² & María Monsalve^{1,*}.

- 1 Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM). Arturo Duperier, 4. 28029-Madrid (Spain).
2 Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). José Antonio Novais 10, 28040 Madrid (Spain).
* mpmonsalve@iib.uam.es

Resumen: Para evaluar el efecto intestinal del consumo de agua filtrada alcalinizada se comparó en ratas normales, o ratas obesas Zucker adultas el estado intestinal tras tres meses de bebida de agua filtrada o agua de grifo de Madrid, evaluándose también el efecto de la ingesta de pro-bióticos, que fueron incorporados a la dieta, sobre ratas que tomaron agua filtrada. Se hizo un seguimiento de ganancia de peso, se evaluaron los cambios en el metabolismo mediante calorimetría indirecta, se midió en plasma la capacidad antioxidante total y los niveles de mediadores inflamatorios. Se recogieron heces y se evaluó su composición microbiana y tras el sacrificio se realizó un análisis histológico del intestino delgado y del grueso, valorándose el estado general de la mucosa (Mucin2), el estado inflamatorio (F4/80) y la presencia de modificaciones oxidativas en las proteínas (HNE) mediante inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHQ). Los resultados obtenidos mostraron que el consumo de agua filtrada alcalinizada mejoró la composición del microbioma intestinal y el estado de la mucosa intestinal, redujo la inflamación tanto local como sistémica y el nivel de estrés oxidativo, estos cambios se acompañaron de una mejora en la capacidad oxidativa de las ratas, una reducción de la capacidad antioxidante máxima y un aumento en la ganancia de peso, todos estos efectos indicadores de una mejora sistémica en el estado metabólico y oxidativo general. Estos efectos fueron acentuados por la ingesta de pro-bióticos.

Palabras clave: Agua filtrada alcalinizada, pro-bióticos, intestino, inflamación, metabolismo oxidativo, estrés oxidativo.



Copyright: © 2023 by the authors.
Submitted for possible open access
publication under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introducción

El consumo de agua alcalinizada ha sido recomendado por sus potenciales efectos beneficiosos en la reducción de la acidez estomacal en pacientes con acidosis, hernia de hiato y otras afecciones relacionadas. Sin embargo, no hay estudios científicos que hayan valorado los efectos intestinales del agua alcalinizada más allá de la reducción de la acidosis a nivel estomacal. Teniendo en cuenta que se ha propuesto que el agua alcalinizada puede tener un efecto antioxidante y por tanto anti-inflamatorio (1), decidimos estudiar el efecto intestinal del consumo de esta agua en un modelo de obesidad y valorar si la ingesta de pro-bióticos, un tratamiento habitual para los problemas intestinales, interfería o mejoraba los efectos del agua alcalinizada.

Con este fin se utilizó como modelo ratas Zucker obesas y sus controles ratas Zucker normales (lean). Las ratas Zucker obesas son un modelo de obesidad genética causada por una mutación (fa) en el gen que codifica el receptor de la lectina, una hormona anorexigénica. Estas ratas, que sufren resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, y síndrome metabólico, son el mejor modelo existente en rata para estudios relacionados con la obesidad y la diabetes. Ratas y ratones son los modelos más utilizados para estudios en biomedicina, siendo las ratas fisiológica, morfológica y genéticamente más cercanas a los humanos que los ratones, lo que las hace el modelo ideal para estudios biomédicos y farmacológicos. Se utilizaron ratas macho adultas de 12 semanas de edad, tanto normales (lean) como obesas, a las que se les dio como agua de bebida o bien agua de grifo de Madrid o el mismo agua pero previamente filtrada usando filtros alcalinizantes (Alkanatur). El agua se cambió a diario. A un grupo de ratas se les incluyó en la dieta un pro-biótico (Bevo), ajustando la dosis para que fuera equivalente a la recomendada para humanos. El tratamiento duró tres meses y al finalizar este periodo las ratas fueron sacrificadas para la realización de un estudio histológico.

2. Resultados

Se realizó un control de la ganancia de peso de las ratas cada dos semanas, y se evaluó la ganancia de peso tanto absoluta como relativa (Fig. 1). Los resultados no mostraron diferencias significativas asociadas a los tratamientos excepto a las cuatro semanas de tratamiento, cuando la ganancia relativa (%) del grupo tratado con agua filtrada y dieta con pro-biótico fue significativamente mayor que la del grupo tratado simplemente con agua filtrada, pero esta diferencia no se mantuvo a tiempos más largos de tratamiento. El cálculo de las áreas bajo la curva para los valores absolutos, no mostró diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, por lo que se concluye que los tratamientos no tuvieron un efecto relevante sobre el peso de los animales.

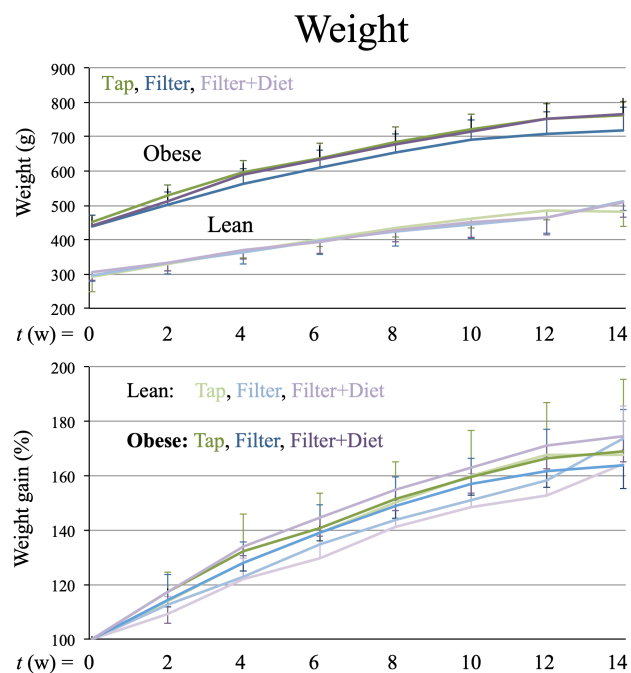


Figura 1. Incremento de peso total (panel superior) y relativo (panel inferior) medido cada dos semanas durante tres meses. La gráfica muestra la media +/- la desviación estándar.

Seguidamente, con el fin de determinar el estado inflamatorio general en las ratas, se evaluaron en muestras de plasma los niveles circulantes de las citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF α y IL-10. Encontrándose cambios significativos en los niveles de IL-1 β e IL-10, citocinas generalmente consideradas como marcadores de tipo M1 y M2, inmunoactivadora e inmunosupresora de macrófagos, respectivamente. Se observó a 6 semanas de tratamiento, mayores niveles de IL-1 β en ratas lean que tomaron agua de grifo que en ratas que tomaron agua filtrada y menores niveles de IL-10 en ratas que tomaron agua de grifo que en ratas que tomaron agua filtrada (Fig. 2), lo que sugiere que la toma de agua alcalinizada favorece un perfil inmunosupresor y anti-inflamatorio.

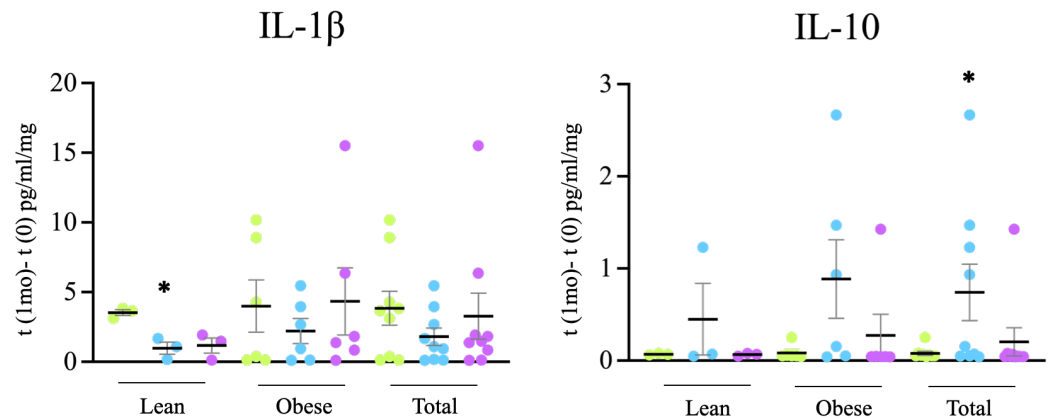


Figura 2. Cambio en los niveles plasmáticos de IL-1 β e IL-10 en relación a los niveles observados a $t = 0$ tras 6 semanas de tratamiento. ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. La gráfica muestra la media y \pm el error SEM. * $p < 0.05$ (t test).

Seguidamente se evaluó como los tratamientos afectaban a la capacidad antioxidante total en plasma, para ello se midió la capacidad antioxidante rápida (Q1), lenta (Q2) y total (QT) utilizando el lector electroquímico e-BQC (BioQuoChem). No observándose diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ni a 1 mes ni a 3 meses (Fig. 3), lo que sugiere que los tratamientos no afectaron de manera global a la capacidad antioxidante de las ratas.

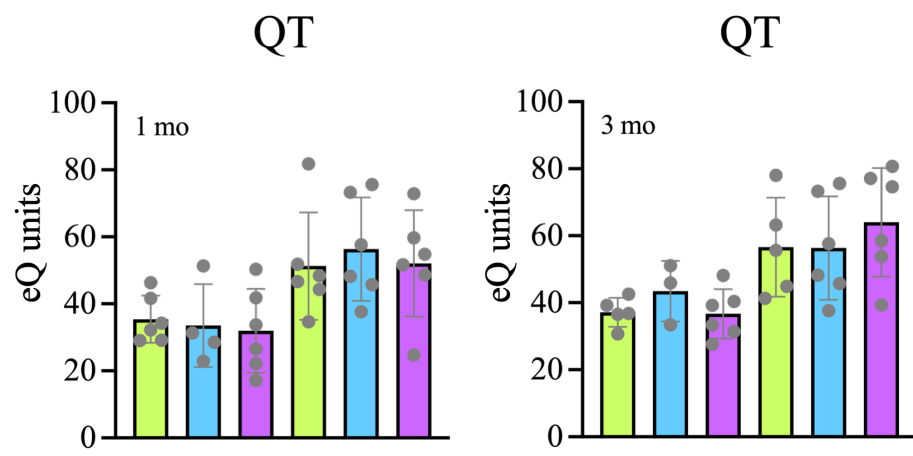


Figura 3. Medida de la capacidad antioxidante total (QT) en muestras de plasma de ratas tratadas 6 semanas (panel izquierdo) o 3 meses (panel derecho). ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. La gráfica muestra las unidades electroquímicas proporcionadas por el lector e-BQC, incluye los valores medios \pm la desviación standard.

Con el fin de analizar el impacto de los tratamientos sobre el metabolismo a nivel sistémico se utilizó un sistema de calorimetría indirecta para determinar el consumo de oxígeno (O $_2$)

y la producción de CO₂ en las ratas y sus cambios en respuesta a los tratamientos a 6 semanas (1,5 meses) y a tres meses (Fig. 4). Los resultados obtenidos mostraron en las ratas control (grifo) un gradual descenso en la actividad metabólica afectando tanto al consumo de O₂ como a la producción de CO₂, estos cambios fueron significativos en el periodo nocturno en ratas normales a los tres meses, y en ratas obesas tanto en el periodo nocturno como en el diurno a los tres meses. La bajada en la producción de CO₂ también fue significativa en las ratas control (grifo) obesas a las 6 semanas. Estas reducciones no se observaron o no alcanzaron significación estadística en los grupos tratados con agua filtrada, con o sin dieta. De hecho, en ratas obesas, la magnitud del cambio fue significativamente menor en ratas tratadas con agua filtrada y pro-biótico que en las ratas control, tanto de día como de noche, afectando tanto al consumo de O₂ como a la producción de CO₂. Estos resultados sugieren que el tratamiento con agua filtrada y especialmente en combinación con pro-biótico mantiene mejor la actividad metabólica que el agua de grifo, especialmente en ratas obesas.

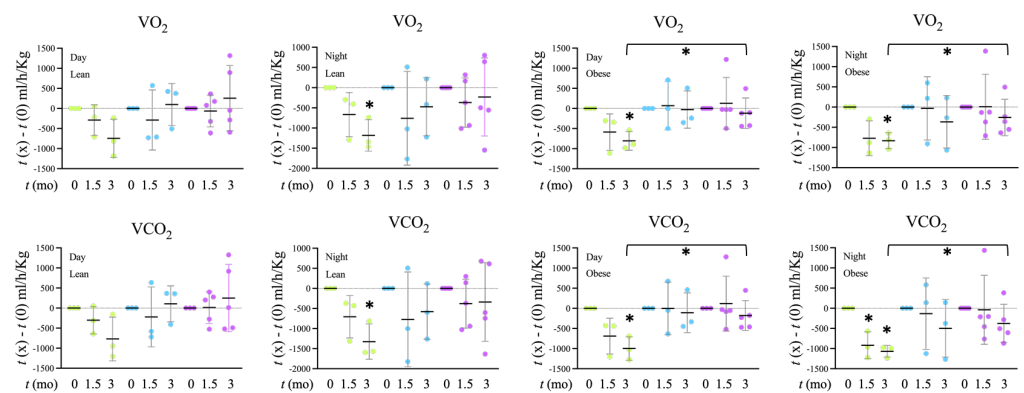
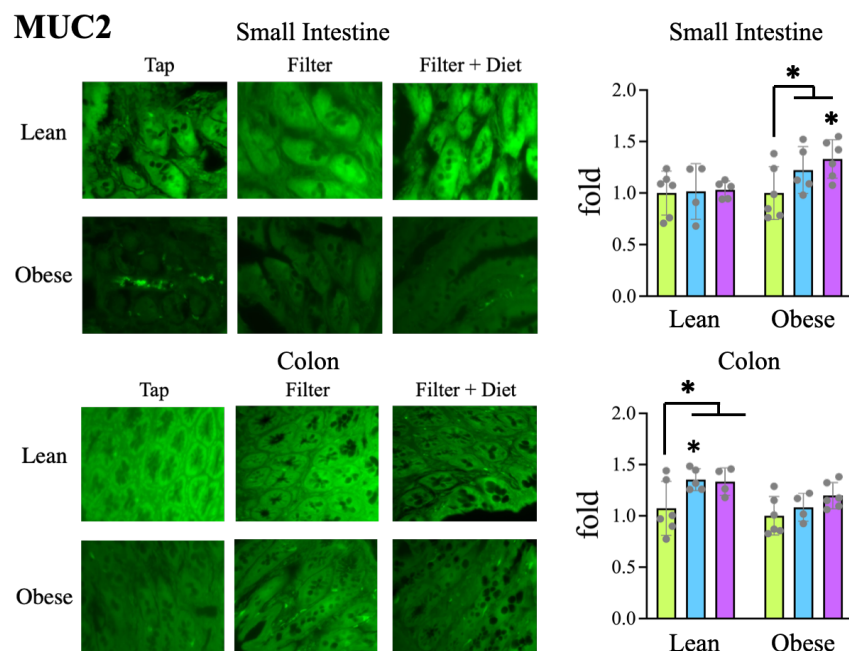


Figura 4. Medida del consumo de oxígeno O₂ (paneles superiores) y la producción de CO₂ (paneles inferiores) mediante calorimetría indirecta en ratas. Las ratas se evaluaron antes del inicio del tratamiento, a las 6 semanas y a los 3 meses de tratamiento. ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. La gráfica muestra las diferencias respecto a los valores obtenidos a tiempo 0 para el volumen de O₂ consumido y CO₂ producido, se incluyen los valores medios +/- la desviación standard. **p*<0.05 (*t* test).



109

110

111

112

113

114

115

116

Figura 5. Determinación de los niveles de MUC2 mediante análisis por IF de cortes de tejido del intestino delgado y del colon. ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. Las gráficas muestran valores relativos a la media del grupo control (grifo), se incluyen los valores medios +/- la desviación estándar. * $p < 0.05$ (*t* test). En el panel izquierdo se incluyen imágenes representativas de los grupos tomadas con un objetivo 20x.

Con el fin de evaluar el impacto a nivel intestinal de los tratamientos, estudiamos el estado de la mucosa intestinal tanto a nivel de intestino delgado como grueso, mediante marcaje por IF de cortes de tejido intestinal con anticuerpos dirigidos contra la Mucina (MUC29, una proteína oligomérica que es un componente fundamental del mucus intestinal. La reducción en los niveles de MUC2 va asociada a una pérdida de la barrera intestinal y favorece el desarrollo de procesos inflamatorios y las infecciones intestinales. Se observó que en ratas normales el tratamiento con agua filtrada aumentaba significativamente los niveles de mucina en el colon. Así mismo, la comparación global de todas las ratas tratadas con agua filtrada (con o sin pro-bióticos), respecto a las control (grifo), mostró un aumento significativo para el caso de las ratas tratadas con agua filtrada. Por otra parte, en ratas obesas, se observó un aumento significativo en los niveles de mucina en las ratas tratadas con agua filtrada y pro-bióticos respecto a las ratas control, la diferencia también fue significativa al comparar de manera global todas las ratas tratadas con agua filtrada (con o sin pro-biótico) con las ratas control (Fig. 5). Estos resultados sugieren que el tratamiento con agua filtrada con o sin pro-bióticos induce un mejor mantenimiento de la mucosa intestinal que el agua de grifo.

Teniendo en cuenta que los cambios en la mucosa se suelen relacionar con el estado inflamatorio de esta y que los resultados que apuntaban a una mejora en el estado inflamatorio a nivel sistémico en ratas tratadas con agua filtrada, se evaluó el nivel de inflamación intestinal mediante la determinación de la presencia de macrófagos mediante tinción por IHQ con un anticuerpo dirigido contra F4/80.

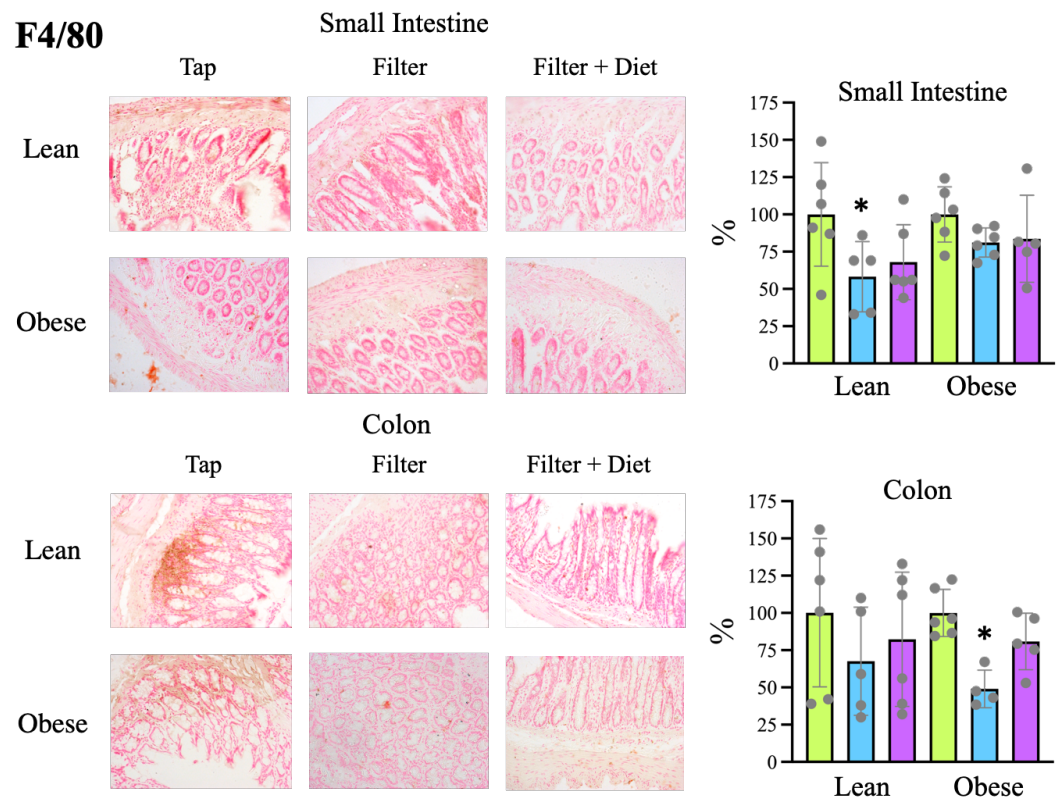


Figura 6. Determinación de la presencia de macrófagos mediante tinción IHQ con anticuerpos contra F4/80 de cortes de tejido del intestino delgado y del colon. ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. Las gráficas muestran valores relativos a la media del grupo control (grifo), se incluyen los valores medios +/- la desviación standard. * $p < 0.05$ (t test). En el panel izquierdo se incluyen imágenes representativas de los grupos tomadas con un objetivo 20x.

El análisis del área de tejido positiva para F4/80 mostró en el intestino delgado de ratas normales y en el colon de ratas obesas una significativamente menor presencia de macrófagos en ratas tratadas con agua filtrada que en ratas que bebieron agua de grifo. Las ratas tratadas con agua filtrada y pro-bióticos mostraron una tendencia similar, pero en este caso las diferencias no alcanzaron significación estadística. Estos datos son consistentes con la observada mejora en la mucosa intestinal y la reducción en la inflamación a nivel sistémico observadas anteriormente, y apoyan la idea general de una mejora en el estado intestinal en ratas tratadas con agua filtrada.

Posteriormente se analizaron los niveles de expresión de las citocinas IL-1 β e IL-10 en el tejido intestinal. Se observó que los niveles de IL-1 β en el intestino delgado de las ratas tratadas con agua filtrada y pro-bióticos eran inferiores a los de ratas control. Sin embargo, para los otros grupos no se identificaron cambios significativos, aunque en ratas obesas el grupo de ratas tratadas con agua filtrada mostró una tendencia a menores niveles de IL-1 β y mayores de IL-10 que las ratas tratadas con agua de grifo, tanto en intestino delgado como grueso, que es consistente con los resultados anteriores.

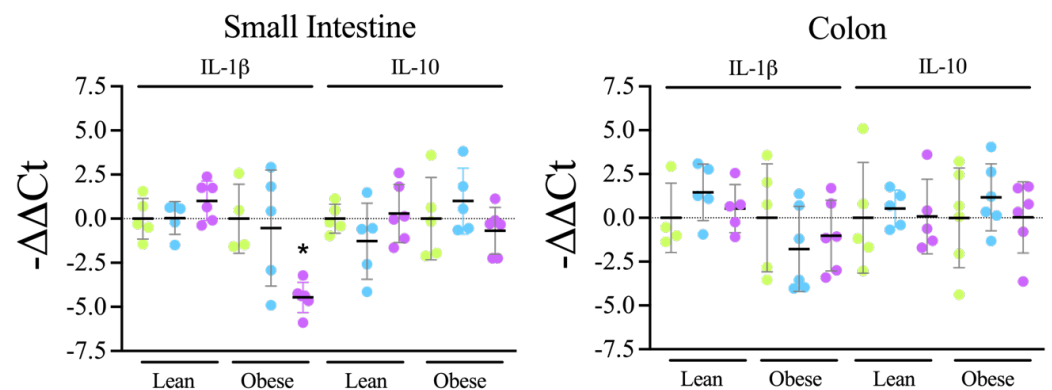
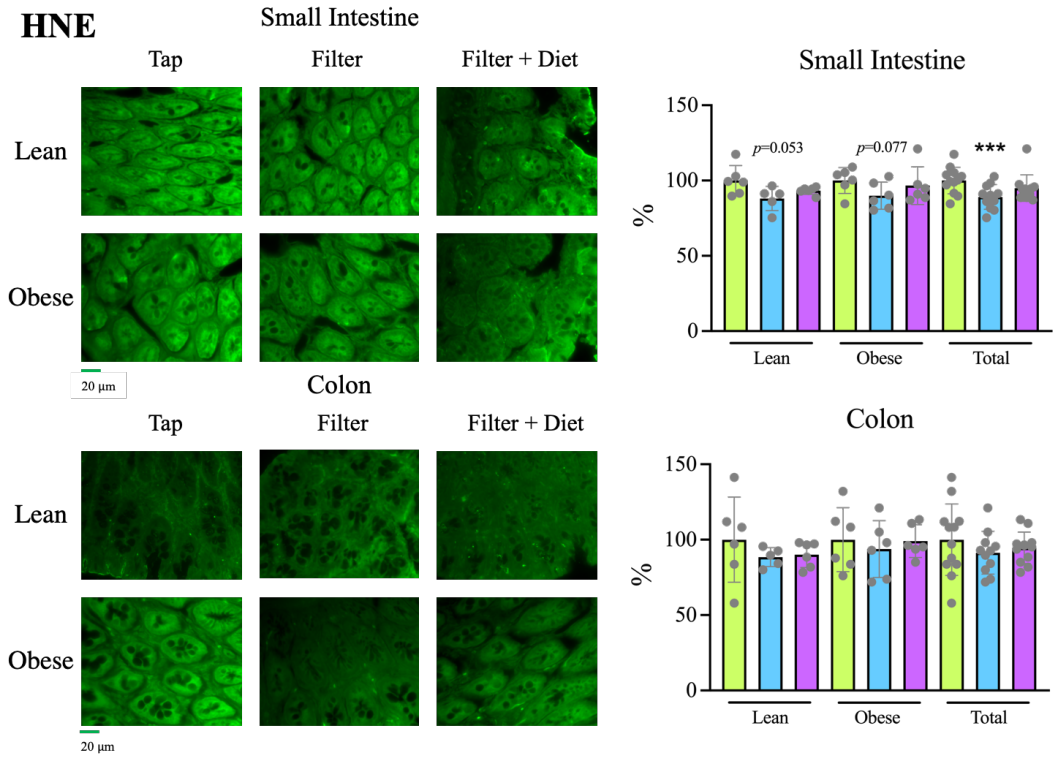


Figura 7. Análisis por qRT-PCR de los niveles de expresión de IL-1 β e IL-10 en muestras de tejido de intestino delgado y de colon. ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. Las gráficas muestran valores relativos a la media del grupo control (grifo), se incluyen los valores medios +/- la desviación standard. * $p < 0.05$ (t test).

Para determinar si estos cambios estaban relacionados con los niveles de estrés oxidativo que soportaba el tejido se analizó mediante IF la presencia de proteínas modificadas oxidativamente con el lípido HNE utilizando anticuerpos específicos. Se observó que las ratas tratadas con agua filtrada tenían en su conjunto significativamente menos proteínas modificadas en el intestino delgado que las ratas control, y la misma tendencia fue observada en el colon, y para las ratas tratadas con agua filtrada y pro-biótico, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Por tanto, estos datos apoyan la idea de que el tratamiento con agua filtrada reduce el estrés oxidativo a nivel intestinal, un efecto que puede estar relacionado con la mejora del estado inflamatorio y el estado de la mucosa.



180

Figura 8. Determinación de los niveles de proteínas modificadas con HNE mediante análisis por IF de cortes de tejido del intestino delgado y del colon. ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. Las gráficas muestran valores relativos a la media del grupo control (grifo), se incluyen los valores medios +/- la desviación standard. * $p < 0.05$ (t test). En el panel izquierdo se incluyen imágenes representativas de los grupos tomadas con un objetivo 20x.

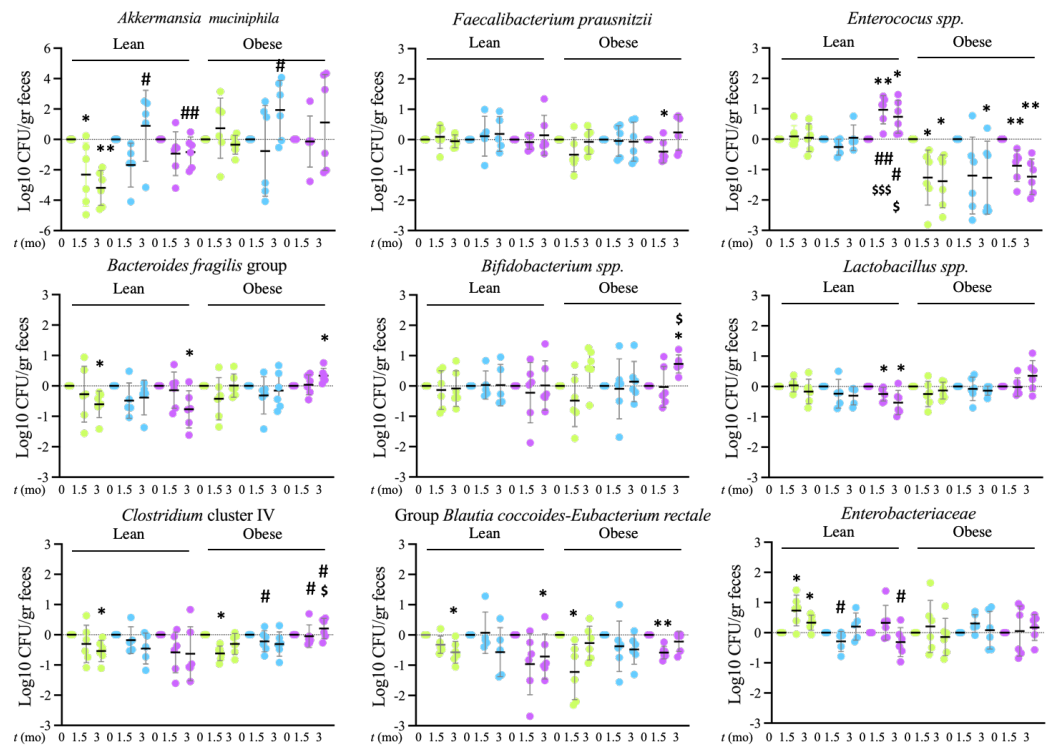
181

182

183

184

185



186

Figura 9. Análisis por qPCR del contenido microbiano en heces. Se analizaron los grupos bacterianos indicados en las gráficas en los tiempos indicados. ● Grifo, ● Filtro, ● Filtro + Dieta. Las

187

188

gráficas muestran valores relativos a la media del grupo control (grifo), se incluyen los valores medios +/- la desviación standard. La comparación estadística entre grupos se realizó mediante *t* test tipo 1 (variaciones en el tiempo) y tipo 2 (diferencias entre grupos). **p*<0.05, ***p*<0.01 comparando con *t*=0, #*p*<0.05, ##*p*<0.01 comparando con grupo control (grifo), \$*p*<0.05, \$\$\$*p*<0.001 comparando el grupo agua filtrada con el grupo filtro+dieta.

Finalmente, se evaluó el impacto que el agua filtrada y la dieta pro-biótica tenían sobre la composición microbiana intestinal, para ello se tomaron heces frescas antes, a las 6 semanas y a los tres meses de tratamiento, se aisló el DNA y se analizaron mediante qPCR los principales grupos bacterianos para los que previamente se habían descrito cambios significativos en sujetos con síndrome metabólico, obesidad, diabetes, y/o que sufrían fuertes variaciones con el tipo de dieta. En concreto, se estudiaron, *Bacteroidetes*, the group *Blautia coccoides-Eubacterium rectale*, the *Clostridium* cluster IV, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp.*, *Faecalibacterium* and *Akkermansia muciniphila*. Aunque la variedad en el microbioma es tan grande como sujetos que lo portan, y dietas que los alimentan, se han identificado tendencias generales asociadas a la mala función intestinal, la disbiosis, que se caracteriza por cuatro fenómenos que pueden ser concurrentes, la pérdida de microbiota beneficiosa, el sobre-crecimiento de bacterias potencialmente dañinas, una reducción general en la diversidad microbiana, y cambios importantes en el metabolismo de las propias bacterias, lo que se evidencia en la presencia aumentada o disminuida de productos de su catabolismo (2). En particular, una disminución significativa en los géneros bacterianos *Akkermansia*, y *Faecalibacterium* se ha observado en personas obesas al compararlas con personas con normopeso (3). Los datos obtenidos en nuestro estudio para *Akkermansia* mostraron una diferencia significativa entre los grupos a tres meses de tratamiento, mientras en ratas normales se producía un descenso significativo a los tres meses de tratamiento respecto a los niveles basales (a *t*=0), esta reducción era significativamente menor (filtro + dieta), o no se producía (filtro) en los otros grupos. Las mismas tendencias se observaron en ratas obesas, alcanzando significación estadística la comparación entre ratas tratadas con agua filtrada a tres meses, con las ratas tratadas con agua de grifo. Respecto a *Faecalibacterium*, en este caso la magnitud de los cambios fue mucho menor, y solamente se observó una tendencia no significativa, a la bajada en ratas obesas tratadas con agua de grifo a las seis semanas que alcanzó significación estadística en el grupo de ratas tratadas con agua filtrada y dieta, pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos. En su conjunto estos datos sugieren una mejora en estos grupos derivada del tratamiento con agua filtrada y es observable tanto en ratas normales como obesas.

El cluster *Clostridium IV*, al que pertenece *Faecalibacterium* y que se considera beneficioso por su capacidad de producir butirato, y cuyos niveles se aumentan en dietas con alimentos de origen vegetal (4), se modificó de manera similar en respuesta a los tratamientos, pero los cambios fueron más significativos, observándose en ratas normales y obesas del grupo control (grifo) una bajada significativa a los tres meses y a las seis semanas, que no se observó en los otros grupos siendo significativa la diferencia en ratas obesas para los niveles a las 6 semanas tanto del grupo tratado con agua filtrada a las 6 semanas como para el grupo tratado con agua filtrada y dieta tanto a 6 semanas como a los 3 meses. Además, también se encontró una diferencia significativa para el contraste ratas obesas tratadas con agua filtrada y dieta respecto a las tratadas con agua filtrada a los 3 meses, siendo los niveles superiores en las ratas tratadas con agua filtrada y dieta. Por tanto, en este contexto, tanto el agua filtrada como la dieta tendieron a aumentar o mantener más altos los niveles de *Clostridium IV*.

Clostridium pertenece al filo de los Firmicutes está formado por más 200 géneros diferentes entre los que encontramos *Lactobacillus*, *Bacillus*, y *Clostridium*. Un aumento en los Firmicutes y una bajada en las especies del filo de *Bacteroidetes* es comúnmente considerado como

un indicador de disbiosis microbiana asociada al síndrome metabólico (5). Pertenecientes a la clase Clostridia, el grupo *Blautia coccooides-Eubacterium rectale* han sido particularmente bien relacionados con la disbiosis asociada a la obesidad y al síndrome metabólico (6). En el contexto del presente estudio se observó en las ratas control (grifo) una reducción significativa en estas bacterias a las 6 semanas de tratamiento en ratas normales y al los 3 meses en ratas obesas, también en el grupo tratado con agua filtrada y dieta se produjo una bajada significativa en ratas normales a los 3 meses y en ratas obesas a las 6 semanas, pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En relación a *Lactobacillus spp.* los estudios realizados indican, por una parte, que distintas especies del género se comportan de manera diferente en relación a la obesidad y al síndrome metabólico, además, de manera similar a lo observado con el cluster *Clostridium IV*, hay una fuerte modificación por el tipo de dieta, variando mucho si los sujetos toman dietas ricas en azúcares o en grasa (7). En el contexto del presente estudio observamos que las ratas obesas presentaban mayores niveles de *Lactobacillus spp.* que las ratas control (7.12+/-0.31 vs 6.89+/-0.26 Log₁₀ CFU/gr faeces), y se observó que las ratas normales tratadas con agua filtrada y pro-bióticos presentaban una reducción significativa en los niveles a 3 meses. Este cambio no se observó en los otros grupos ni en las ratas obesas, lo que sugiere que este efecto potencialmente beneficioso es dependiente del tratamiento con pro-bióticos y de la ausencia de obesidad.

Bacterias localizadas en el intestino distal como los *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus* son fundamentales porque sintetizan vitaminas como la B12 y la K (8). *Enterococcus spp.* se ha demostrado que mantiene una relación inversa con la ganancia de peso (9). En este estudio, en ratas normales, se observó que el grupo tratado con agua filtrada y pro-bióticos aumentaba los niveles de *Enterococcus spp.* tanto a 6 semanas como a 3 meses, y este aumento era significativo al hacer una comparativa dentro del grupo como al comparar los grupos entre sí, que se sugiere que es un efecto específico del tratamiento con pro-bióticos. Sin embargo, en ratas obesas tanto el grupo control (grifo) como los grupos tratados con agua filtrada con o sin pro-bióticos, mostraron una bajada respecto a los niveles basales que fue significativa en todos los casos a los 3 meses, sin observarse diferencias significativas entre los grupos, lo que sugiere que el efecto del pro-biótico es menor en ratas obesas. Aunque la obesidad se ha relacionado con una pérdida de *Bacteroides* en general y *Bacteroides fragilis* en particular (10), la concentración en heces de *Bacteroides fragilis* se ha mostrado que correlaciona positivamente con el índice de masa corporal en algunos casos (11). En el contexto de este estudio se observó que en ratas normales se producía una disminución significativa en los niveles de *Bacteroides fragilis* a los tres meses de tratamiento tanto en ratas control (grifo) como en ratas tratadas con agua filtrada y dieta. Aunque este cambio no se observó en ratas tratadas con agua filtrada, el contraste con el grupo control no alcanzó significación estadística. En ratas obesas se observó un aumento a los tres meses en ratas tratadas con agua filtrada y dieta que no fue detectable en los otros grupos. Estos datos podrían ser indicativos de una mejora en relación a *Bacteroides fragilis* que en ratas normales se asociaría principalmente al agua filtrada, mientras que en ratas obesas requeriría además de la presencia de pro-bióticos en la dieta.

Las *Bifidobacterium spp.* también aparecen generalmente reducidas en individuos obesos (2). En el presente estudio solamente se observaron cambios significativos en respuesta a los tratamientos en ratas obesas, en las que a los tres meses el grupo tratado con agua filtrada y pro-bióticos mostró mayores niveles al comparar tanto dentro del grupo con el tiempo 0 como entre grupos, lo que sugiere que se trata de un efecto dependiente de los pro-bióticos y solamente detectable en condiciones de obesidad.

El filo de las Proteobacterias, bacterias gramnegativas, es el que más consistentemente se ha asociado a la obesidad y al síndrome metabólico, en concreto *Enterobacteriaceae* se han

encontrado aumentadas no solo en heces, sino tambien en sangre y varios tejidos en este contexto (12). En este estudio se encontró en ratas normales tratadas con agua de grifo un aumento significativo en estas bacterias tanto a las 6 semanas como a los 3 meses de tratamiento, pero no en ratas tratadas con agua filtrada o agua filtrada y dieta. Además, el contraste ratas control *vs* ratas tratadas con agua filtrada resultó significativo a las 6 semanas de tratamiento y el contraste ratas control *vs* ratas tratadas con agua filtrada a los 3 meses. En las ratas obesas no se encontraron cambios significativos. Por tanto estos ratos parecen indicar que el tratamiento con agua filtrada previene el aumento en estas bacterias en ratas normales.

3. Discusión

Los estudios previos del grupo sugerían que el consumo de agua alcalinizada reducía el estrés oxidativo y reducía la inflamación, en ratas y en ratones (13). El presente estudio confirma los resultados anteriores, mostrando que, sin modificar el perfil de ganancia de peso (Fig. 1), ni la capacidad antioxidante (Fig. 2) de forma significativa, el tratamiento con agua filtrada alcalinizada mejora el perfil inflamatorio en ratas Zucker, reduciendo los niveles de IL-1 β a la vez que aumenta los niveles de IL-10 en plasma (Fig. 2). Para determinar si estos cambios podrían derivarse del efecto del agua filtrada sobre el intestino analizamos las posibles modificaciones en el microbioma intestinal, observandose que el tratamiento con agua filtrada tenía un efecto positivo sobre los grupos bacterianos asociados con una buena salud intestinal como *Akkermansia* mientras que reducía la presencia de bacterias asociadas con la disbiosis como las *Enterobacteriaceae*, efectos que fueron más significativos para las ratas normales que para las obesas, un grupo en el que el complemento con pro-bióticos produjo un efecto diferencial (Fig. 9). Estos cambios en las bacterias comensales probablemente se relacionan muy cercanamente con la mejora observable en la mucosa intestinal, tanto a nivel de colon como de intestino delgado, en ratas normales y obesas (Fig. 5), que se acompañaron de una reducción significativa en el infiltrado inflamatorio (Fig. 6-7) que, a su vez, es probable que sea la causa más directa de la bajada en la cantidad de proteínas modificadas por oxidación con HNE detectables en el tracto intestinal (Fig. 8). Todos estos datos apoyan, por tanto, la hipótesis de que el agua alcalinizada puede mejorar el estado inflamatorio intestinal y reducir la disbiosis, redundando en un mejor estado de salud general.

4. Materiales and Métodos.

Ratas. En este estudio se utilizaron ratas macho Zucker Delgadas (Lean) y Zucker Obesas (Obese). Los animales se compraron en Charles River y se alojaron en las instalaciones para animales del IIBm. Los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales y la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (PROEX 117/20). Todos los procedimientos se ajustaron a la Declaración de Helsinki. Todos los animales recibieron cuidados humanitarios de acuerdo con los criterios descritos en la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" preparada por la Academia Nacional de Ciencias y publicada por los Institutos Nacionales de Salud (No. 86-23 revisada en 1985). Ratas de 16 semanas de edad se dividieron en tres grupos experimentales: a un grupo se le dio para beber agua de grifo (no filtrada, no esterilizada) disponible en el Instituto, al segundo y tercer grupo se les dio el mismo agua pero previamente filtrada con el sistema de filtrado de agua alcalina ionizada Alkanatur®. El agua se cambió a diario. El tercer grupo de animales se alimentó con una dieta suplementada con 3 g/Kg de Megaflora 9 EVO (Solchem®). Cada grupo experimental incluyó 6 animales. El aumento de peso se controló cada 2 semanas. Las heces se recogieron a t=0, 1 mes y 3 meses de tratamiento. Los animales fueron tratados durante 3 meses y luego sacrificados por decapitación tras inyección intraperitoneal con

pentobarbital sódico (100 mg/kg). Se recogió sangre y se separaron el plasma y las PBMC utilizando un gradiente de Ficoll y se almacenaron a -80°C. Se recogieron los intestinos, se lavaron en PBS y se cortaron en secciones. Las secciones de tejido se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80°C o se fijaron en formalina tamponada al 10 %, luego se incluyeron en parafina, y se cortaron secciones de 4 µm con un micrótomo, que se desparafinaron e hidrataron como pasos previos a su tinción.

Calorimetría indirecta. Se utilizó un sistema de calorimetría indirecta PhenoMaster (TSE Systems) para analizar el metabolismo en animales vivos con movimiento libre de forma automática y continua durante 5 ciclos de luz-oscuridad en una instalación dedicada con ambiente controlado en el IIBm. Las ratas se aclimataron primero a la sala PhenoMaster durante 3 días antes de que comenzara el experimento. Luego, cada rata se asignó a una jaula individual con un sistema de recolección y suministro de gas por separado, que fue controlado por el software TSE PhenoMaster. Se recogieron los siguientes parámetros: VO₂, VCO₂, RER, gasto energético (H1+), actividad (XT+YT), peso de la ingesta y volumen bebida a intervalos de 1h durante 72 h. Los datos se extrajeron y analizaron utilizando el software TSE PhenoMaster. Los datos presentados corresponden a las medias por periodo de los valores obtenidos cada hora durante el segundo ciclo de 24 h, cuando las medidas fueron más estables.

Microbioma. Se tomaron muestras de heces y se purificó a partir de ellas DNA bacteriano utilizando el kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit. La cuantificación bacteriana se realizó por qPCR utilizando primers específicos de los grupos bacterianos: *Bacteroides*, grupo *Blautia coccooides-Eubacterium rectale*, grupo *Clostridium cluster IV*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp.*, *Faecalibacterium* y *Akkermansia muciniphila* dirigidos contra los genes que codifican los 16S rRNA.

Enterobacteriaceae

Eco1457 Forward 5'-CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC-3'
Eco1652 Reverse 5'-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC-3'

Grupo Blautia coccooides-Eubacterium rectale

gCcoc Forward 5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3'
gCcoc Reverse 5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3'

Clostridium cluster IV

sg-Clept Forward 5'-GCACAAGCAGTGGAGT-3'
sg-Clept Reverse 5'-CTTCCTCCGTTTTGTCAA-3'

Enterococcus spp.

Enteroc Forward 5'-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT-3'
Enteroc Reverse 5'-ACTCGTTGTACTTCCCATTGT-3'

Lactobacillus

Lacto Forward 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'
Lacto Reverse 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'

Bifidobacterias

Bif Forward 5'-TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG-3'
Bif Reverse 5'-CCACATCCAGC(A/G)TCCAC-3'

Bacteroides fragilis group

Bfra Forward 5'-ATAGCCTTTTCGAAAGRAAGAT-3'
Bfra Reverse 5'-CCAGTATCAACTGCAATTTTA-3'

Faecalibacterium praustnizzi

Fprau223 Forward 5'-GATGGCCTCGCGTCCGATTAG-3'

Fprau420 Reverse 5'-CCGAAGACCTTCTTCCTCC-3'

Akkermansia muciniphila

S-St-Muc-1437-a-A-20 Forward 5'- CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'

S-St-Muc-1129-a-a-20 Reverse 5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'

Inmunohistoquímica (IHC). La fijación y la tinción de los tejidos se realizaron con el kit Vectastain ABC y el kit de sustrato de peroxidasa DAB (ambos de Vector Laboratories, Burlingame, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron con anticuerpo primario anti-F4/80 (MCA497; AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) y luego con anticuerpo secundario anti-rata (NA935 GE Healthcare, Boston (MA), EE. UU) ligado a fosfatasa alcalina, y finalmente se revelaron. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Nikon E90i equipado con una cámara DS-Fi1 (Nikon, Tokio, Japón).

Inmunofluorescencia (IF). Los procedimientos de fijación, tinción y análisis fueron los descritos anteriormente [1]. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Mucin 2 (sc-7314; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas (TX), EE. UU.) y anti-HNE (AB5605, Merk, Darmstadt, Alemania). La inmunofluorescencia se detectó mediante incubación con un anticuerpo secundario fluorescente (FITC; Merck, Darmstadt, Alemania). Luego, las muestras se tiñeron con DAPI (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), se montaron y visualizaron usando un microscopio de fluorescencia, Zeiss LSM 700.

Las imágenes IHC e IF se analizaron utilizando el software Fiji-ImageJ (NIH) para determinar el área positiva frente al área total del tejido (IHQ) o la señal total integrada (IF).

Análisis de expresión génica. Las muestras de tejido intestinal se homogeneizaron en presencia de 1 ml de reactivo Trizol™ y se aisló el ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de preparaciones de ARN total mediante transcripción inversa de 1 µg de ARN utilizando la transcriptasa inversa MMV, en un volumen final de 20 µ. La mezcla se incubó a 37 °C durante 45 min y luego se enfrió durante 2 min a 4 °C. el ADNc resultante se usó como molde para una qPCR posterior. Los cebadores utilizados se enumeran a continuación. Cada reacción de PCR de 10 µl incluía 1 µl de ADNc, 5 µl de qPCRBIO SyGreen Mastermix (Cultek, Dutscher Group) y cebadores (0,3 µM). Las muestras se analizaron por triplicado en un Mastercycler® RealPlex2, Eppendorf). Se usó 36B4 como control de carga.

36B4 Forward 5'-GCGACCTGGAGTCCA ACTA-3'

36B4 Reverse 5': ATCTGCTGCATCTGCTTGG-3'

IL-1β Forward 5'-GCCAACAAGTGGTATTCTCCATGAGC-3'

IL-1β Reverse 5'-TTGTCACCCCGGATGGAATG-3'

IL-10 Reverse 5'-TTGTCACCCCGGATGGAATG-3'

IL-10 Forward 5'-GCTCAGCACTGCTATGTTGC-3'

Citocinas. Los niveles circulantes de IL-1α, IL-4, IL-6, IL-10 y TNFα, se analizaron por citometría celular en muestras de plasma utilizando Multiplex Cytokine Assays (ProcartaPlex Immunoassays (ThermoFisher Scientific)) en el CNB (CSIC) Unidad de Citometría de Flujo. Las muestras analizadas de ratones lean corresponden a mezclas de plasma proveniente dos ratones. Los valores obtenidos se corrigieron por la concentración de proteínas en la muestra determinada por el método de Lowry por colorimetría.

Capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante se determinó en muestras de plasma utilizando el sistema analítico electroquímico e-BQC (BioQuoChem), que mide la capacidad antioxidante total (QT), rápida (Q1) y de acción lenta (Q2).

Análisis estadístico. Para el procesamiento de datos se utilizó Microsoft Excell. Se utilizó Graph Path Prism 9 para el análisis estadístico y la preparación de gráficos. Los datos se expresan como media \pm SD ó +/- SEM según se indica en las gráficas. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La significación estadística de las diferencias entre los grupos se evaluó mediante la prueba *t* no pareada o pareada de dos colas, ANOVA unidireccional y bidireccional. Se utilizó la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$. No han sido descartados valores, los valores no incluidos no pudieron obtenerse por problemas de adquisición o por problemas técnicos con las muestras o los animales.

Author Contributions: “Conceptualization, M.M.; methodology, Li.D., A.M., M.M.; formal analysis, M.M. & Li.D.; investigation, L.D., E.N., S.G. Li.D.; resources, M.M.; data curation, M.M. & Li.D.; writing—original draft preparation, M.M. & L.D.; writing—review and editing, M.M.; supervision, A.M., Li.D., M.M.; project administration, A.M., M.M.; funding acquisition, M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Alkanatur under the supporting technological contract STOMAC-ALK.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of CSIC and the “Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid” with reference code PROEX 117/20.

449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473

Data Availability Statement: We encourage all authors of articles published in MDPI journals to share their research data. In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Where no new data were created, or where data is unavailable due to privacy or ethical restrictions, a statement is still required. Suggested Data Availability Statements are available in section “MDPI Research Data Policies” at <https://www.mdpi.com/ethics>.

Acknowledgments: In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflicts of Interest: Declare conflicts of interest or state “The authors declare no conflict of interest.” Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. Any role of the funders in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state “The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results”.

Appendix A

The appendix is an optional section that can contain details and data supplemental to the main text—for example, explanations of experimental details that would disrupt the flow of the main text but nonetheless remain crucial to understanding and reproducing the research shown; figures of replicates for experiments of which representative data is shown in the main text can be added here if brief, or as Supplementary data. Mathematical proofs of results not central to the paper can be added as an appendix.

Appendix B

All appendix sections must be cited in the main text. In the appendices, Figures, Tables, etc. should be labeled starting with “A”—e.g., Figure A1, Figure A2, etc.

References

References must be numbered in order of appearance in the text (including citations in tables and legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. Include the digital object identifier (DOI) for all references where available.

Citations and references in the Supplementary Materials are permitted provided that they also appear in the reference list here.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [] and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10), or [6] (pp. 101–105).

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* **Year**, *Volume*, page range.
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.
4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* year, *phrase indicating stage of publication (submitted; accepted; in press)*.
5. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, 2012.
6. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference (Day Month Year).
7. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
8. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.