

MASTER UNIVERSITARIO
BIOTECNOLOGIA
TRABAJO FIN DE MASTER

**Evaluación de los efectos biológicos de una mezcla
de contaminantes ambientales en hígado de ratón.
Modulación por selenio y la microbiota intestinal**

Daniel Bayo Garrido.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

TUTOR(a) Y Director(a): Nieves Abril Díaz.

CODIRECTOR(A): María José Prieto Álamo.



Córdoba, Julio/2021

Índice general

Portada	1
Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción	10
2. Objetivos	15
3. Materiales y métodos	16
3.1. Principios éticos	16
3.2. Diseño	16
3.3. Recogida de muestras de hígado, heces y plasma	17
3.4. Determinaciones bioquímicas en plasma	17
3.5. Análisis taxonómico de la microbiota intestinal mediante qPCR	18
3.5.1. Aislamiento de DNA fecal (ciego y colon) con <i>AllPrep PowerFecal DNA/RNA kit</i> (Qiagen)	18
3.5.1.1. Pureza y cuantificación de las muestras de DNA	19
3.5.1.2. Integridad del DNA extraído	20
3.5.1.3. Comprobación de la ausencia de inhibidores de polimerasas en las muestras de DNA fecal	20
3.5.2. Material de referencia	20
3.5.3. Análisis de la composición taxonómica de la MI de ratón mediante secuenciación masiva (NGS) en plataforma Illumina	21
3.5.4. Determinación de la composición taxonómica de la MI de ratón mediante qPCR	21
3.5.4.1. Cebadores para el filotipado de la MI de ratón	21
3.5.4.2. Cuantificación absoluta del número de copias del gen rRNA 16S de los diferentes filos de bacterias predominantes en la MI de ratón	23
3.6. Determinación de perfiles transcripcionales hepáticos mediante qRT-PCR en tiempo real	23
3.6.1. Aislamiento de RNA de muestras hepáticas y síntesis de cDNA	23
3.6.1.1. Cuantificación y pureza de las muestras de RNA	24
3.6.1.2. Integridad de las muestras de RNA	24
3.6.1.3. Síntesis de cDNA	24
3.6.2. Cebadores	24
3.6.3. Amplificación por RT-PCR en tiempo real	25
3.6.4. Recta patrón para la cuantificación absoluta del número de transcritos de un gen	26
3.7. Ensayos de actividad enzimática	26
3.7.1. Cuantificación de proteínas	27
3.7.2. Actividad glutatión peroxidasa	27
3.7.3. Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)	27
3.7.4. Actividad catalasa (CAT)	28
3.7.5. Análisis estadístico	28
4. Resultados y discusión	29
4.1. Animales, tratamientos y muestras	29
4.2. Determinaciones bioquímicas en plasma	32
4.3. Análisis de la composición taxonómica de la MI de ratón mediante cuantificación absoluta por qPCR en tiempo real	35
4.3.1. Calidad de las muestras de DNA	36
4.3.2. Validación del lote de cebadores para identificar filos en MI	36
4.3.3. Efectos de la exposición a un cóctel de contaminantes sobre la MI de ratón mediante cuantificación absoluta por qPCR en tiempo real. Posible efecto protector de una dieta enriquecida en Se	38

4.4. Efectos de la exposición al MC sobre los perfiles transcripcionales hepáticos de genes relacionados con estrés oxidativo y metabolismo	44
4.4.1. La exposición a MC induce respuesta antioxidante mediada por Nrf2	44
4.4.2. La exposición a MC reduce la vía glucolítica y potencia la ruta de las pentosas fosfato	47
4.4.3. La exposición a MC afecta al metabolismo del colesterol y de los ácidos biliares	48
5. Conclusiones	51
6. Bibliografía	52
7. Material suplementario	56

AUTORIZACIÓN PARA LA LECTURA Y DEFENSA

NIEVES ABRIL DÍAZ, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE CÓRDOBA; **MARÍA JOSÉ PRIETO ÁLAMO**, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por D. Daniel Bayo Garrido, con DNI 49109447P, bajo el título “Evaluación de los efectos biológicos de una mezcla de contaminantes ambientales en hígado de ratón. Modulación por selenio y la microbiota intestinal”, reúne los requisitos para su lectura y defensa en la convocatoria de julio de 2021 (segundo llamamiento).

En Córdoba, a 2 de julio de 2021

VºBº Tutora académica y
Directora 1



Fdo. Nieves Abril Díaz

VºBº Directora 2



Fdo. María José Prieto Álamo

PROPUESTA REVISORES

1. Dra. Ana María Molina López. Profesora Contratada Doctora. Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología. Universidad de Cordoba. ft2moloa@uco.es
2. Profa. Tamara García Barrera. Catedrática de Universidad, Dpto. de Química. Facultad de Ciencias Experimentales Universidad de Huelva. tamara@uhu.es.
3. Prof. José Luis Gómez Ariza. Catedrático de Universidad, Dpto. de Química. Facultad de Ciencias Experimentales Universidad de Huelva. Catedrática de Universidad, Dpto. de Química. Facultad de Ciencias Experimentales Universidad de Huelva

Resumen

La exposición a productos químicos que contaminan alimentos y agua genera una seria preocupación derivada de su relación con diversas enfermedades. La evaluación de la seguridad y modo de acción de un potencial agente tóxico se basa, principalmente, en estudios de exposición a una sola sustancia, menospreciando el riesgo que supone el contacto simultáneo con varios compuestos. En este trabajo hemos evaluado la toxicidad de una mezcla de metales (As, Cd y Hg) y fármacos (diclofenaco y flumequina) habitualmente presentes como contaminantes de alimentos y aguas. Los estudios se han centrado en el hígado, principal órgano detoxificador de xenobióticos. También analizamos la microbiota intestinal (MI), potencial metabolizador directo de xenobióticos que además influye en la expresión génica del huésped y que, por otro lado, puede verse alterada en su composición, generando disbiosis. Para ello, hemos optimizado un sistema que permite la caracterización taxonómica de la MI a nivel de filo, mediante cuantificación absoluta por qPCR en tiempo real. Este sistema, aunque restringido a un número limitado de dianas, supone un enfoque factible para estimar las abundancias absolutas de taxones y proporcionar perfiles cuantitativos de la MI que no dependen de la abundancia total de bacterias presentes en la misma. Por último, también hemos analizado el papel hepatoprotector del Se frente a estos contaminantes y su capacidad moduladora de la composición de la MI como causa de tal efecto.

Nuestros resultados demuestran una sinergia entre los componentes de la mezcla de contaminantes (MC), que se traduce en un impacto negativo sobre la salud de los ratones, que sufrieron muerte o daños hepáticos y renales, evidenciados por la subida de transaminasas y urea en plasma. También se apreció una reprogramación metabólica en hígado, para obtener ATP por glucolisis y producir NADPH para paliar los daños oxidativos causados por MC. Asimismo, la señalización por ácidos biliares se vio comprometida. Los cambios detectados en la composición taxonómica de la MI permiten concluir que la respuesta observada se debe al incremento en bacterias productoras de acetato y propionato en los ratones expuestos a MC. Estos compuestos pueden ser responsables de los cambios observados en el metabolismo, directamente, al ser precursores de acetil Co-A y succinato, o indirectamente, a través de la acetilación de enzimas, que modifica la velocidad de recambio de las mismas (y, por tanto, su actividad), o de la acetilación de histonas, modificando la accesibilidad del DNA a la maquinaria de expresión génica. La MI desempeña, pues, un papel activo en la toxicidad de MC, ya que su modificación altera parcialmente los patrones de respuesta del ratón a tanto a nivel sérico como hepático. La presencia de Se en la dieta durante la exposición a MC aumenta la supervivencia de los ratones paliando, al menos parcialmente, el efecto tóxico de los componentes de la mezcla.

Palabras clave: mezcla de contaminantes, microbiota intestinal, selenio, hepatotoxicidad, qPCR, qRT-PCR.

Abstract

Exposure to chemicals that contaminate food and water is of serious concern because of their association with various diseases. The evaluation of the safety and mode of action of a potential toxic agent is mainly based on studies of exposure to a single substance, neglecting the risk posed by simultaneous contact with several compounds. In this work we have evaluated the toxicity of a mixture of metals (As, Cd and Hg) and drugs (diclofenac and flumequine) usually present as contaminants of food and water. The studies have focused on the liver, the main xenobiotic detoxifying organ. We also analyzed the intestinal microbiota (IM), a potential direct metabolizer of xenobiotics that also influences the host's gene expression and that, on the other hand, can be altered in its composition, generating dysbiosis. For this purpose, we have optimized a system that allows the taxonomic characterization of IM at the phylum level, by absolute quantification by real-time qPCR. This system, although restricted to a limited number of targets, represents a feasible approach to estimate absolute abundances of taxa and provide quantitative profiles of IM that do not depend on the total abundance of bacteria present in IM. Finally, we have also analyzed the hepatoprotective role of Se against these contaminants and its ability to modulate IM composition as a cause of such effect.

Our results demonstrate a synergy between the components of the contaminant mixture (MC), which results into a negative impact on the health of the mice, which suffered death or hepatic and renal damage, as evidenced by the rise in plasma transaminases and urea. A metabolic reprogramming was also observed in the liver in order to obtain ATP by glycolysis and to produce NADPH to mitigate oxidative damage caused by MC. Bile acid signaling was also compromised. The changes detected in the taxonomic composition of IM allow us to conclude that the observed response is due to the increase in acetate- and propionate-producing bacteria in mice exposed to MC. These compounds may be responsible for the observed changes in metabolism, directly, by being precursors of acetyl Co-A and succinate, or indirectly, through enzyme acetylation, which modifies the rate of enzyme turnover (and, therefore, their activity), or histone acetylation, modifying the accessibility of DNA to the gene expression machinery. Thus, IM plays an active role in MC toxicity, since its modification partially alters the response patterns of the mouse at both serum and hepatic levels. The presence of Se in the diet during MC exposure increases the survival of mice by at least partially palliating the toxic effect of the mixture components.

Palabras clave: contaminant mixture, intestinal microbiota, selenium, hepatotoxicity, qPCR, qRT-PCR.

1. Introducción

La continua exposición de la población a productos químicos orgánicos e inorgánicos, incluidos pesticidas, herbicidas, fármacos, productos de higiene y metales(metaloides), genera una seria preocupación a nivel mundial que deriva de la cada vez mejor documentada relación entre la exposición a estos contaminantes y la aparición de diversas enfermedades. La principal fuente de exposición a estos contaminantes ambientales es a través de la dieta, habiéndose encontrado una amplia gama de productos químicos en verduras, pescado, carne, huevos o cereales, obtenidos tanto por cultivo tradicional como orgánico [1]. El riesgo químico no deriva únicamente de la toxicidad de estos compuestos, sino también de su persistencia y capacidad de deposición en los tejidos corporales, lo que conlleva su acumulación a lo largo de la cadena trófica. Algunos de los efectos más graves para la salud asociados con la contaminación alimentaria pueden incluir cáncer, problemas hormonales y/o metabólicos, neurotoxicidad y, en algunos casos raros, muerte [2].

La metodología general para la evaluación de la seguridad y modo de acción de un agente se basa principalmente en la exposición aguda de una sola sustancia, menospreciando el riesgo potencial que supone el contacto simultáneo con varios productos químicos a dosis bajas durante un tiempo prolongado [3]. En este trabajo hemos evaluado la toxicidad de una mezcla de contaminantes y fármacos habitualmente presentes como contaminantes de alimentos y aguas [4] en el hígado, como principal órgano destoxicador de xenobióticos, ya que, por su anatomía, morfología y fisiología, posee una extraordinaria capacidad metabólica. Por ello, se le considera el principal lugar de biotransformación de sustancias exógenas, desde alimentos a fármacos, pasando por contaminantes. Además, antes de que muchos de los compuestos ingeridos lleguen al hígado, éstos se han visto expuestos a la microbiota intestinal y a su gran variedad de enzimas metabólicas, de forma que los metabolitos producidos por la microbiota también pueden modular la función y expresión de enzimas hepáticas que desarrollan un papel clave en procesos de detoxificación [5].

La microbiota es el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que residen en un entorno determinado y que han co-evolucionado junto con los mamíferos durante más de mil millones de años, dando lugar a una interdependencia de por vida [6]. El microbioma intestinal (genoma de la microbiota intestinal) codifica más de 3 millones de proteínas que juegan un papel crucial en la salud del huésped a través de la síntesis de aminoácidos y vitaminas esenciales, el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, la bioconversión de moléculas complejas en la dieta, la bioconversión de fármacos de ingesta oral y la producción de hormonas y neurotransmisores [7]. Son numerosos los factores que afectan a la composición de la microbiota intestinal, destacando la dieta, el ambiente o el estrés, tanto físico como psicológico [8]. Debido a su participación e influencia en numerosas funciones

fisiológicas, la alteración de la composición de la microbiota intestinal (disbiosis) se relaciona con la aparición de muchas enfermedades y desórdenes metabólicos [9].

La presencia de metales pesados como el arsénico, cadmio, níquel, mercurio, cromo, zinc y plomo en los ecosistemas supone actualmente uno de los problemas medioambientales más graves y extendidos [10]. La contaminación por metales pesados se debe principalmente a la industrialización, minería, fundición, quema de combustibles fósiles y uso de agroquímicos. Generalmente son no biodegradables y muy resistentes a los tratamientos convencionales de eliminación, habiéndose reconocido los efectos tóxicos de los metales y metaloides, que generan radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ERO) provocando estrés oxidativo en las células [11].

En este trabajo hemos centrado la atención en tres metales: arsénico (As), cadmio (Cd) y mercurio (Hg). La exposición a As está asociada con numerosas enfermedades humanas, como diabetes, trastornos neurológicos, enfermedades dérmicas y varios tipos de cáncer [12]. Uno de los grandes problemas del As es que la exposición a este tóxico ambiental se produce a través del agua, el carbón, el aire, el suelo y los alimentos, lo que lo hace potencialmente muy dañino. Al ser el hígado el principal órgano metabolizador de sustancias tóxicas adquiere un papel fundamental en la toxicidad del As. Así, la exposición a este metaloide puede provocar enfermedades hepáticas, como hepatomegalia, esclerosis hepatoportal, fibrosis hepática, cirrosis e incluso cáncer de hígado [13].

El cadmio (Cd) es un contaminante tóxico, que se usa frecuentemente en varias actividades industriales, de gran preocupación ocupacional y ambiental debido a sus efectos tóxicos ya que posee una vida media biológica extremadamente prolongada (aproximadamente 20-30 años en humanos), una baja tasa de excreción del organismo y se almacena predominantemente en tejidos blandos (principalmente hígado y riñones) [14]. En cuanto a su mecanismo de toxicidad, se ha demostrado que este metal induce daño tisular en varios órganos mediante la producción de estrés oxidativo, cambios epigenéticos en la expresión de ADN, y desregulación de las vías de transporte, especialmente en el segmento proximal S1 del túbulo renal, además de la inhibición de la síntesis del grupo hemo y el deterioro de la función mitocondrial, lo que puede dar lugar a apoptosis [15]. Como ya se ha comentado, uno de los problemas más graves del Cd es su alta capacidad acumulativa, sobre todo en riñón e hígado, que son sus principales órganos diana. La principal causa que determina la concentración de Cd en hígado son la intensidad y la duración de la exposición, siendo sus concentraciones en sangre y orina los principales marcadores de exposición humana a este metal pesado [16].

El mercurio (Hg) está presente en el medio ambiente en tres formas: mercurio elemental, inorgánico y orgánico. Aunque el mercurio se libera tanto de fuentes naturales como antropogénicas, los estudios indican que la contaminación del medio ambiente por este tóxico es el resultado de las actividades humanas, ya que los niveles de Hg en aguas superficiales se han triplicado desde la revolución industrial

[17]. Todos los organismos están expuestos de alguna manera al Hg debido a su existencia perpetua en el medio ambiente, induciendo alteraciones importantes en tejidos y órganos, entre los que destacan sus efectos tóxicos en el sistema inmunológico, el sistema nervioso central (SNC), los riñones y el hígado [18]. Este metal pesado se concentra principalmente en este último, produciendo una alteración de la estructura y función hepáticas cuando la acumulación es excesiva. El Hg tiende a aumentar las ERO que conducen a la oxidación del DNA, las proteínas y los lípidos en los hepatocitos. Por otro lado, altera la membrana celular y hace que el contenido dentro de las células se libere a la sangre, proceso conocido como necrosis hepatocelular [19].

Varios estudios han demostrado que existen interacciones complejas entre la exposición a estos metales pesados y la microbiota intestinal. Por un lado, la comunidad de la microbiota intestinal normal se ve perturbada por la exposición a estos tóxicos, alterándose su patrón metabólico [20, 21]. Además, en diversos estudios se ha concluido que la exposición a bajas concentraciones de estos tóxicos en ratones macho produce una menor abundancia y diversidad taxonómica en la microbiota intestinal, y que esta disbiosis de la microbiota contribuye a la generación de anomalías metabólicas en adultos [22].

La preocupación por la presencia de contaminantes emergentes en ambientes acuáticos y otros medios naturales ha ido creciendo en los últimos años. Son principalmente sustancias químicas orgánicas sintéticas que, aunque están presentes en el medio ambiente desde hace algún tiempo, solo se han detectado recientemente debido a la mejora de las técnicas analíticas o a una mayor conciencia de sus riesgos [23]. Diversos estudios han demostrado que la exposición continuada a concentraciones bajas de estos contaminantes, que en un principio no se habían considerado tóxicas, acarrea una alteración endocrina, epigenética y del desarrollo en numerosos organismos acuáticos y que también posee un considerable impacto en la salud humana [24]. Este trabajo se centra en dos de los contaminantes emergentes que más impacto medioambiental están teniendo actualmente, flumequina y diclofenaco.

La flumequina (FLU) es una fluoroquinolona principalmente activa contra bacterias Gram negativas. Se utiliza principalmente como antibiótico en animales de granja para prevenir y/o tratar enfermedades respiratorias e intestinales como pasteurelisis, colibacilosis y salmonelosis, mientras que, en acuicultura, su uso está autorizado para el tratamiento de la furunculosis y la vibriosis de los peces [25]. De hecho, buena parte de los antibióticos “de uso terapéutico” se emplean para controlar enfermedades animales en explotaciones intensivas, lo que implica una medicación masiva, que conduce a una carga ambiental considerable de ingredientes farmacéuticos y/o metabolitos activos, contribuyendo al aumento del problema emergente de la resistencia antibacteriana [26].

El diclofenaco (DCF) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) probado y comúnmente empleado que tiene propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, eficaz en el tratamiento de una gran variedad de afecciones inflamatorias y enfermedades agudas y crónicas [27]. Desde principios

de la década del 2000, los efectos ambientales de este fármaco se han convertido en una preocupación creciente. Uno de los factores desencadenantes ha sido la extinción de varias especies de buitres del subcontinente asiático (*Gyps bengalensis*, *G. indius* y *G. tenuirostris*) debido al consumo de las canales de ganado tratado con DCF [28]. Varios estudios han demostrado que el DCF es el producto farmacéutico más detectado en el medioambiente, posiblemente debido a su alto uso en la atención médica humana y veterinaria [29].

En este trabajo también se analiza el efecto protector y antioxidante del selenio (Se). El Se es un oligoelemento esencial tanto en animales como en humanos. Dicho oligoelemento participa en la formación de selenoproteínas, contribuyendo así a diversos procesos biológicos como la defensa antioxidante, la producción de hormona tiroidea y la respuesta inmunológica. En general, se reconoce que es de gran importancia para la salud humana, pues protege a las células de los efectos nocivos de la producción de radicales libres, y consecuentemente a la estructura y función de las proteínas, el DNA y los cromosomas contra el daño oxidativo. Además, es importante en muchos procesos bioquímicos y fisiológicos, incluida la biosíntesis de la coenzima Q, la regulación de los flujos iónicos a través de membranas, el mantenimiento de la integridad de queratinas y la estimulación de la síntesis de anticuerpos [30]. Además, el Se desempeña un papel modulador en la mejora de la toxicidad hepática de diversos metales pesados. En concreto, es sabido que el Se mejora la hepatotoxicidad ocasionada por Cd, produciendo cambios en la absorción del mismo, así como en su acción y distribución en los órganos diana [31, 32].

2. Objetivos

Este trabajo se encuadra dentro de un proyecto de investigación que busca esclarecer las bases moleculares de la respuesta biológica frente a la exposición a una mezcla de contaminantes (MC) compuesta por tres metales pesados (As, Cd y Hg) y dos compuestos farmacológicamente activos (diclofenaco y flumequina) habitualmente presentes como contaminantes de alimentos y aguas. En particular, este trabajo pretende evaluar los efectos de MC en el organismo modelo *Mus musculus* e investigar el papel modulador del Se, así como la interacción con la microbiota intestinal (MI).

Este objetivo general se ha desglosado en varios **objetivos** concretos:

- Puesta a punto de una metodología que permita la caracterización taxonómica de la MI a nivel de filo, mediante cuantificación absoluta por qPCR en tiempo real para investigar el efecto de MC sobre la composición de la MI.
- Investigar la toxicidad de MC en el ratón de laboratorio *Mus musculus*, analizando diferentes parámetros bioquímicos en el plasma, y los perfiles de expresión transcripcional en el hígado de un conjunto de genes seleccionados relacionados con la respuesta antioxidativa, la biotransformación de xenobióticos y el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos, correlacionando estos resultados con los niveles de actividad de algunas enzimas relevantes en la respuesta antioxidante.
- Evaluar la capacidad moduladora de un suplemento de Se administrado en la dieta sobre el efecto de MC en las respuestas biológicas analizadas.
- Analizar la influencia de la microbiota intestinal sobre las consecuencias biológicas de la exposición a MC, deprimiendo la MI mediante un tratamiento combinado de antibióticos y antifúngicos.

El análisis de los resultados de este estudio contribuirá al conocimiento de los efectos biológicos de este grupo de contaminantes, simulando de forma más realista la situación que se produce en el medioambiente donde el efecto de los xenobióticos sobre los seres vivos se ve modificado por la sinergia o antagonismo que se pueda establecer entre los diferentes compuestos presentes.

3. Materiales y Métodos

3.1. Principios éticos

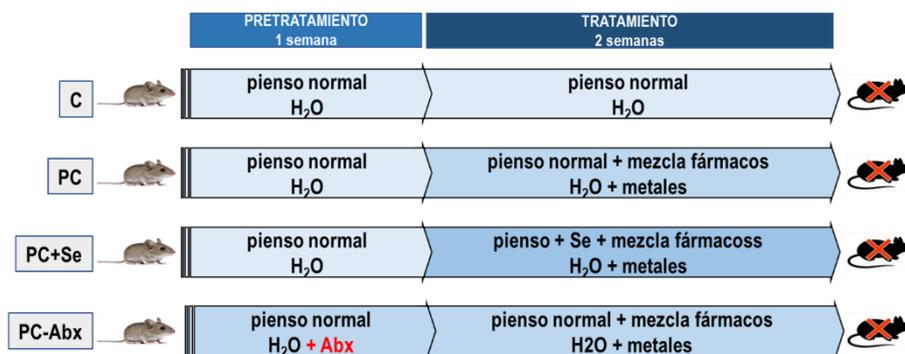
Los estudios se realizaron siguiendo las recomendaciones del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, que establece las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y fueron aprobados por Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) integrado en el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Córdoba (UCO), órgano habilitado de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía, organismo que también autorizó esta investigación (Ref. 02-01-2019-001). La manipulación de los animales se realizó por personal especializado del Servicio de Animales de Experimentación (SAEX) de la Universidad de Córdoba.

3.2. Diseño experimental

Se utilizaron en total 80 ratones macho *Mus musculus* BALB/c (Charles River Laboratories, France) de 8 semanas de edad y 23-25 g de peso corporal promedio. Los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos y se enjaularon por parejas en jaulas adecuadas, en un laboratorio preacondicionado bajo condiciones controladas de temperatura (25/30°C), humedad (40-60%) y ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (LC12:12). La Fig.1 muestra el diseño experimental.

Figura 1. Diseño experimental.

Todos los animales se mantuvieron previamente, durante 3 días, con acceso libre a agua y comida, para aclimatarse a las nuevas condiciones experimentales.



Los ratones del grupo de control (C, n=15) tuvieron acceso libre a agua y comida (pienso estándar de roedores) durante los 3 días de aclimatación y las 3 semanas siguientes que duró el experimento completo. Los ratones del grupo PC (n=20) fueron tratados de manera similar, pero recibieron una mezcla de metales (As, Cd y Hg) en el agua de bebida y de fármacos (flumequina, FLU y diclofenaco, DCF) en el pienso, durante las dos últimas semanas de experimento (Tabla 1). Los ratones del grupo PC+Se (n=15) fueron alimentados con un pienso enriquecida en selenio (Se, 0,65 mg/kg de selenito sódico) durante el período de exposición a la mezcla de contaminantes. (MC). Los ratones del grupo Abx-PC (n=30) fueron pretratados con un cóctel de antibióticos (Abx) para deprimir la microbiota intestinal (MI), durante la primera semana tras la aclimatación, antes de ser expuestos al cóctel de contaminantes MC bajo una dieta regular.

El cóctel de antibióticos contenía ampicilina (1 g/L), metronidazol (1 g/L), neomicina (1 g/L), vancomicina (0,5 g/L) y el antifúngico anfotericina B (10 mg/L) [33-35] y se suministró en el agua. Pienso y agua se cambiaron cada dos días para mantener su calidad y se pesaron para hacer la estima del consumo diario. Los animales también se pesaron cada dos días, coincidiendo con los momentos de cambio de alimento.

Tabla 1. Compuestos y dosis suministrados a los ratones durante la etapa de tratamiento. Los metales se suministraron en el agua de bebida y los fármacos mezclados con el pienso.

Compuesto	Forma química	Casa comercial (Referencia)	Concentración
As	Óxido de arsénico (III) (As_2O_3)	Aldrich (202673)	14.4 μ g/mL agua
Cd	Cloruro de cadmio ($CdCl_2$)	Aldrich (202908)	0.48 μ g/mL agua
Hg	Cloruro de mercurio (II) ($HgCl_2$)	Merck (104419)	4.8 μ g/mL agua
Flumequina (FLU)	Flumesyva® polvo oral. Preparación uso veterinario con 100mg/g de flumequina ($C_{14}H_{12}FNO_3$)	Lab. Syva S.A.U.	3 mg/g pienso
Diclofenaco (DCF)	Diclofenaco sódico ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$)	Sigma (D6899)	96 μ g /g pienso

3.3. Recogida de muestras de hígado, heces y plasma

Concluido el periodo experimental, los ratones fueron anestesiados (isoflurano 1,5%) y se procedió rápidamente a hacer una extracción de sangre mediante punción cardiaca, usando jeringas/tubos heparinizados. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajo inmediatamente el hígado, se lavó con 0.9% NaCl frío y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras de heces se recogieron directamente de ciego y colon, inmediatamente tras el sacrificio y se congelaron en nitrógeno líquido. La sangre heparinizada se centrifugó (3000 g, 10 min), se reservó un alícuota (200 μ L) para la determinación de parámetros bioquímicos y el resto se conservó, lo mismo que las muestras de hígado y heces, a $-80^{\circ}C$. Para su uso, cada órgano se trituró por separado con nitrógeno líquido, utilizando una maja y un mortero de porcelana, y se almacenó a $-80^{\circ}C$ hasta su uso.

3.4. Determinaciones bioquímicas en plasma

El plasma procedente de la sangre heparinizada se usó para la determinación de fosfatasa alcalina (ALP-DEA), albúmina (ALB), urea (UREA/BUN-UV), creatinina, glucosa, proteína total, colesterol y triglicéridos (TAG). En todos los casos, se usaron kits comerciales de BioSystems y la determinación se llevó a cabo en un analizador Atom A-15 (BioSystems), en las instalaciones del SAEX-UCO, siguiendo procedimientos estándar para bioquímica clínica.

3.5. Análisis taxonómico de la microbiota intestinal mediante qPCR

3.5.1. Aislamiento de DNA fecal (ciego y colon) con AllPrep PowerFecal DNA/RNA kit (Qiagen)

Las muestras de heces trituradas en N₂ líquido con maja y mortero, se repartieron aleatoriamente en 4 subgrupos por grupo experimental (n=12), cada uno con cantidades iguales de muestra de tres ratones (Fig. 2).



Figura 2. Preparación de subgrupos de muestras criohomogeneizadas dentro de cada grupo experimental.

Se utilizaron alícuotas de 50 mg de estas mezclas para la extracción de DNA con el kit *AllPrep PowerFecal DNA/RNA kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La composición de los reactivos del kit es desconocida, aunque algunas de sus características se han deducido del análisis de sus hojas de seguridad y se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características generales del kit *AllPrep PowerFecal DNA/RNA* (Qiagen) utilizado para la extracción de DNA

Tampon de lisis	Procedimiento de lisis	Limpieza del DNA
<ul style="list-style-type: none"> Solución PM1¹, a 55°C DTT 40 mM 	<ul style="list-style-type: none"> Bolas de vidrio de 0,6 mm pretratadas con ácido nítrico TissueLyser-LT (Qiagen)² (2 periodos de 2 min, 30 Hz con un intervalo de 5 min a RT) Solución IRS^{1,3} Solución C4^{1,4} 	<ul style="list-style-type: none"> Columnas Solución AW1^{1,5} Solución AW2^{1,6} Elución en Solución EB⁷
<p>¹ Composición desconocida ² Disruptor mecánico de células y tejidos ³ Composición desconocida; según el fabricante, contiene un reactivo para precipitar material orgánico e inorgánico, incluyendo residuos celulares y proteínas, sin afectar al DNA, eliminando contaminantes que pueden reducir la pureza del DNA e inhibir su uso en Biología Molecular. ⁴ Solución salina (guanidinio) de alta concentración que favorece la unión del DNA a las columnas de sílice usadas para su limpieza ⁵ Contiene hidrocloreuro de guanidinio y etanol ⁶ Contiene etanol ⁷ Solución 10 mM Tris-Cl, pH 8,5</p>		

El flujo de trabajo seguido para la extracción de DNA se resume en la Fig. 3. Se añadieron 650 µL de solución PM1 a 55 °C y 25 µl DTT 1M a cada muestra y se pasaron inmediatamente a tubos *Microbial Lysis* con bolas de vidrio. Los tubos se dispusieron en un *TissueLyser LT* (Qiagen) y las muestras se

procesaron en dos periodos de 2,5 min a 30 Hz separados por un periodo de descanso de 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante (~ 500 µL) obtenido tras centrifugar los homogenados (18000 g, 1 min, 25 °C) se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 150 µL de solución IRS por tubo, se agitó brevemente en el vórtex y se incubó la mezcla 5 min a 2-8 °C.

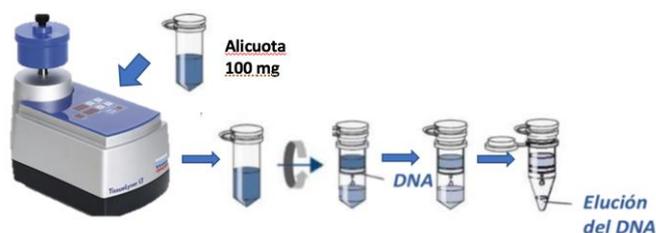


Figura 3. Extracción de DNA de las muestras de heces con AllPrep PowerFecal DNA/RNA kit (APQ, Qiagen).

Se centrifugó (13000 g, 1 min, 25 °C) y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 1,4 volúmenes de solución C4 a cada tubo, se mezcló bien pipeteando, se transfirieron 700 µL a una columna *AllPrep DNA MinElute Spin Column* y se centrifugó (8000 g, 30 s, 25 °C). Se procedió igual con el resto de la preparación hasta tener todo el DNA retenido en la columna. Tras la última centrifugación, se añadieron 500 µL de *Buffer AW1* a la columna, se centrifugó (8000 g, 1 min), se eliminó el eluyente, y se añadieron 500 µL de *Buffer AW2* a la columna. Se centrifugó de nuevo (18000 g, 2 min), se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se volvió a centrifugar (18000 g, 1 min). Se pasó entonces la columna a un tubo limpio y se añadieron 30 µL de *Buffer EB* directamente sobre la membrana, se incubó durante 1 min a 25 °C y se centrifugó (18000 g, 1 min), repitiéndose este paso para obtener un mayor rendimiento de DNA.

3.5.1.1. Pureza y cuantificación de las muestras de DNA

La pureza y cantidad de las muestras de DNA obtenidas se determinó espectrofotométricamente mediante un Beckman Coulter *DU-800 UV Spectrophotometer*, usando una cubeta *Hellma®Traycell*, que permite hacer la medición con 1 µL de muestra. Se midió la absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm. Para evaluar la pureza del DNA, el valor de absorbancia a 320 nm se restó de las respectivas mediciones a 260 nm y 280 nm y luego se calculó la ratio A_{260}/A_{280} . Una ratio A_{260}/A_{280} superior a 1,7 indica que el DNA es puro y no está contaminado con proteínas. La concentración de DNA se calculó utilizando la ley de Lambert-Beer, que predice un cambio lineal en la absorbancia (A) con la concentración (c): $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, donde ϵ es el coeficiente de extinción y l el paso de luz de la cubeta. Usando esta ecuación, una lectura A_{260} de 1,0 es equivalente a ≈ 50 µg/ml de DNA bicatenario. Para la determinación de la concentración, el valor de absorbancia a 320 nm se restó de la lectura a 260 nm y luego se multiplicó por el factor de dilución, establecido en 50 para todas las mediciones hechas con la cubeta *Hellma*.

3.5.1.2. Integridad del DNA extraído

La integridad del DNA aislado se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con 5 µL de *DSView™ Nucleic Acid Stain* por cada 100 mL de gel, usando tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Como marcador de Pm se usó *FastGene® 100bp DNA Ladder* (NIPPON Genetics EUROPE, 5 µL por pocillo de una solución de 100 µg/ml en 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y como tampón de carga 10x *Orange DNA Loading Dye* (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0.15% orange-G; 0,03% xylene-cyanol FF; 60% glicerol y 60 mM EDTA). La electroforesis se desarrolló a 80 V hasta que el frente alcanzó el final del gel (45-50 min aprox.). Finalmente, los geles se escanearon empleando el sistema *ChemicDoc™ MP System* (Biorad) y el software de captura de imagen *Image Lab 4.1* (Biorad).

3.5.1.3. Comprobación de la ausencia de inhibidores de polimerasas en las muestras de DNA fecal

La ausencia de inhibidores de polimerasas en las preparaciones de DNA se comprobó llevando a cabo la amplificación por PCR del gen que codifica el rRNA-16S usando cebadores universales (directo: 5'-TGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA-3'; reverso: 5'-GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT-3') y que generan un fragmento de unos 300 pb [36]. Las muestras de DNA se llevaron a una concentración de 10 ng/µL. Para la amplificación se utilizó *MyTaq™ Mix* (Bioline), mezclando para cada reacción 12,5 µL de *MyTaq™ Mix 2x*, 1 µL de cebadores 10 µM, 2 µL de DNA y agua de grado biológico hasta un volumen final de 25 µL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *GeneAMP PCR System 97300* (Applied Biosystems). El programa utilizado fue: (1) activación: 1 minuto a 95°C; (2) 40 ciclos con un paso de desnaturalización: 95°C, 30 s; un paso de hibridación: 65°C, 30 s; y un paso final de elongación: 72°C, 45 s. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

3.5.2. Material de referencia

Se utilizó una comunidad microbiana estándar, *ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard*, Ref. D6300 (Zymo Research), de la cual se extrajo DNA de manera idéntica al resto de las muestras. Brevemente, se mezclaron 75 µL de la solución bacteriana con 125 µL de tampón fosfato salino (PBS) y el tubo y su contenido se congelaron en N₂ líquido. El contenido del tubo congelado se trituró luego manualmente en N₂ líquido con maja y mortero y se utilizaron alícuotas de 50 mg para la extracción de DNA con el kit *AllPrep PowerFecal DNA/RNA* (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito anteriormente. La extracción se hizo por duplicado y las muestras extraídas se analizaron para comprobar que cumplían todos los requisitos de calidad exigidos al resto de las muestras.

3.5.3. Análisis de la composición taxonómica de la MI de ratón mediante secuenciación masiva (NGS) en plataforma Illumina

Estos análisis se hicieron en el grupo de la Dra. Collado del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC) de Valencia, según un protocolo previamente publicado [37]. Brevemente, las muestras (100 mg) se trataron con lisozima (20 mg/mL) y mutanolisina (5U/mL) durante 60 min a 37 °C y se rompieron con perlas de vidrio (3 µm de diámetro, 1 min, 6 m/s) en un *Fast-PREP 24-5G Homogenizer* (MP biomedical) y se extrajo DNA total con el kit *DNA Master-Pure* (Epicenter) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se purificó el DNA con *DNA Purification Kit* (Macherey-Nagel, Duren, Germany) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la concentración de DNA se midió usando el fluorómetro *Qubit®* (Life Technology).

La diversidad y composición de la microbiota intestinal se determinó mediante la secuenciación de las regiones variables V3-V4 del gen rRNA 16S con la plataforma Illumina siguiendo los protocolos pertinentes. Adicionalmente, se llevó a cabo un paso de multiplexing (*NextEra Index Kit*, Illumina) y los amplicones se verificaron con un *Bioanalyzer DNA 1000 chip* (Agilent Technologies). Las genotecas se secuenciaron según la tecnología de Illumina *MiSeq 2x300-pb paired end (PE) reads* (servicio de secuenciación FISABIO, Valencia, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incluyeron y secuenciaron controles durante la extracción de DNA y la amplificación por PCR. Los adaptadores residuales se eliminaron de las secuencias sin procesar haciendo uso del software *Trimmomatic* (*Usadellab.org*). Se utilizó la herramienta DADA2 para el filtrado, la unión de secuencias y la eliminación de quimeras. La asignación taxonómica se realizó utilizando la base de datos Silva v132. Las muestras con menos de 1000 lecturas se eliminaron del estudio. Además, se filtraron los taxones presentes en una abundancia relativa inferior al 0,01 %, los presentes en menos de 3 veces en al menos el 20 % de las muestras y las secuencias clasificadas como Cianobacteria y Cloropasto se eliminaron del conjunto final de datos.

La significación estadística de los resultados obtenidos se determinó mediante un prueba ANOVA unidireccional y una prueba Tukey para comparaciones múltiples haciendo uso de *Statistica* 8.0 de la empresa *StatSoft*. En los análisis de microbiota se utilizó la plataforma Calypso web v. 8.5625 y se realizó una normalización de suma total para el análisis estadístico, una prueba multivariante y minería de datos.

3.5.4. Determinación de la composición taxonómica de la MI de ratón mediante qPCR

3.5.4.1. Cebadores para filotipado de la MI de ratón

Se utilizaron cebadores previamente descritos [38] cuyas características se recogen en la Tabla 3, para analizar específicamente la presencia de bacterias pertenecientes a los grupos (filos y clases de *Proteobacterias*) mayoritarios presentes en la microbiota de ratón [38, 39]. Para cada pareja de cebadores

se comprobó la especificidad de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5% en TAE) de los amplicones generados en la reacción y la determinación de la temperatura de fusión de estos.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la cuantificación específica del gen rRNA 16S de cada grupo (filo/clase) de bacterias en MI de *M. musculus*

Grupo diana	Cebadores ^a	Secuencia 5' - 3' ^b	Longitud ^c (pb)	E ^d (R ²) ^f	Ref.
Bacteroidetes	Bac960F	GTTTAATTCGATGATACGCGAG	122	0.988 91.9%	[38]
	Bac1100R	TTAASCCGACACCTCACGG			
Firmicutes	Firm934F	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	126	0.968 99.5%	[40]
	Firm1060R	AGCTGACGACAACCATGCAC			
Actinobacteria	Act664F	TGTAGCGGTGGAATGCGC	277	0.954 98.9%	[38]
	Act941R	AATTAAGCCACATGCTCCGCT			
"Candidatus Saccharibacteria"	Sac1031F	AAGAGAACTGTGCCTTCGG	187	0.968 99.6%	[38]
	Sac1218R	GCGTAAGGGAAATACTGACC			
Deferribacteres	Defer1115F	CTATTTCCAGTTGCTAACGG	150	0.955 98.8%	[38]
	Defer1265R	GAGHTGCTTCCCTCTGATTATG			
Verrucomicrobia	Ver1165F	TCAKGTCAAGTATGGCCCTTAT	97	0.934 96.8%	[38]
	Ver1263R	CAGTTTTYAGGATTTCCCTCCGCC			
Tenericutes	Ten662F	ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAA	200	0.965 99.2%	[38]
	Ten862R	CMTACTTGCGTACGTACTACT			
Betaproteobacteria	Beta979F	AACGCGAAAAACCTTACCTACC	174	94.6 98.8%	[38]
	Beta1130R	TGCCCTTTTCGTAGCAACTAGTG			
Epsilonproteobacteria	Epsilon940F	TAGGCTTGACATTGATAGAATC	189	0.935 97.3%	[38]
	Epsilon1129R	CTTACGAAGGCAGTCTCCTTA			
Delta- and Gammaproteobacteria	Gamma877F	GCTAACGCATTAAGTRYCCCG	189	97.1 96.6%	[38]
	Gamma1066R	GCCATGCRGCACCTGTCT			
Universal	926F	AAACTCAAAGAATTGACGG	136	97.8 98.7%	[41]
	1062R	CTCACRRCACGAGCTGAC			

^a Nombre de los cebadores

^b Secuencia de los cebadores forward (F) y reverse (R).

^c Tamaño del producto de PCR (pb, pares de bases).

^d Eficiencia de amplificación (E) determinada en este trabajo

Se determinó la temperatura de hibridación que produjese la mayor especificidad probando los cebadores con el material de referencia (*ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard*, Ref. D6300, Zymo Research), con temperaturas desde 50°C hasta 60°C. La eficiencia y especificidad de los cebadores, la ausencia de inhibidores que pudieran afectar a la amplificación y la cantidad de DNA que debía ponerse por reacción de qPCR se determinó haciendo las correspondientes rectas de eficiencia. Para ello, se realizaron diluciones seriadas desde 2x10⁵ hasta 2x10⁻² pg de una mezcla de DNA total de todos los individuos y se amplificaron por PCR en tiempo real según se describe en el apartado 3.5.4. Se representó el valor de C_T frente al logaritmo decimal de la concentración inicial de RNA por pocillo, y se calculó la eficiencia de amplificación a partir de la pendiente de la recta obtenida según la ecuación:

$$E = \left(10^{\frac{-1}{slope}} \right) - 1$$

Esta eficiencia tiene un valor de 1 cuando se duplica el número de copias de molde tras un ciclo de PCR. Los valores de eficiencia obtenidos se recogen en la Tabla 3. Se determinó que 20 ng de DNA inicial era cantidad suficientes para cuantificar todos los tipos de bacterias.

3.5.4.2. Cuantificación absoluta del número de copias del gen rRNA 16S de los diferentes filos de bacterias predominantes en la MI de ratón

La qPCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, utilizando *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (Biorad) en las condiciones indicadas por el fabricante. Las reacciones se hicieron por triplicado, con 20 ng de DNA en un volumen final de 20 μ L. La amplificación se llevó a cabo comenzando con un paso de 2 min a 95°C (activación de la polimerasa), seguido por 40 ciclos compuestos por un paso de desnaturalización (15 s, 95°C), un paso de hibridación (30 s, 55°C) y un paso de extensión (30 s, 60°C). Con el fin de determinar la temperatura de fusión (T_m) del amplicón generado en cada pocillo y constatar la especificidad de la amplificación, tras los 40 ciclos, se incluyó un paso de desnaturalización (1 min a 95°C) y se realizó una curva de disociación incrementando la temperatura desde 65°C hasta 95°C, a razón de 0,5°C cada 5s. Se utilizó un termociclador CFX96 (Biorad) para el seguimiento de la emisión de fluorescencia, que se captó al final de cada paso de extensión y durante la curva de desnaturalización. La curva de amplificación obtenida permite relacionar la fluorescencia registrada con los ciclos de amplificación realizados y proporciona los valores de C_T (ciclo umbral, punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal, umbral o “threshold”). En el C_T , el número de moléculas del producto de amplificación (X_{C_T}) viene dado por la ecuación:

$$X_{C_T} = X_0 + (1 + E)^{C_T}$$

donde X_0 representa el número de moléculas de transcrito iniciales, X_{C_T} es la cantidad de moléculas cuando se alcanza el valor de fluorescencia representado por el C_T y E es la eficiencia de amplificación. Se usó el valor de C_T de amplificación de los cebadores universales en una muestra de DNA obtenida mezclando cantidades iguales de DNA de todos los individuos como calibrador interno entre placas y para establecer la posición de la línea umbral.

3.6. Determinación de perfiles transcripcionales hepáticos mediante qRT-PCR en tiempo real

3.6.1. Aislamiento de RNA de muestras hepáticas y síntesis de cDNA

El RNA total se extrajo individualmente mediante el kit comercial *AllPrep® DNA/RNA/Protein* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de 30 mg de tejido hepático de cada uno de los individuos de cada grupo experimental. El tejido fue homogeneizado en un volumen de 600 μ L de tampón de lisis, y se centrifugó (8000 g, 3 min) para eliminar restos celulares. El sobrenadante se pasó a una columna *AllPrep DNA spin* y se centrifugó de nuevo (30 s, 8000 g). Se trató la muestra con DNasa I

(180 U, *RNase-Free DNA Set*, Qiagen) y se incubó durante 15 min a 25 °C, tras lo cual se realizaron varios pasos de lavado con los buffers suministrados con el kit, incluyéndose un paso de centrifugación (5 s, 8000 g) tras cada lavado. Tras una última centrifugación (2 min, 8000 g), la columna fue transferida a un tubo limpio y el RNA se eluyó con 50 µL de agua de grado biológico, centrifugando durante 1 min a 8000 g. La solución de RNA obtenida se desnaturalizó durante 10 min a 60 °C y se conservó a -80 °C.

3.6.1.1. Cuantificación y pureza de las muestras de RNA

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-800 UV y una cubeta *Hellma®Traycell* y se procedió de forma similar a la descrita en el apartado 3.5.1.1. Para estimar la concentración, se tuvo en cuenta que una lectura $A_{260} = 1,0$ es equivalente a ≈ 40 µg/ml de RNA. Para comprobar la ausencia de DNA genómico en las muestras de RNA, se hizo una PCR usando cebadores específicos intraexónicos del gen *Gapdh* sin retrotranscripción previa.

3.6.1.2. Integridad de las muestras de RNA

La integridad de las preparaciones de RNA se determinó mediante electroforesis capilar en un equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*, en las instalaciones del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la UCO. Este sistema utiliza algoritmos que miden el área bajo los picos 16S/18S y 23S/28S, su altura frente a un RNA estándar y el área de la zona comprendida entre ellos, dando lugar así a un número de integridad de RNA (RIN) en una escala de 1 (RNA degradado) a 10 (RNA íntegro). Solo se utilizaron RNAs con ratios de absorbancia 260nm/280nm de $\sim 2,0$ y valores de RIN superior a 8.5.

3.6.1.3. Síntesis de cDNA

Antes de proceder a la retrotranscripción, se prepararon 4 subgrupos dentro de cada grupo experimental, mezclando cantidades iguales de RNA de tres animales. La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 2 µg de RNA total aislado de cada subgrupo, utilizando el *iScript™ cDNA Synthesis Kit* de Biorad, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (PE Applied Biosystems) programado para incubar las muestras durante 5 min a 25 °C (hibridación de los cebadores, poli-A y decámeros aleatorios), seguidos de un paso de 20 min a 46 °C (extensión) y finalizando con un paso final de 1 min a 95°C (inactivación de la retrotranscriptasa). Los cDNA se diluyeron con agua de grado biológico para obtener una concentración final de trabajo de 25 ng/µL.

3.6.2. Cebadores

Los cebadores empleados se recogen en la Tabla 4. Se comprobó la especificidad de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5% en TAE) de los amplicones generados en la reacción y

la determinación de la temperatura de fusión de estos. Se determinó la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores haciendo una recta de eficiencia, como se indica en el apartado 3.4.4.1.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la cuantificación de transcrito hepáticos en *M.musculus*

Gen ^a		Secuencia 5'-3' ^b		Condiciones PCR	Referencia
Cas1	F:	5'- AATGCTCCAGGGCCGCCTTTTTGCCTACC	-3'	15s95°/30s70°C	[42]
	R:	5'- GGTAATAGTTGGGGGCACCACCCTGGTTG	-3'		
Gpx1	F:	5'- GCAGAAGCGTCTGGGACCTCGTG	-3'	15s95°/30s70°C	[43]
	R:	5'- GGGAACCTCAGAATCTCCTCATTCTTGCCA	-3'		
Sod1	F:	5'- GAAGGCCAGCATGGGTTCCACGTC	-3'	15s95°/30s70°C	[42]
	R:	5'- TAAGAAACATGGTGGCCCGGCGG	-3'		
Hmox1	F:	5'- CTTCCGGCATCTCTACCCCAACTGCT	-3'	15s95°/30s70°C	[44]
	R:	5'- CCAACCAACATTCTTAGAGCGGGCATTCA	-3'		
Hmgcr	F:	5'- GACTGTGGTTGTGAAGCCGTCATTCCAG	-3'	15s95°/30s70°C	[45]
	R:	5'- CAATGTTTGCTGCGTGGGCGTTGTAG	-3'		
Gapdh	F:	5'- GGCTGCCCAGAACATCATCCCTGCAT	-3'	15s95°/30s70°C	[44]
	R:	5'- CCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGACGT	-3'		
Mt1	F:	5'- GGCGGCTCCTGCACTTGCACC	-3'	15s95°/30s70°C	[46]
	R:	5'- TGCAGACACAGCCCTGGGCACAT	-3'		
Mt2	F:	5'- CCCAACTGCTCCTGTGCCTCCGA	-3'	15s95°/30s70°C	[46]
	R:	5'- CCTCTTTGCAGATGCAGCCCTGGGA	-3'		
Pfk1	F:	5'- GAGGGAAGGCCGCCTGGCTGCAGCTTAC	-3'	15s95°/30s70°C	[47]
	R:	5'- CCAGCTCCTCCAGCAAGCTGCCCCAC	-3'		
Pk	F:	5'- CGCTCAGCTGGACTCTAAGATGCCCTG	-3'	15s95°/30s70°C	[48]
	R:	5'- ACTGGTCATGAGGGCTATATCCGAGGAC	-3'		
Star	F:	5'- TCGGAACCTCTGCTTGGTTCTCAACTGG	-3'	15s95°/30s70°C	[47]
	R:	5'- GTCCCCCGTTCTCCTGCTGGCTTTCC	-3'		
Bsep	F:	5'- AAGCTACATCAGCCTTAGACACAGAA	-3'	15s95°/30s60°C/30s70°C	[49]
	R:	5'- CAATACAGGTCCGACCCTCTCT	-3'		
Oatp1a1	F:	5'- GCCAACGCAAGATCCAACAGAGTG	-3'	15s95°/30s60°C/30s70°C	[49]
	R:	5'- TCGGGCCAACAATCTCTTCCCCT	-3'		
Srebf2	F:	5'- GGTCCTCCATCAACGACAA	-3'	15s95°/30s60°C/30s70°C	[50]
	R:	5'- CTCAGAACGCCAGACTTGTGC	-3'		
Cyp27a1	F:	5'- GCCTCACCTATGGGATCTTCA	-3'	15s95°/30s60°C/30s70°C	[48]
	R:	5'- TCAAAGCCTGACGCAGATG	-3'		
Cyp7a1	F:	5'- AGTAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	-3'	15s95°/30s60°C/30s70°C	[48]
	R:	5'- GTCCGGATATTCAAGGATGCA	-3'		

a Símbolo según la base de datos Gene del NCBI

b Secuencia del cebador en sentido 5'→3'.

3.6.3. Amplificación por RT-PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado usando 50 ng de cDNA por reacción en un volumen final de 20 µL, utilizando *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* en las condiciones indicadas por el fabricante. La amplificación se llevó a cabo comenzando con un paso de 2 min a 95°C (activación de la polimerasa), seguido por 40 ciclos compuestos por un paso de desnaturalización (15 s, 95°C) y un paso de hibridación/extensión (30 s, 60 ó 70°C según se indica en la Tabla 4). Con el fin de

determinar la T_m del fragmento amplificado en cada pocillo y constatar la especificidad de la amplificación, tras los 40 ciclos, se incluyó un paso de desnaturalización (1 min a 95°C) y se realizó una curva de disociación incrementando la temperatura desde 65°C hasta 95°C, a razón de 0,5°C cada 5s. Se utilizó un termociclador CFX96 (Biorad) para el seguimiento de la emisión de fluorescencia, que se captó al final de cada paso de extensión y durante la curva de desnaturalización. Como se explicó en el apartado 3.5.4.2, los valores de moléculas iniciales de transcrito en cada reacción de PCR se obtuvieron mediante la ecuación $X_{C_T} = X_0 + (1 + E)^{C_T}$, donde X_0 representa el número de moléculas de transcrito iniciales, X_{C_T} es la cantidad de moléculas cuando se alcanza el valor de fluorescencia representado por el C_T y E es la eficiencia de amplificación.

3.6.4. Recta patrón para la cuantificación absoluta del número de transcritos de un gen

La conversión de los valores de C_T en número de transcritos se realizó extrapolando sobre la ecuación de una recta patrón construida retrotranscribiendo y amplificando por qPCR diluciones seriadas (desde 10^9 hasta 10^2 moléculas/ μ L) de un RNA obtenido por transcripción *in vitro* de un fragmento específico, de secuencia y tamaño conocidos, clonado en un vector, del gen *Gapdh* de ratón [44]. El número de moléculas de este RNA se estimó a partir de los valores de concentración y peso molecular. La representación del logaritmo del número de moléculas iniciales de RNA por pocillo frente al valor de C_T correspondiente da lugar a una recta a partir de cuya ecuación se puede calcular el número de moléculas de los transcritos cuantificados para cada gen. Esta aproximación fue posible debido a que la eficiencia de amplificación de los transcritos analizados fue la misma que la obtenida en la recta patrón ($E \approx 1$).

3.7. Ensayos de actividad enzimática

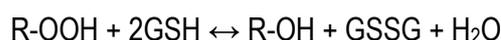
A pesar de la letalidad, conseguimos tener muestras de al menos 12 animales por grupo, que se distribuyeron aleatoriamente en 4 subgrupos para cada condición experimental. Para la preparación de extractos proteicos se establecieron los 4 subgrupos mezclando cantidades iguales de tejido triturado en N2 de cada uno de los animales (al menos 3) dentro de cada subgrupo y condición. Los extractos se obtuvieron homogeneizando 100 mg de estas muestras manualmente con un pistilo de plástico (*Pellet Pestle™ Cordless Motor, Sigma-Aldrich®*) en 5 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, DTT 1 mM. Los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min a 4°C con el fin de eliminar los restos subcelulares. El sobrenadante se separó en volúmenes alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.7.1. Cuantificación de proteínas

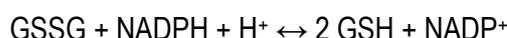
Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford [51] utilizando el reactivo *Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* de BioRad con una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA). La cuantificación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se mezclaron con el reactivo de Bradford en una proporción 1:5000 y se incubaron 15 min a temperatura ambiente antes de medir su absorbancia a 595 nm. La recta patrón se construyó a partir de 8 diluciones de BSA (en un rango comprendido entre 1 y 20 µg de proteína). La ecuación de la recta patrón se obtuvo en base a la representación gráfica de la absorbancia a 595 nm (eje de ordenadas) frente a la concentración de BSA (eje de abscisas). La concentración de proteínas en las muestras se calculó interpolando sus valores de absorbancia a 595 nm sobre dicha recta patrón. Todo el material de plástico y vidrio empleado estaba limpio y libre de detergentes.

3.7.2. Actividad glutatión peroxidasa (GPX)

La GPX oxida al glutatión (GSH) según la reacción:



El ensayo de actividad GPX se basa en el acoplamiento de dicha reacción a la catalizada por la glutatión reductasa (GR), que reduce el glutatión oxidado (GSSG):



La reacción se siguió espectrofotométricamente a través de la medición de la disminución de absorbancia a 340 nm ($\Delta\text{Abs}_{340\text{nm}}/\text{min}$) debido a la oxidación del NADPH. Se siguió el método de Flohé y Günzler [52]. Los extractos de hígado convenientemente diluidos se añadieron a una mezcla de reacción que contenía fosfato potásico 73 mM (pH 7), EDTA 0,7 mM, BSA 0,14 mg/ml, azida sódica 1 mM (inhibe la catalasa presente en la muestra), GSH 1 mM, GR de levadura 0,3 U y NADPH 0,15 mM. La reacción se inició con la adición de H_2O_2 (R-OOH de la reacción de GPx) 0,16 mM. La reacción enzimática se midió durante 2 min. Una unidad de actividad GPx se define como la cantidad de enzima que descompone 1 µmol de NADPH en 1 min.

3.7.3. Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

El ensayo de la actividad G6PDH se basa en la oxidación de la glucosa-6-fosfato y la correspondiente reducción del NADP^+ catalizada por la G6PDH según la reacción:

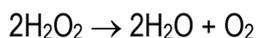


La reacción se midió espectrofotométricamente siguiendo el incremento de absorbancia a 340 nm ($\Delta\text{Abs}_{340\text{nm}}/\text{min}$) que se produce como consecuencia de la generación de NADPH. Se siguió el método de Löhr y Waller [53] con algunas modificaciones. Los extractos se añadieron a una mezcla de reacción que

contenía TrisHCl 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM y β-NADP⁺ 0,45 mM. El ensayo comenzó cuando se añadieron 15 μl de glucosa-6-fosfato 40 mM. La reacción enzimática se midió durante 2 min. Una unidad (U) de actividad G6PDH se define como la cantidad de enzima que genera 1 μmol de NADPH en 1 min.

3.7.4. Actividad catalasa (CAT)

El ensayo de la actividad CAT se basa en la descomposición del H₂O₂ por la catalasa según la siguiente reacción:



La reacción se midió espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia a 240 nm ($\Delta\text{Abs}_{240\text{nm}}/\text{min}$) debido a la descomposición del H₂O₂. Se siguió el método de Beers y Sizer [54]. Los extractos se añadieron a una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato potásico 17 mM (pH 7,0) y H₂O₂ 20 mM. La reacción enzimática se midió durante 1 min. Una unidad de actividad CAT se define como la cantidad de enzima que descompone 1 μmol de H₂O₂ en 1 min.

3.7.5. Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias entre las muestras experimentales se determinó mediante (i) un test de Dunnett para comparar los datos de los distintos grupos experimentales con los del control, (ii) un test *t*-Student bilateral con la corrección de Bonferroni, empleando el programa InStat, versión 2.05/00 (*GraphPad*) para compara grupos experimentales entre sí y (iii) y la herramienta *Xlstat* de Microsoft para hacer análisis de correlaciones.

4. Resultados y Discusión

La evaluación de la toxicidad de mezclas de contaminantes es de vital importancia puesto que no hay duda de que las exposiciones experimentadas en la "vida real" involucran múltiples sustancias químicas. En este trabajo hemos evaluado los efectos de una mezcla de metales y fármacos (MC) sobre los parámetros bioquímicos en plasma, la composición taxonómica de la microbiota intestinal (MI) y los niveles transcripcionales de un grupo escogido de genes en hígado de ratón, tratando de encontrar asociaciones entre determinadas poblaciones de bacterias y la expresión génica y actividad enzimática en el huésped. Además, se ha analizado la capacidad de esta MC de generar un estado de disbiosis que podría tener resultados adversos para la salud del huésped, incluyendo aumento de la toxicidad de algunos xenobióticos. También hemos estudiado la modulación por Se de todos estos parámetros.

4.1. Animales, tratamientos y muestras

Los experimentos de exposición implicaron dos etapas: (i) 6 días de pretratamiento, donde la mitad de los animales recibieron un cóctel de antibióticos y antifúngicos en el agua para deprimir la MI; y (ii) 14 días de tratamiento durante los cuales la mitad de los ratones de cada grupo se alimentó con una dieta enriquecida en Se y la otra mitad con pienso normal. Durante este periodo de tratamiento todos los animales recibieron la mezcla de metales (As, Cd, Hg) en el agua y la mezcla de fármacos (diclofenaco DCF, flumequina FLU) en el pienso. Se estableció además un grupo control con ratones que recibieron agua y pienso normal durante todo el periodo experimental. La Fig. 1 muestra el diseño experimental.

Para la selección de las dosis de metales y fármacos nos basamos en la bibliografía y en nuestros trabajos previos [32, 55-60]. En todos los casos se usaron dosis de contaminantes inferiores a sus LD₅₀ (Tabla 5), puesto que sus posibles efectos sinérgicos podían potenciar su letalidad. La Tabla 5 muestra también la ingesta estimada de cada uno de los compuestos, considerando un peso corporal medio de 24 g y una ingesta media de 5 g de pienso y 5 mL de agua al día [35].

Tabla 5. Ingesta estimada de contaminantes durante el periodo experimental.

Compuesto	Periodo de suministro	Forma de suministro	DL ₅₀ ^a mg/kg peso corporal	Ingesta diaria estimada (mg/kg peso corporal y día)
As	Semanas 2 y 3, tratamiento	Agua de bebida	19 ^b	3
Cd	Semanas 2 y 3, tratamiento	Agua de bebida	95.5 ^c	0.1
Hg	Semanas 2 y 3, tratamiento	Agua de bebida	57.6 ^d	1
Flumequina (FLU)	Semanas 2 y 3, tratamiento	Pienso	1000 ^e	625
Diclofenaco (DCF)	Semanas 2 y 3, tratamiento	Pienso	74 ^f	20

^aEn ratón, vía oral; ^b[61]; ^c[54]; ^d[62]; ^e[63, 64]; ^f[65].

Para estudiar el posible efecto protector del selenio (Se) contra la toxicidad de la mezcla de contaminantes, uno de los grupos experimentales se alimentó con pienso enriquecido en Se durante el tratamiento. El Se se incorpora a numerosos suplementos alimenticios para humanos por sus propiedades inmunoregulatoras y antioxidantes. Pero el Se tiene también una vertiente tóxica, por lo que su ingesta ha de ser controlada. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una ingesta diaria para humanos de 40-75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y día y establece como segura una dosis máxima de hasta 400-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y día como segura [66, 67]. Sin embargo, la mayoría de los preparados alimenticios no suelen exceder de 200 μg de (unas 3 veces la dosis mínima) [68] para evitar el efecto inhibitorio o tóxico ejercido por dosis altas de este oligoelemento. La dieta regular del ratón en nuestro estudio contiene 0,20 mg Se/kg, así que decidimos formular la dieta Se-enriquecida conteniendo 0,65 mg de Se/ kg , una 3 veces la dosis regular de Se en la dieta. A partir de estos contenidos en Se en los piensos, y teniendo en cuenta el peso medio de un ratón y la cantidad de pienso ingerido, se estima que los animales alimentados con la dieta normal ingirieron diariamente 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal y unos 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ los alimentados con la dieta enriquecida en Se.

El estudio del papel de la microbiota intestinal (MI) en la toxicidad de los xenobióticos ha de hacerse comparando ratones normales con otros en los que se ha eliminado total o parcialmente, la flora intestinal. Los ratones libres de gérmenes (ratones gnotobióticos) son de especial utilidad, pero son un modelo inaccesible para muchos investigadores, ya que requieren instalaciones especializadas (estos animales se crían en aisladores para mantenerlos libres de bacterias detectables, eucariotas y virus) y son muy costosos. Como consecuencia, el tratamiento de animales con antibióticos de amplio espectro ha surgido como un método alternativo fácil y de bajo costo para deprimir la MI de los ratones. En la literatura se describen varios regímenes de antibióticos, que difieren en composición, dosis, duración del tratamiento y modo de administración [69]. En este trabajo, los antibióticos (ampicilina (1 g/L), metronidazol, 1 g/L; neomicina, 1 g/L; vancomicina, 0,5 g/L y el antifúngico anfotericina B, 10 mg/L), se añadieron directamente al agua de bebida que se suministró a algunos grupos de animales (Fig. 1) durante el pretratamiento [35]. Considerando una ingesta diaria de 5 mL de agua por ratón, las dosis diarias fueron de 208 mg/kg de peso corporal de ampicilina, metronidazol y neomicina; 104 mg/kg de peso corporal de vancomicina y 2.1 mg/kg de peso corporal de anfotericina B.

No hubo diferencias entre los animales de los distintos grupos experimentales en cuanto a consumo de pienso. Sin embargo, los ratones Abx-PC mostraron rechazo a consumir el agua con Abx (Fig. 4A), probablemente debido al mal sabor del metronidazol. Estos animales también mostraron pérdidas de peso durante el pretratamiento, que se recuperó rápidamente al pasar al periodo de tratamiento. El drástico efecto del pretratamiento con Abx nos llevó, por razones éticas, a cambiar el diseño experimental, en el que estaba previsto suministrar Abx durante las tres semanas (grupo Abx-PC), a esta variante en el que

se suministró la mezcla de Abx solo durante una semana, a modo de pretratamiento, de forma previa a la exposición a la mezcla de contaminantes (MC) y/o Se.

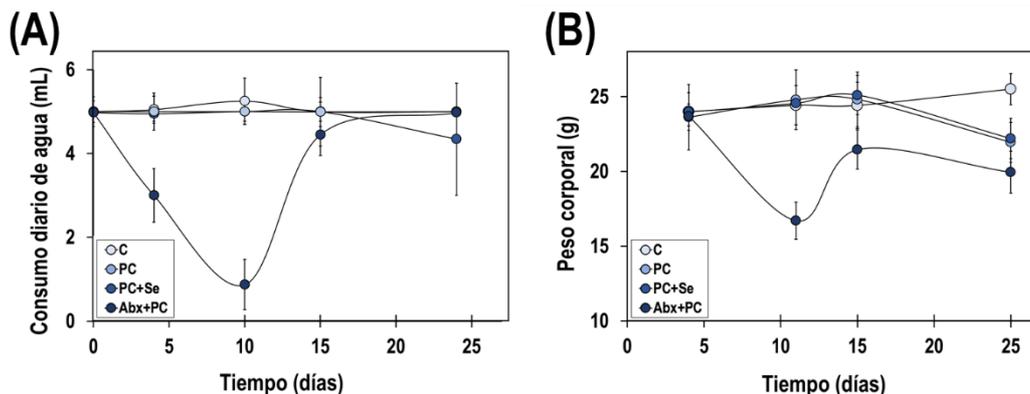
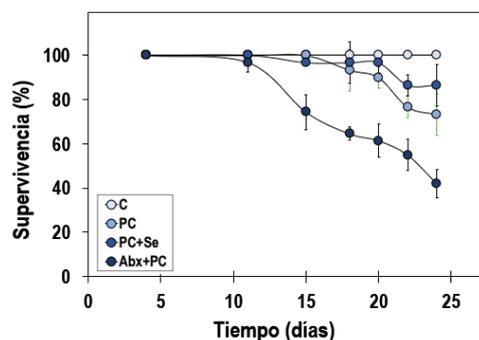


Figura 4. (A) Consumo diario de agua (mL/día) y (B) peso corporal medio de los animales a lo largo del experimento. El consumo de agua se determinó pesando los bebederos cuando se ponían nuevos y retiraban los antiguos, cada dos días.

La Fig. 4B muestra que durante el tratamiento con MC (días 11 en adelante) se produjo una disminución gradual del peso corporal de todos los animales. Entre otros efectos, metales y fármacos alteran la composición de la MI, lo que dificulta la digestión y la asimilación de nutrientes [20, 21, 70], que podría ser causa de esta disminución de peso.

A pesar del efecto de los antibióticos no hubo decesos durante el periodo de pretratamiento. Sin embargo, el cóctel de contaminantes suministrado en agua (metales) y pienso (fármacos) durante el tratamiento afectó a la supervivencia de los ratones (73% de supervivencia en el grupo PC respecto al control C), especialmente de aquéllos que había sido pretratados con antibióticos (46% de supervivencia en el grupo Abx respecto a C) (Fig. 5). Está bien establecida la capacidad de la MI para metabolizar xenobióticos, vía oxidación, reducción, metilación, ligación o secuestro, modulando así su toxicidad para el huésped [20, 70, 71]. Por ejemplo, la MI actúa sobre el arsénico III, transformándolo en As-V, menos tóxico [72], pero es responsable de los daños causados por los antiinflamatorios no esteroideos como el DCF en el intestino delgado [71].

Figura 5. Supervivencia (%) dentro de cada grupo experimental



La letalidad fue menor cuando se suministró a los animales pienso enriquecido en Se durante el tratamiento con MC (Fig. 5). Dicha supervivencia se incrementó entre un 7 y un 13% en los animales PC+Se respecto a PC. Es bien conocida la capacidad del Se de contrarrestar los efectos perjudiciales de ciertos metales tóxicos, como el Cd o Hg y metaloides como el As [31, 73]. El Se antagoniza los efectos del Cd por su capacidad de activar la ruta PI3K/AKT/Bcl-2, que regula el sistema de defensa celular contra daños oxidativos, así como la proliferación celular, la supervivencia y la apoptosis [74]. Esta misma capacidad antioxidante hace que el Se mitigue los daños causados por Hg [75] y As [76]. Además, el Se se une a Hg generando complejos biológicamente inactivos [77] y provoca el tráfico de As desde órganos metabólicamente poco activos (cerebro, pulmón y testículos) a otros con mayor actividad metabólica (riñón), lo que facilita su excreción [32]. También se ha descrito la capacidad del Se de mitigar el estrés oxidativo, la inflamación y diversas anomalías hematológicas en hígado y el riñón de ratas tratadas con DCF [78]. Estas podrían ser causas de la reducción de letalidad que observamos en nuestros ratones alimentados con una dieta enriquecida en Se, como se discutirá más adelante.

A pesar de la letalidad, conseguimos tener muestras de, al menos, 12 animales por grupo, que se distribuyeron aleatoriamente en 4 subgrupos por cada condición experimental. Para las determinaciones de parámetros bioquímicos en plasma, se mezclaron cantidades iguales de plasma de cada uno de los animales dentro de cada lote y condición. Para la preparación de extractos proteicos para medidas de actividad enzimática, se mezclaron cantidades iguales de tejido homogenizado en N₂ de cada uno de los animales dentro de cada subgrupo y condición. En el caso de las heces y del hígado, se aisló DNA y/o RNA individualmente y, en este último caso, se sintetizó el cDNA, a partir de una mezcla de RNA de los individuos tejido de cada uno de los subgrupos dentro de cada grupo experimental.

4.2. Determinaciones bioquímicas en plasma

El análisis de parámetros bioquímicos en sangre proporciona información acerca del estado de salud global del organismo. Los resultados obtenidos al hacer tales determinaciones en plasma de ratones bajo las distintas condiciones experimentales se muestran en la Fig. 6.

No se apreciaron cambios significativos en los niveles de proteínas totales, pero todos los animales expuestos al coctel de pesticidas mostraron una reducción cercana al 50% en los niveles de albúmina. La albúmina es sintetizada por el hígado y se excreta rápidamente en el torrente sanguíneo, donde es una de las proteínas más abundante del plasma. Desempeña importantes funciones fisiológicas y farmacológicas, incluyendo el mantenimiento de la permeabilidad vascular y el transporte de diversas moléculas. Su alto contenido en cisteína le otorga una importante función antioxidante, por lo que la reducción de sus niveles puede actuar como factor que contribuye al desarrollo de varias enfermedades relacionadas con estrés oxidativo, incluyendo hepatopatías, diabetes e incluso cáncer [79].

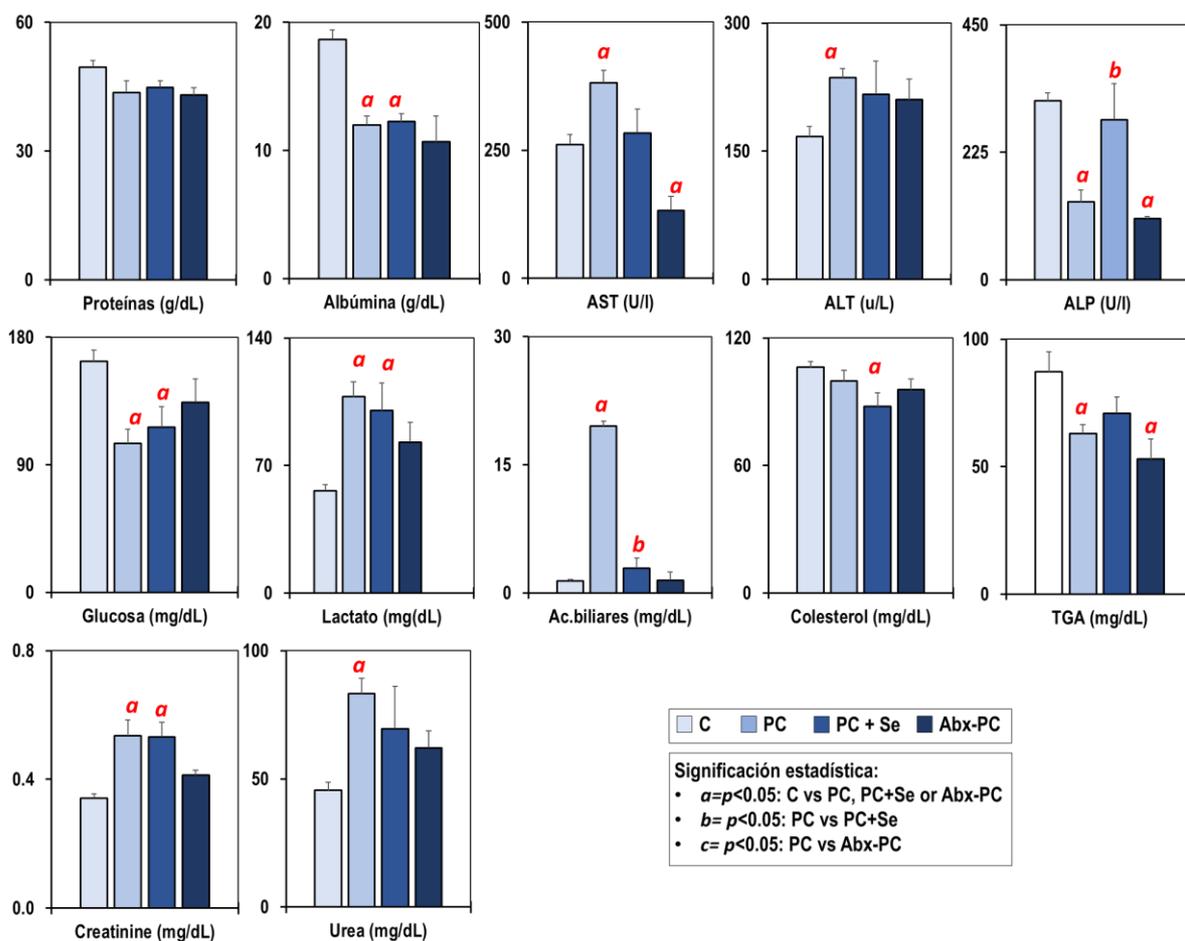


Figura 6. Parámetros bioquímicos en el plasma de *Mus musculus*. Los datos son media de tres determinaciones para cada uno de los cuatro subgrupos dentro de cada grupo experimental. Significación estadística: diferencias respecto a C: $a = p < 0,05$ (test de Dunnett); diferencias PC vs PC+Se : $b = p < 0,05$ (*t*-Student); diferencias PC vs Abx-PC: $c = p < 0,05$ (*t*-Student). C: control; PC: mezcla de contaminantes; PC+Se: mezcla de contaminantes y dieta enriquecida en Se; Abx-PC: pretratamiento con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes para deprimir la MI.

Los cambios mostrados en la Fig 6 en marcadores de daño hepático como AST (aspartato transaminasa), ALT (alanina transaminasa) y ALP (fosfatasa alcalina) refuerzan la hipótesis de que la mezcla de contaminantes está causando hepatotoxicidad. La elevación de los niveles en sangre de estas enzimas se atribuye a daño celular y disrupción de las membranas plasmáticas, que favorecen su liberación [80]. La actividad de ambas aminotransferasas se elevó en los animales del grupo PC y, en el caso de AST, disminuyó significativamente tras el pretratamiento con Abx (Abx-PC vs C), lo que parece sugerir la intervención de este “órgano” en la activación de la hepatotoxicidad de MC [81]. El consumo de una dieta enriquecida en Se disminuyó ligeramente los niveles de ALT y AST [82] sugiriendo un papel protector de este oligoelemento en la toxicidad de la mezcla de contaminantes.

Los niveles de ALP [83] también disminuyeron más de un 50% en los animales PC, independientemente de que hubiesen sido pretatrados con Abx (Abx-PC), lo que es indicativo de alteraciones hepáticas que afectan a la síntesis de ácidos biliares (AB) [84]. Se ha descrito que metales

como As, Cd o Hg [85] o fármacos como DCF [86] o FLU [87] disminuyen la actividad de esta enzima por su capacidad de inhibir FXR (nuclear fRNAesoid X receptor), el receptor nuclear que actúa como sensor de los AB y regula negativamente sus niveles intrahepáticos [88]. La inhibición de FXR incrementa la síntesis de AB, lo que explicaría los altos niveles plasmáticos de estos metabolitos detectados en plasma de ratones PC. La presencia de Se en la dieta de los ratones PC+Se evitó parcialmente el efecto de la mezcla de contaminantes sobre los niveles de ALP y BA, lo que estaría de acuerdo con trabajos que demuestran la capacidad del Se de elevar los niveles de esta enzima [89], de regular los niveles plasmáticos de BA [90] y de reparar daños hepáticos causados por contaminantes [32, 82, 91].

La exposición a contaminantes no produjo cambios significativos en los niveles de colesterol total (CHO) y triglicéridos (TGA) en plasma (C vs PC). FXR controla negativamente la síntesis de colesterol y ácidos grasos en el hígado [92], por lo que cabría esperar que su inhibición potenciara la síntesis de estos lípidos. Sin embargo, se ha descrito que FLU reduce el CHO sérico [87] y que DCF, aunque en menor medida que otros antiinflamatorios no esteroideos, reduce las concentraciones de CHO y TGA en plasma de ratas hiperlipidémicas al reducir su exportación al mismo [93], lo que explicaría la disminución de los niveles de estos metabolitos en el plasma de los ratones expuestos a la mezcla de metales y fármacos. Sí hubo diferencias significativas con el grupo control en los niveles de TGA de los ratones que fueron tratados con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes (Abx-PC). Varios trabajos con animales naturalmente carentes de microbiota o tras deprimir ésta con antibióticos demuestran que la MI desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo de los lípidos a través de la ruta de señalización de los AB [94]. Estos estudios ponen de manifiesto una correlación entre el cambio en la población microbiana intestinal, la disminución de la señalización intestinal por FXR y la variación de la composición del pool de ácidos biliares inducidos por el tratamiento con antibióticos [94].

Todos los ratones expuestos a la mezcla de contaminantes mostraron niveles reducidos de glucosa en sangre, acompañados por altos niveles de lactato. Los niveles de estos dos metabolitos sugieren que la mezcla de contaminantes está dañando las membranas biológicas, incluyendo las mitocondriales, haciendo que el metabolismo de las células deba pasar a estar basado en una alta tasa de glucólisis acoplada a la fermentación láctica (efecto Warburg) a fin de proveerse de ATP en unas circunstancias en las que la cadena respiratoria no es completamente funcional [95] [96]. La inducción de esta reprogramación metabólica ha sido descrita para metales como el As [97]. El Se contrarrestó parcialmente el efecto de la mezcla de contaminantes sobre estos parámetros, lo que está de acuerdo con la capacidad de este oligoelemento de regular el metabolismo [98].

Todos los componentes de la mezcla de contaminantes usada en este estudio se han relacionado con daños renales [99-102]. Los datos de Fig. 6 muestran que la exposición a MC produjo elevados niveles plasmáticos de creatinina y urea, dos marcadores ampliamente usados en clínica para la determinación

de daño renal. La presencia de Se en la dieta de los ratones durante la exposición a la mezcla de contaminantes evitó parcialmente los daños [103].

4.3. Análisis de la composición taxonómica de la MI de ratón mediante cuantificación absoluta por qPCR en tiempo real

El estudio de la microbiota ha ido avanzando conforme lo han hecho las metodologías que permiten la realización de análisis no basados en el cultivo de los microorganismos. En la mayoría de los estudios, los componentes bacterianos de una población microbiana se identifican mediante la secuenciación NGS (*Next Generation Sequencing*) del gen codificante de rRNA 16S seguido de la comparación con las bases de datos de secuencias bacterianas conocidas. Esta metodología proporciona información de la abundancia relativa de los distintos componentes de la microbiota lo que puede conducir a interpretaciones erróneas de las estructuras de la comunidad microbiana desde el momento en que el aumento de un taxón conduce inevitablemente a la disminución concurrente de los otros [104]. Dado que los cambios de composición son mutuamente dependientes, esta metodología proporciona una alta tasa de FDR (False Discovery Rate, probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta a pesar de haber sido rechazada) cuando se analizan los datos utilizando métodos estadísticos tradicionales [105, 106]. La interpretación de los cambios de composición de la microbiota se hace particularmente difícil en estudios longitudinales, tales como exposiciones o tratamientos, que necesitan determinar qué taxón se vio realmente afectado. Además, cuando la carga microbiana varía sustancialmente entre las muestras, el trabajar con perfiles relativos dificulta la posibilidad de vincular las características de la comunidad microbiana con datos cuantitativos como parámetros fisiológicos o concentraciones de metabolitos [107].

Se han propuesto sofisticados métodos estadísticos para soslayar o mitigar este efecto de mutua dependencia de los cambios de los componentes de la microbiota [106, 108, 109]. Pero al final, se siguen teniendo datos relativos, que tienden a sobredimensionar los cambios de abundancia de los elementos menos frecuentes y en ningún caso dan verdadero valor biológico a los cambios [107, 109, 110]. Se han propuesto diversas alternativas para transformar los datos obtenidos por NGS en cuantificación absoluta de la abundancia de los componentes de una microbiota, que van desde la citometría de flujo [107, 111] al uso de DNA sintético [112], pasando por el rendimiento de DNA [110]. Varios autores [112, 113] han propuesto la PCR cuantitativa (qPCR) como un método simple y económico para estimar la carga bacteriana y estimar la abundancia absoluta de los diversos taxones. En este trabajo hemos utilizado una colección de cebadores que permiten la cuantificación absoluta de los grupos bacterianos (filos) más abundantes en la MI de ratón [38, 39], a fin de determinar cómo se ven afectados por la contaminación ambiental. La puesta a punto de nuestro sistema implicó la optimización de un protocolo para el aislamiento de DNA de microbiota y la validación de los cebadores para su uso en qPCR.

4.3.1. Calidad de las muestras de DNA

La extracción de DNA es un paso crítico en los estudios de microbiota, ya que los sesgos introducidos durante este proceso pueden dar lugar a una representación inexacta de los distintos tipos bacterianos en la población en estudio. Sin embargo, obtener buenas preparaciones de DNA a partir de heces no es fácil, ya que son muestras complejas por la presencia de fibras, microbios con diferente resistencia a la lisis, partículas no digeridas, nucleasas y células del huésped. La presencia de estas impurezas puede causar una rotura desigual de los microorganismos, lo que puede dar lugar a una representación inexacta de los distintos tipos bacterianos en la población en estudio [114]. La eliminación de fibras y partículas no digeridas es difícil y suele afectar a la calidad general y a la cantidad de DNA que se aísla. El kit *AllPrep PowerFecal DNA/RNA* (Qiagen) se eligió por su adecuación al tipo de muestra en estudio, de acuerdo con estudios anteriores de nuestro grupo. Este kit incluye pasos que permiten eliminar posibles inhibidores que comprometan las etapas subsiguientes del estudio que implican el uso de polimerasas de DNA. El DNA se aisló a partir de 50 mg de heces crio-homogeneizadas. Esta cantidad fue elegida tras varios experimentos preliminares que mostraron una relación negativa entre la cantidad de material fecal y el rendimiento y calidad del DNA extraído. La concentración y calidad de las muestras de DNA se determinó espectrofotométricamente. No hubo diferencias significativas entre las muestras para ninguno de estos parámetros. La integridad de las preparaciones se evaluó en términos de fragmentación del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa. En todas las muestras se observó una banda estrecha de más de 3 Kb cercana al pocillo de carga, que indica que la extracción no alteró la integridad del DNA (Mat. Supl. 1). Se comprobó la ausencia de inhibidores de polimerasas en las muestras extraídas llevando a cabo una PCR con cebadores universales específicos para el gen rRNA-16S (Mat. Supl. 2). Todas las muestras amplificaron, dando lugar a un único amplicón de unos 300 pb, como se esperaba. La intensidad de las distintas bandas fue generalmente homogénea y superior a la obtenida en condiciones similares con un DNA control aislado a partir de un cultivo puro de *Pseudomonas*, usado como control, indicando ausencia de inhibidores en las preparaciones.

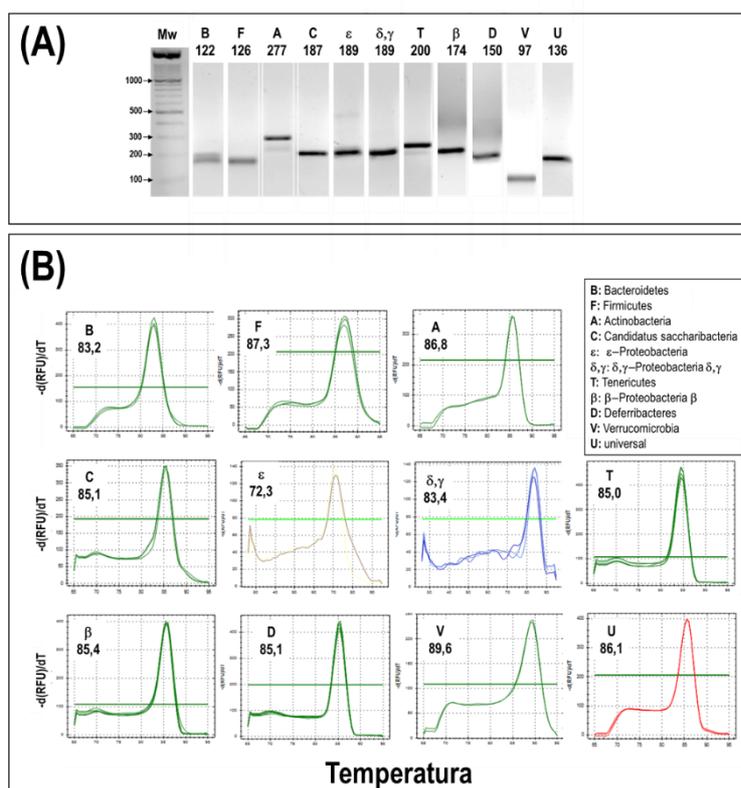
4.3.2. Validación del lote de cebadores para identificar fillos en MI

Se probaron distintas condiciones de amplificación a fin de determinar las más específicas y eficientes, estableciéndose la temperatura de 55° como la más adecuada para la hibridación de este lote de cebadores. Las reacciones de PCR contaron, pues con un paso de desnaturalización inicial (5 min 95°C), 40 ciclos con los siguientes pasos: 15s a 95°C; 30s a 55°C y 30s 60°C) y una curva de fusión. En estas condiciones, todas las parejas de cebadores generaron productos únicos del tamaño esperado con una única Tm (Fig. 7) y una eficiencia de amplificación próxima al 100% (Tabla 3).

Para comprobar que el protocolo de extracción de DNA permitía la lisis por igual de bacterias Gram+ y Gram-, se amplificó, con todas las parejas de cebadores, DNA extraído a partir de una muestra de referencia en idénticas condiciones al resto de las muestras. Esta muestra de referencia es una población estándar (*ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard*, Ref 6306) constituida por cantidades conocidas de distintos tipos de bacterias pertenecientes a los filos *Firmicutes* ($\cong 75\%$, Gram+) y *Proteobacteria* ($\cong 25\%$, Gram-).

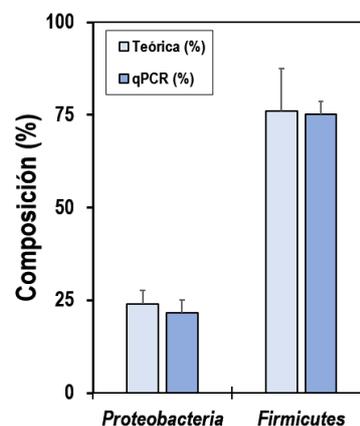
Figura 7. Especificidad de amplificación.

(A) Gel de agarosa de productos qPCR para cada pareja de cebadores con el tamaño esperado. Se mezclaron cantidades iguales de DNA de heces de ratones de todos los grupos experimentales y se amplificaron con cada par de cebadores. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa, junto con un patrón de peso molecular. (B) Curvas de fusión de los amplicones generados con cada pareja de cebadores, que muestran un solo pico (valor de T_m del amplicón).



Solo amplificaron los cebadores específicos de *Firmicutes* y *Proteobacterias* y determinaron proporciones de ambos filos en la población estándar similares a las teóricas. La Fig. 8 compara los porcentajes y muestra que el protocolo de extracción permitió aislar con igual eficacia DNA de bacterias Gram+ y Gram-.

Figura 8. Comparación de la composición teórica de la muestra de referencia con la obtenida por qPCR utilizando los cebadores de la Tabla 3. La muestra de referencia *ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard*, Ref 6306 se compone de bacterias γ -Proteobacterias y Firmicutes.

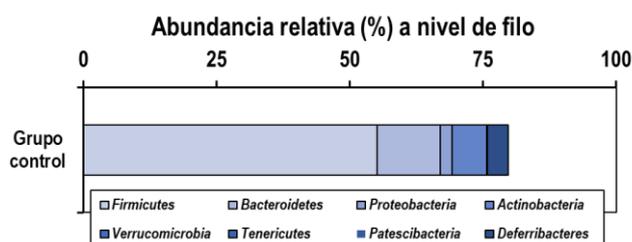


4.3.3. Efectos de la exposición a un cóctel de contaminantes sobre la MI de ratón mediante cuantificación absoluta por qPCR en tiempo real. Posible efecto protector de una dieta enriquecida en Se.

Para evaluar el efecto de la exposición a la mezcla de contaminantes (metales y fármacos) sobre la composición taxonómica de la MI de ratón, a fin de establecer posibles correlaciones con los cambios detectados en plasma e hígado, se llevó a cabo una qPCR con muestras de DNA extraídas de ratones en las distintas condiciones experimentales empleando la colección de cebadores de la Tabla 3.

La carga bacteriana total de las muestras se determinó utilizando cebadores universales que amplifican rRNA 16S sin distinguir tipos de bacterias. A partir de los valores de C_T y extrapolando sobre la recta patrón, se estimó en los animales del grupo control (C) una media de $2,9 \times 10^{10}$ copias de rRNA 16S por cada μg de DNA, equivalente a $2,9 \times 10^{12}$ copias de rRNA 16S por gramo de MI. Estos datos de carga bacteriana total en la MI de ratón concuerdan con los descritos por otros autores [115]. La Fig.9 muestra la abundancia relativa de las poblaciones evaluadas mediante qPCR en los ratones del grupo control.

Figura 9. Abundancia relativa de los distintos filos predominantes en la MI de los ratones control. Se muestra la abundancia media (%) determinada por qPCR empleando tres réplicas técnicas en cada uno de los 4 subgrupos en que se dividieron los 12 ratones del grupo control.



De acuerdo con la literatura [38, 39], encontramos que los *Firmicutes* suponen más del 50% de las bacterias en la MI de ratón (carga total de $1,6 \times 10^{10}$ copias/g de heces) seguidos de los *Bacteroidetes*, cuya abundancia media es de un 11,7 %. Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son generalmente dominantes en todos los vertebrados sanos, en los que desempeñan diversas funciones, incluyendo la producción de metabolitos, la maduración del sistema inmune o el almacenaje de grasa. *Actinobacteria* (6,5%), *Deferribacteres* (3,9%) y *Proteobacteria* (2,3%) son los grupos que siguen en abundancia. Todos estos géneros se han relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta (SGFA, butirato, acetato, propionato, etc.) que previenen y reducen la obesidad y diversas enfermedades metabólicas relacionadas [116]. La abundancia de *Deferribacteres* es característica de la microbiota murina, siendo un género muy poco abundante en humanos. Los restantes filos estudiados (*Verrucomicrobia*, *Tenericutes* y *Candidatus Sacch.*) no alcanzan en conjunto ni el 0,2%, aunque se detectaron en todos los animales.

La capacidad de nuestro lote de cebadores para perfilar una microbiota a nivel de filo se evaluó comparando los resultados obtenidos en el grupo control mediante qPCR con los obtenidos mediante secuenciación de la región variable V3-V4 del gen rRNA 16S (Illumina) de la MI. La Figura 10 compara los valores de abundancia determinados con ambas aproximaciones metodológicas. Se encontró una alta correspondencia cualitativa ($R^2 = 99\%$) entre ambas metodologías, aunque las abundancias de los taxones detectadas no fue la misma en todos los casos. Por ejemplo, encontramos que la proporción de *Candidatus Saccharibacteria* fue mayor con NGS mientras que el porcentaje de *Deferribacteres* fue mayor, con qPCR, resultados que están de acuerdo con los de otros autores [38].

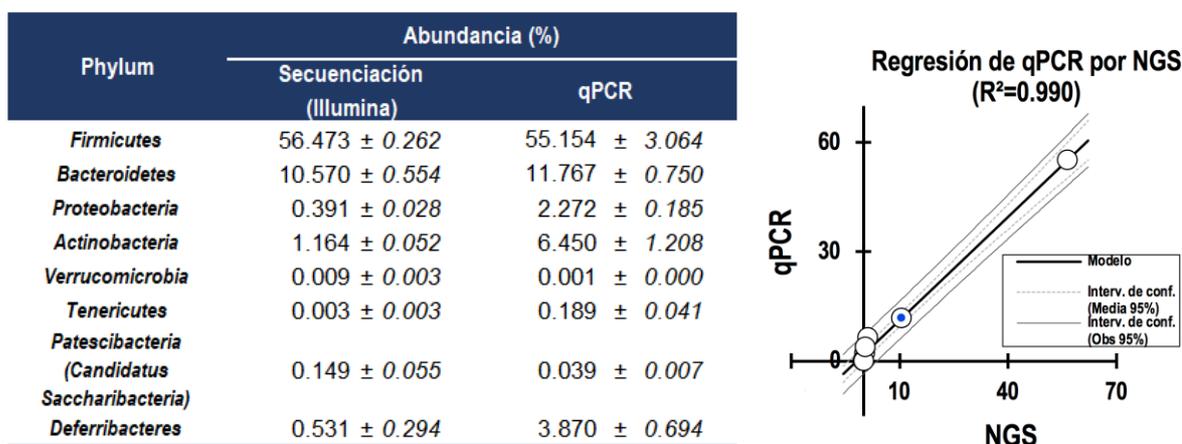


Figura 10. Análisis de regresión comparando la abundancia de los distintos filos en la MI de ratones del grupo control determinada mediante secuenciación de la región variable V3-V4 del gen rRNA 16S con la plataforma Illumina y mediante qPCR. En ambos casos se utilizaron las mismas preparaciones de DNA, obtenidas a partir de 12 ratones distribuidos en cuatro subgrupos. Se muestra la abundancia media (%) ± SEM de las 4 determinaciones en cada caso. La correlación se determinó mediante la herramienta XLSTAT de Microsoft).

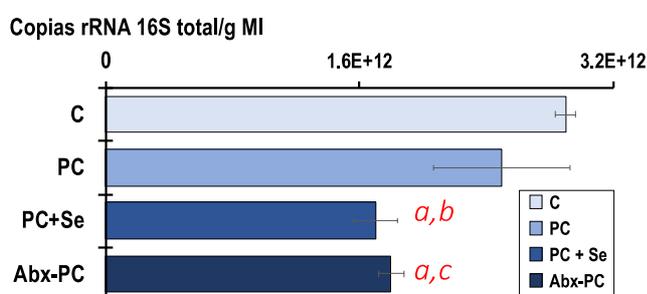
Estas diferencias eran de esperar, ya que las determinaciones mediante la plataforma Illumina dependen de múltiples factores que pueden introducir sesgos en la cuantificación. Uno de estos factores es que se basan en la amplificación de la región V3-V4, lo que lleva a la subestimación de la abundancia de algunos importantes grupos taxonómicos como *Actinobacterias* [117]. De hecho, nuestros resultados indican que la abundancia real de este taxón en la MI de ratón determinada por qPCR es 5 veces superior a la estimada por NGS (Fig. 10). Además, la cuantificación mediante NGS proporciona datos de abundancia que dependen de la cantidad total de bacterias y de la abundancia relativa de los distintos taxones presentes en la microbiota analizada [104], y los taxones escasamente representados tienden a ser minusvalorados por los métodos estadísticos utilizados para normalizar los datos [113]. Aunque restringida a un número limitado de dianas, la PCR cuantitativa (qPCR) supone un enfoque factible para estimar las abundancias absolutas y proporcionar perfiles cuantitativos de la microbiota. Esta metodología es perfectamente adecuada para la estimación de la abundancia microbiana, ya que permite el cálculo del

número de copias de un gen específico por cantidad de DNA total. La especificidad de los cebadores utilizados hace que esta metodología sea aplicable también a muestras donde haya sustanciales cantidades de DNA no bacteriano [113].

Una vez validada, se utilizó la batería de cebadores para cuantificar de manera absoluta por qPCR del número de copias de rRNA 16S de los 10 filos predominantes en la MI de ratón, en cada uno de los grupos experimentales. Así puede estudiarse el efecto sobre la composición de la MI de la exposición a la mezcla de contaminantes (grupo PC vs C), la capacidad del Se de paliar estos efectos (PC+Se vs PC) y el posible papel de la microbiota (grupo Abx-PC vs PC) en la activación/destoxificación del cóctel. Los valores medios de copias de rRNA 16S de cada uno de los filos por gramo de MI obtenidos para cada subgrupo (n=4) dentro de cada grupo experimental se recogen en la Tabla Mat. Supl. 3.

La exposición a la mezcla de contaminantes disminuyó de modo desigual (0-30%) la carga bacteriana total de los ratones del grupo PC (Fig. 11). Este efecto de la mezcla de contaminantes es de esperar dado que uno de sus componentes es la FLU, un antibiótico con capacidad de inhibir enzimas clave (DNA girasa y topoisomerasa IV) de bacterias Gram- y algunas Gram+. Además, tanto los metales como el DCF presentes en el cóctel tienen probados efectos tóxicos sobre las bacterias por su capacidad, entre otras, de producir estrés oxidativo [118] [119, 120]. Por esta razón, la disminución del 40% del contenido en bacterias en animales que ingirieron una dieta enriquecida en Se durante el tratamiento fue inesperado, dado el conocido papel del Se en potenciar la respuesta antioxidante en ratones [121]. Existe un número limitado de trabajos que investiguen en detalle el efecto de una dieta enriquecida en Se sobre la MI [39, 122] y, en general, el análisis de la composición de la microbiota se expresa en términos de abundancia relativa, haciendo que se pierda la perspectiva de cómo se afecta la carga bacteriana total. Solo el uso de qPCR permite la cuantificación absoluta de esta carga bacteriana total. Nuestros resultados sugieren que el Se puede ser tóxico para determinados grupos bacterianos y favorecer la proliferación de otros, lo que llevaría a un cambio en la diversidad poblacional asociado al Se [39, 122-124].

Figura 11. Carga bacteriana total. Número absoluto (media \pm SEM) de copias/g de MI del gen rRNA 16S. Significación estadística: diferencias respecto a C: *a* = $p < 0,05$ (test de Dunnett); diferencias PC vs PC+Se: *b* = $p < 0,05$ (*t*-Student); diferencias PC vs Abx-PC: *c* = $p < 0,05$ (*t*-Student). C: control; PC: mezcla de contaminantes; PC+Se: mezcla de contaminantes y dieta enriquecida en Se; Abx-PC: pretratamiento con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes para deprimir la MI.



La Fig. 12 muestra los cambios inducidos por los distintos tratamientos sobre la composición de la MI a nivel de filo obtenida mediante qPCR. Se observaron marcadas diferencias entre los grupos C y PC en todos los filis estudiados con la excepción de *Firmicutes*, que solo se vio afectado negativamente en presencia de Se o en los animales pretratados con Abx.

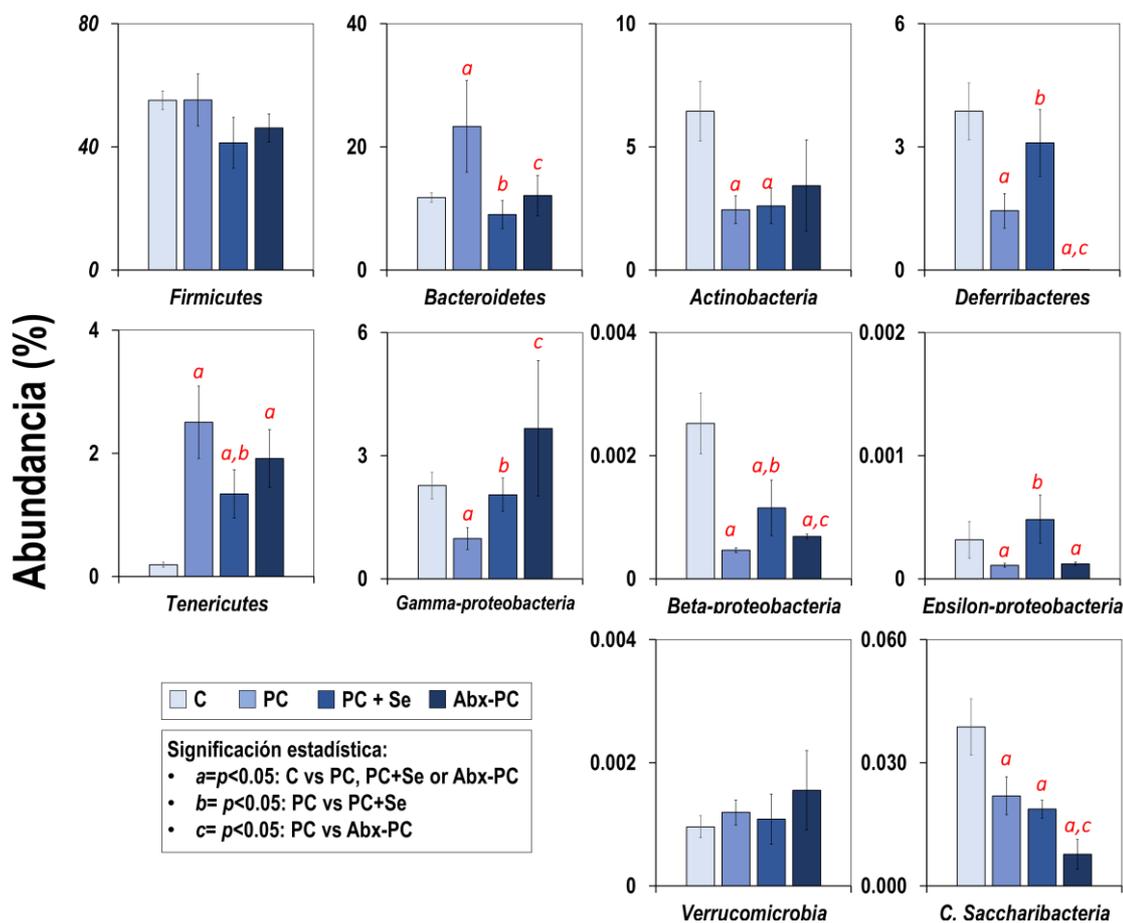


Figura 12. Abundancia (%) de los filis mayoritarios en MI de ratones de los distintos grupos experimentales.

Se calculó el número de copias/g de MI del gen rRNA 16 específico de cada filo mediante los cebadores adecuados y su porcentaje respecto al número de copias/g totales determinado usando cebadores universales. Se representa la media \pm SEM de los 4 subgrupos en que se dividieron los 12 animales dentro de cada grupo experimental. Significación estadística: diferencias respecto a C: $a = p < 0,05$ (test de Dunnett); diferencias PC vs PC+Se: $b = p < 0,05$ (t -Student); diferencias PC vs Abx-PC: $c = p < 0,05$ (t -Student). C: control; PC: mezcla de contaminantes; PC+Se: mezcla de contaminantes y dieta enriquecida en Se; Abx-PC: pretratamiento con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes para deprimir la MI.

La exposición al cóctel de contaminantes (PC vs C) elevó la abundancia de *Bacteroidetes* (Gram-, x2,4), *Tenericutes* (Gram-, x13,2) y *Verrucomicrobia* (Gram-, x1,24) y disminuyó la de *Actinobacteria* (Gram+, ÷2,6), *Deferribacteres* (Gram-, ÷2,7), todas las *Proteobacteria* (Gram-, ÷2,3) y *Candidatus Saccharibacteria* (÷1,8). La exposición en presencia de una dieta enriquecida en Se (PC+Se vs C) disminuyó el efecto de la mezcla de contaminantes sobre todos los filis, excepto en los casos de *Actinobacteria* y *Candidatus Saccharibacteria*. El tratamiento con Abx antes de la exposición al cóctel

también impidió el incremento en el número de *Bacteroidetes*, el decremento de *Proteobacterias* y palió el efectos sobre *Actinobacteria* y *Tenericutes*. Por el contrario, tuvo un gran efecto negativo sobre *Candidatus Saccharibacteria* y, sobre todo, *Deferribacteres*.

El filo *Bacteroidetes* se compone de bacterias Gram-, muchas de ellas anaerobias, e incluye géneros como *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* y *Prevotella*, considerados beneficiosos por su capacidad de degradar y sintetizar carbohidratos complejos y por su posible relación con el metabolismo de carbohidratos y lípidos [125]. Junto con los *Firmicutes*, los *Bacteroidetes* son importantes productores de acetato y propionato, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) generados como productos finales de la fermentación de la fibra de la dieta por la MI anaerobia. El acetato, SCFA mayoritario, es captado por el hígado, donde se convierte en acetil-CoA y se usa como fuente de energía (ciclo de Krebs, CK) y/o sustrato para la síntesis de colesterol y ácidos grasos. El propionato también es captado por el hígado, donde se transforma en succinil-CoA que entra en el CK y puede usarse como generador de energía o precursor gluconeogénico [126]. El incremento (x2,4) en la abundancia de *Bacteroidetes*, productores de estos SCFA, en principio, contradiría los resultados mostrados en la Fig.7 donde se ve que el cóctel de contaminantes causa un ligero descenso en los niveles plasmáticos de CHO y TGA. Sin embargo, y a pesar de los múltiples estudios existentes, definir inequívocamente el papel de estos SCFA en la regulación metabólica es imposible, ya que en muchas ocasiones los resultados son contradictorios. Por ejemplo, se ha comprobado que el acetato activa también la ruta AMPK [127], favoreciendo la entrada de glucosa en las células y reduciendo los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres al inhibir a SREBP-1c, el principal regulador de la expresión de genes adipogénicos en el hígado [128], lo que sí explicaría nuestros resultados de la Fig.6.

La exposición a MC causó una bajada superior al 50% en la abundancia del filo *Actinobacteria* en la MI de los ratones PC e incrementó (x13,2) la abundancia de *Tenericutes*. El filo *Actinobacteria* está formado por bacterias Gram+ agrupadas en tres familias de anaerobios (*Bifidobacteria*, *Propionibacteria* y *Corynebacteria*) y una de aerobios (*Streptomyces*). La más representada en humanos es la familia de *Bifidobacteria*, ampliamente usada como probiótico. Estas bacterias desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal evitando el paso de bacterias a la sangre. Son también grandes productoras de acetato y su disminución en la MI se ha asociado con depresión, ansiedad y angustia [129]. Los *Tenericutes* presentan una única clase: los *Mollicutes*. Estudios recientes asocian el incremento de *Tenericutes* con alteraciones de la barrera intestinal [130] y comportamiento disfuncional (depresión, sociopatía) [131]. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la exposición a MC podría estar causando un daño funcional en la barrera intestinal de los ratones PC, probablemente favoreciendo la entrada de bacterias y metabolitos en la sangre y causando daños neurodegenerativos a través del eje microbiota/cerebro.

La abundancia del filo *Deferribacteres* disminuyó en más de un 50% en los ratones PC. Esta bajada, en combinación con el incremento en los niveles de *Bacteroidetes* y *Tenericutes*, se ha asociado recientemente con una reducción en la biosíntesis de ácidos grasos pero también en el metabolismo de xenobióticos [132], lo que supondría una alteración en los mecanismos de defensa de estos animales frente a la contaminación.

Tres clases de *Proteobacterias*, gamma- (la mayoritaria), beta- y épsilon-, se detectaron en todos los grupos de ratones analizados y los tres se vieron afectados de igual manera por MC (ratones PC) o la presencia de Se en la dieta (ratones PC+Se), aunque con distinta intensidad. Este filo es está formado por bacterias Gram- e incluye géneros como *Bordetella* y *Neisseria* (*Betaproteobacteria*), *Escherichi*, *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia* (*Gammaproteobacteria*) y *Helicobacter* (*Epsilobacteria*). Muchas de estas *Proteobacterias* son patogénicas y otros géneros se han relacionado con inducción de resistencia a insulina y síndrome metabólico [133]. La exposición a MC hizo que la proporción de estas bacterias disminuyera más de un 50%, aunque tal efecto se redujo en ratones que tomaron el suplemento de Se. Al igual que otros procariontes, algunas *Proteobacterias* son capaces de usar Se (y As) [134] en su metabolismo energético. Además, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la presencia de Se en la dieta incrementa la abundancia de *Proteobacterias* [37].

En conjunto, y teniendo en cuenta la gran cantidad de estudios, no siempre concordantes, que existen acerca de la compleja relación entre la composición de la MI y el metabolismo, se puede concluir que la exposición de los ratones a MC produce cambios en la composición de la MI y en la integridad de la barrera intestinal, que podrían estar relacionados con alteraciones en el metabolismo hepático de lípidos y carbohidratos, posiblemente a través de los subsecuentes cambios en los niveles y proporciones de SCFA. Esto se traduciría en cambios en los parámetros bioquímicos en plasma como los mostrados en la Fig.7. El consumo de una dieta enriquecida en Se durante la exposición a MC redujo significativamente los efectos de ésta sobre la abundancia de las poblaciones de *Bacteroidetes*, *Tenericutes*, *Deferribacteres* y *Proteobacteria* (Figura 12). Estos resultados indican que el Se modula la MI [37, 123], modulando los mecanismos de defensa frente a la acción de los contaminantes [32, 82, 91]. Por otra parte, aunque las variaciones que produjo MC en la abundancia de *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Épsilonproteobacteria* y *Tericutes* no se afectaron por el pretratamiento con Abx (Abx-PC vs PC), la recuperación de la MI tras éste pretratamiento determinó que los niveles de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* o *Verrucomicrobia* no se viera alterada por la presencia de contaminantes, pero sí inhibió el crecimiento de otros filos bacterias, especialmente *Deferribacteres*, o potenció su capacidad de ocupar el ecosistema, especialmente *Gammaproteobacteria*.

4.4. Efectos de la exposición al MC sobre los perfiles transcripcionales hepáticos de genes relacionados con estrés oxidativo y metabolismo.

A pesar de los numerosos estudios existentes, los mecanismos de toxicidad de los componentes de la MC usada en este estudio son complejos y no se conocen completamente. Algunos actúan reemplazando al fosfato en determinadas reacciones (As) [97], reaccionan con los grupos tiólicos de las proteínas, inactivándolas (As, Hg)[97, 135] y causan estrés oxidativo (metales, DCF, FLU) [56, 135, 136], inflamación y alteraciones epigénéticas. Los resultados mostrados en apartados anteriores sugieren daños en los hepatocitos de los ratones expuestos a MC que implican alteraciones en las membranas y en el metabolismo de la glucosa, así como en el de los lípidos y ácidos biliares. Para verificar estas hipótesis, se llevó a cabo un análisis mediante qRT-PCR cuantitativa absoluta de algunos de los transcritos implicados en las distintas rutas mencionada. La qRT-PCR cuantitativa absoluta exige el uso de genes de referencia, pero implica exigencias extremas en cuanto a la calidad del RNA empleado. En este trabajo solo empleamos RNAs hepáticos con valores de RIN superiores a 8,5, con ratios A_{260}/A_{280} de alrededor de 2 y libres de DNA genómico. Todos los cebadores (Tabla 4) amplificaron con eficiencias próximas al 100% dentro de un rango de 5-7 órdenes de magnitud, lo que demuestra además la ausencia de inhibidores de la polimerasa en las muestras. Todos los cebadores empleados generaron un único amplicón del tamaño esperado con eficiencias próximas al 100%.

4.4.1. La exposición a MC modula la respuesta antioxidante mediada por NRF2

Dado que los daños oxidativos y/o la interacción con grupos tiólicos están implicados en los mecanismos de toxicidad de todos los componentes de MC, analizamos la inducción de la respuesta celular antioxidante mediada por NRF2 cuantificando los niveles de algunos de los genes que están bajo su control transcripcional. El factor de transcripción NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) es conocido como uno de los reguladores más importantes tanto en la respuesta celular frente a estrés oxidativo como por exposición a xenobióticos, y estudios recientes han identificado nuevas funciones de NRF2 que incluyen la regulación de la inflamación, autofagia, el metabolismo o la proteostasis [137]. El funcionamiento de NRF2 está estrechamente regulado, como lo están los genes bajo su control y entre los que están algunos que codifican para enzimas de Fase I (aldo-ceto reductasas, AKRs; aldehído deshidrogenasa 1, ALDH1; ciertos citocromo P450 oxidorreductasas, CYPs); de Fase II como algunas glutatión S-transferasas (GST); antioxidantes generales como la hemoxigenasa (HO-1), las enzimas que participan en la biosíntesis de glutatión, y enzimas y proteínas implicadas en reacciones redox como tiorredoxina, tiorredoxina reductasa, sulfirredoxina, peroxirredoxina, glutatión peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa 1 (SOD1) y catalasa (CAT). La Fig. 13A muestra los niveles de expresión de algunos

genes regulados por NRF2 en ratones expuestos a MC bajo las distintas condiciones experimentales, en comparación con los ratones del grupo control.

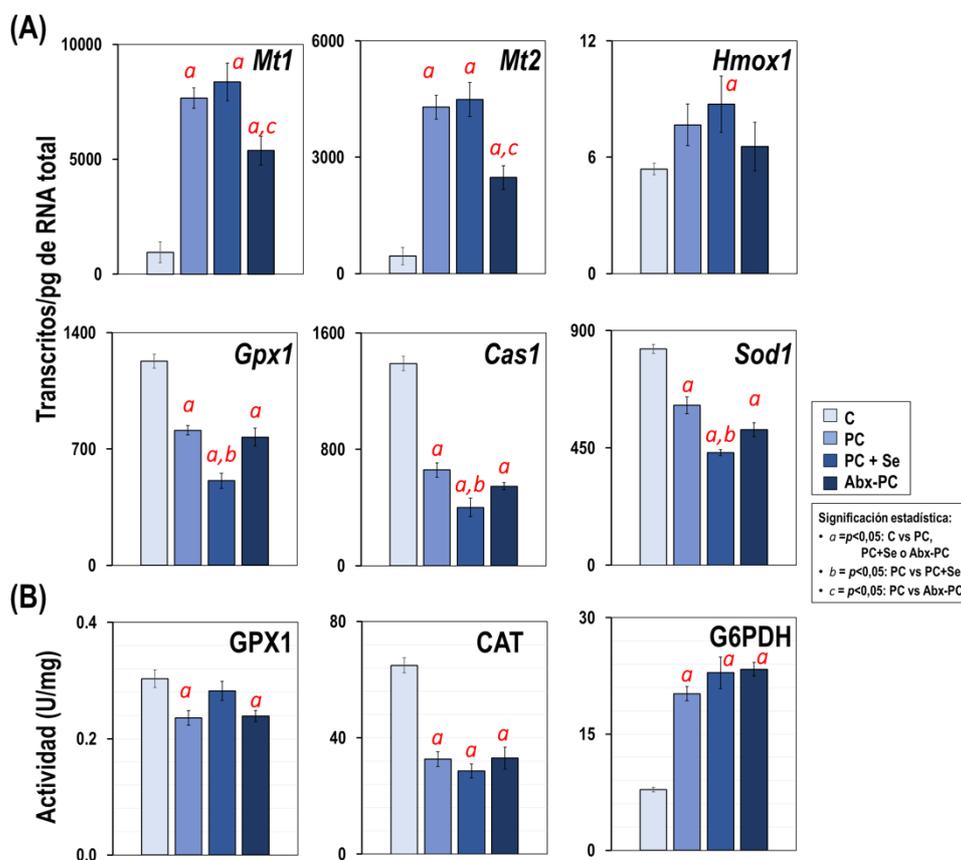


Figura 13. (A) Niveles de transcritos/pg de RNA total de genes de defensa antioxidante y (B) Medida de actividad enzimática (U/mg) en hígado. Se representa la media \pm SEM de los 4 subgrupos en que se dividieron los 12 animales dentro de cada grupo experimental. Significación estadística: diferencias respecto a C: $a = p < 0,05$ (test de Dunnett); diferencias PC vs PC+Se: $b = p < 0,05$ (t -Student); diferencias PC vs Abx-PC: $c = p < 0,05$ (t -Student). C: control; PC: mezcla de contaminantes; PC+Se: mezcla de contaminantes y dieta enriquecida en Se; Abx-PC: pretratamiento con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes para deprimir la MI.

Mt1 y *Mt2* codifican para las metalotioneinas 1 y 2, respectivamente y sus niveles de transcritos se elevaron considerablemente (x 8-9 veces) en los animales expuestos a MC. Las metalotioneinas (MT) son proteínas pequeñas y ubicuas con un alto contenido en cisteína, transcripcionalmente reguladas por NRF2 y con un importante papel en la regulación de la homeostasis metales esenciales como Zn y Cu y en la defensa frente a metales pesados y frente a estrés oxidativo. Se han descrito incrementos en sus niveles de expresión en animales expuestos a metales [138] y DCF [57, 139]. También se encontraron niveles elevados de transcritos del gen *Hmox1* que codifica la hemoxigenasa-1 (HO-1), otra importante diana de NRF2. HO-1 cataliza la degradación del grupo hemo en biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro libre, cada uno de los cuales de alguna manera ejercen un potente estrés antioxidante y funciones antiinflamatorias [140]. Estos datos concuerdan con los obtenidos para MT, así como con trabajos previos

de otros autores demostrando que los componentes de MC inducen la expresión de HO-1 [141, 142]. Los ratones expuestos a MC bajo una dieta enriquecida en Se mostraron respuestas algo mayores para estos tres genes (Fig. 13A), probablemente por el carácter oxidante del Se y la presencia de éste en cantidades no tóxicas. Estos resultados sugieren un efecto beneficioso de suplementos de Se en la dieta para reforzar las defensas antioxidantes. Por el contrario, el pretratamiento de los animales con la mezcla de Abx para deprimir la MI antes de la exposición a MC hizo que la respuesta de los genes *Mt1* y *Mt2* fuera menor que en los ratones control y que la de *Hmox1* no variara. Este resultado podría interpretarse asumiendo un papel activo de la MI en la potenciación de la toxicidad de MC y refleja una respuesta transcripcional en respuesta de NRF2 característica de cada uno de los genes del regulón.

El sistema de defensa antioxidante endógeno desempeña un papel importante en la protección de las células frente a daños oxidativos. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) inactivan el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los radicales peróxido, transformándolos en agua y oxígeno. Las glutatión peroxidasa (GPX) son también enzimas antioxidantes que utilizan GSH para detoxificar H_2O_2 y peróxidos lipídicos. Nuestros resultados indicaron una disminución de los transcritos que codifican GPX1, SOD1 y CAT (Fig. 13A) en hígado de ratones expuestos a MC. Estos resultados parecen inesperados, dado que los componentes de MC generan ROS [56, 135, 136]. Por ello, comprobamos si la exposición a MC causaba disminución de la actividad de estas enzimas, además de disminuir su expresión (Fig. 13B). La Fig. 13 A y B muestran patrones de respuesta parecidos tanto para GPX como para CAT. Resultados similares a los encontrados aquí se han descrito para Hg, Cd y DFC [143-145], y se atribuyen a su capacidad de interactuar con grupos tiólicos de las propias enzimas y de privar a la célula de GSH. El mantenimiento de los niveles de GSH depende de la presencia de NADPH. Por ello, comprobamos el efecto de la exposición a MC sobre la actividad de otra enzima, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), subsidiaria de la defensa antioxidante en tanto que suministra poder reductor a muchas enzimas. La G6PDH es la primera enzima de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) que deriva la glucosa hacia la generación de NADPH. La Fig. 13B demuestra que todos los ratones expuestos a MC presentaron altos niveles de esta enzima.

La reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes puede deberse a la reactividad de los componentes de MC con las propias proteínas o a la acumulación de metabolitos citotóxicos en el tejido hepático de los ratones expuestos a MC, lo que también explicaría los daños hepáticos que implican la liberación de transaminasas mostradas en la Fig. 6. Si bien esto justifica la reducción de estas actividades pese a la inducción de NRF2, el factor de transcripción que controla su expresión, la explicación de la disminución de los niveles de sus transcritos puede deberse a un efecto inactivante de MC sobre el propio NRF2 o sobre alguno(s) de los factores implicados en su cascada de señalización. Así, se sabe que NRF2 interacciona con distintas quinasas para regular diferentes genes [146].

La presencia de Se en la dieta o el pretratamiento con Abx no tuvo efecto sobre la expresión de los genes *Gpx1*, *Sod1* y *Cas1* inducida por el tratamiento con MC.

4.4.2. La exposición a MC reduce la vía glucolítica y potencia la ruta de las pentosas fosfato

En el apartado 4.2 se discutieron los altos niveles plasmáticos de lactato (Fig. 6) atribuyéndolos a un cambio metabólico hacia el efecto Warburg, una alta utilización de glucosa en el proceso de glucolisis aerobia como fuente mayoritaria de ATP causado por daños en las membranas mitocondriales que impedirían el funcionamiento normal de la cadena de transporte electrónico. Para estudiar el efecto de la exposición a MC sobre la ruta glucolítica analizamos la expresión de los genes *Pfk1* (fosfofructoquinasa 1, que convierte fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato), *Gapdh* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, cataliza la fosforilación y oxidación de gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bis-fosfoglicetato) y *Pk* (piruvato quinasa, enzima que cataliza el último paso irreversible de la glucolisis, convirtiendo fosfoenolpiruvato en piruvato). Los datos en la Fig. 14 muestra que la exposición a MC causó un efecto desigual sobre la expresión de los tres genes analizados. Los transcritos de *Pfk1* se incrementaron significativamente en los ratones PC, mientras que disminuyeron los niveles de *Gapdh* y *Pk*. El incremento en la expresión de *Pfk1* está ligado a la glucolisis aerobia y viene controlado por la inducción de HIF-1 α , que también causa una disminución en el uso de piruvato por la piruvato deshidrogenasa (PDH) y reduce la respiración oxidativa [147]. PK y GAPDH constituyen importantes puntos de control del flujo de G6P entre PPP y glucólisis. Se ha descrito que el estrés oxidativo induce, tanto a nivel génico como metabólico, la desviación de la G6P hacia la PPP [148]. En un principio, la transición ocurre por inactivación de las enzimas GAPDH y PK, pero el bloqueo de la glucolisis pone en marcha sistemas reguladores que, entre otros, conllevan la represión de los genes que las codifican y la inducción de genes que codifican enzimas de la PPP, además de modificaciones post-traduccionales, incluidas las que aumentan la actividad de G6PDH [148] (Fig. 13), bajo control de NRF2. Se ha descrito que parte de la potente acción antioxidante de NRF2 se realiza a expensas del metabolismo central [149]. La inducción de NRF2 ocasiona la salida de alfa-cetoglutarato del ciclo de Krebs que se destina a la síntesis de glutamato y de GSH. Esto limita la actividad del CK y de la mitocondria y favorece una reprogramación metabólica basada en la glucolisis aerobia generadora de lactato y la potenciación de la PPP [149].

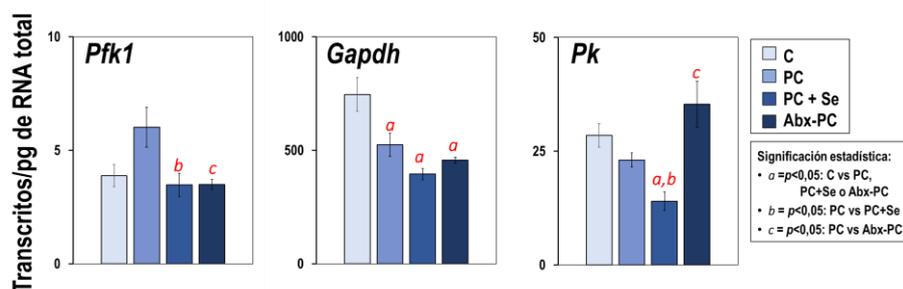


Figura 14. Niveles de transcritos en hígado de ratones expuestos a MC bajo distintas condiciones experimentales. Se representa la media \pm SEM del número de transcritos/pg de RNA total de los 4 subgrupos en que se dividieron los 12 animales dentro de cada grupo experimental. Significación estadística: diferencias respecto a C: $a = p < 0,05$ (test de Dunnett); diferencias PC vs PC+Se: $b = p < 0,05$ (t -Student); diferencias PC vs Abx-PC: $c = p < 0,05$ (t -Student). C: control; PC: mezcla de contaminantes; PC+Se: mezcla de contaminantes y dieta enriquecida en Se; Abx-PC: pretratamiento con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes para deprimir la MI.

La presencia de Se en la dieta de los ratones durante la exposición a MC alteró la expresión de los genes que codifican la tres enzimas analizadas (Fig. 14), haciendo que *Pfk1* recuperara valores próximos a los del control, pero potenciando el efecto de MC sobre *Gapdh* y *Pk*. Un efecto similar se descrito en macrógagos murinos [150] lo que contribuiría a reducir la respiración oxidativa y la generación de especies reactivas de oxígeno al potenciar la ruta PPP y la glucólisis aerobia generadora de lactato (Fig. 7).

La alteración de la MI por el tratamiento con Abx previo a la exposición a MC solo afectó a la expresión de *Gapdh* (Fig. 14). Como se comentó en el apartado 3.4.3, la exposición a MC causó un importante cambio en la composición de la MI de los ratones, lo que posiblemente afectó a su capacidad de producir SCFA. Algunos SCFA producidos por la MI son consumidos directamente por los colonocitos, pero una buena parte de ellos llegan al hígado y participan activamente en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, probablemente a través de las rutas AMPK y mTOR, aunque se desconoce la manera exacta en que lo hacen [126, 128].

4.4.3. La exposición a MC afecta al metabolismo del colesterol y de los ácidos biliares

Los animales expuestos a MC mostraron niveles hepáticos de ácidos biliares (AB) muy elevados en comparación con los ratones control (Fig. 6), lo que atribuimos al efecto de los metales As, Cd o Hg [85] o fármacos, DCF [86] o FLU [87], sobre FXR, el receptor nuclear que actúa como sensor de los AB y reprime su síntesis [88]. La síntesis de AB se lleva a cabo en el hígado a partir de colesterol principalmente mediante dos vías. La vía clásica depende de la actividad de CYP7A1 (colesterol 7 α -hidroxilasa) y CYP8B1 (esterol 12 α -hidroxilasa), cuya transcripción se inhibe por SHP (*small heterodimer partner*) bajo el control de FXR. La vía alternativa, mitocondrial, está mediada por CYP27A1 (*sterol 27-hydroxylase*) y depende de la entrada de colesterol a través de la membrana interna de la mitocondria mediada por *StAR* (*steroidogenic acute regulator*) [151]. El 95% de los AB que se excretan por la bilis son reabsorbidos por

el hígado mediante transportadores como OATP (*organic anion transporter*), mientras que BSEP (*bile salts export pump*) se encarga de su secreción [151]. La Fig. 15 muestra los niveles de expresión de varios genes implicados en el metabolismo de AB en los ratones control y sus cambios a consecuencia de los tratamientos.

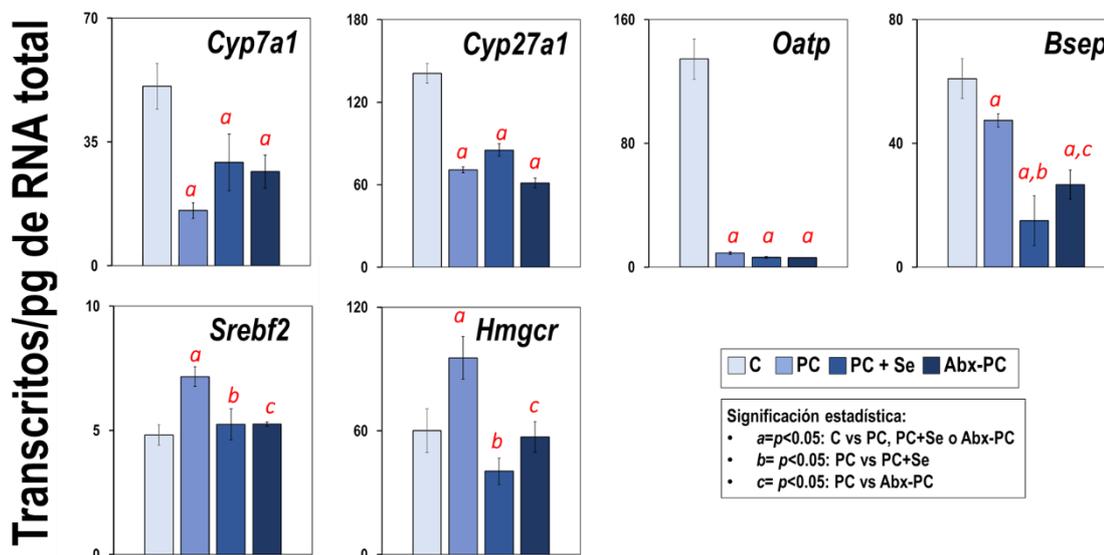


Figura 15. Niveles de transcritos en hígado de ratones expuestos a MC bajo distintas condiciones experimentales. Se representa la media \pm SEM del número de transcritos/pg de RNA total de los 4 subgrupos en que se dividieron los 12 animales dentro de cada grupo experimental. Significación estadística: diferencias respecto a C: $a = p < 0,05$ (test de Dunnett); diferencias PC vs PC+Se: $b = p < 0,05$ (t -Student); diferencias PC vs Abx-PC: $c = p < 0,05$ (t -Student). C: control; PC: mezcla de contaminantes; PC+Se: mezcla de contaminantes y dieta enriquecida en Se; Abx-PC: pretratamiento con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes para deprimir la MI.

Es evidente que la exposición a MC reduce la síntesis de AB en hepatocitos, ya que disminuyen considerablemente los niveles de transcrito de los genes *Cyp7a1* y *Cyp27a1*. La disminución de la síntesis de AB no parece estar ligada a una disminución en la síntesis de su precursor, el colesterol, ya que se apreció inducción de la expresión de HMGR (HMG-CoA reductasa), la enzima clave de su síntesis, así como de su regulador *Srebf2*. Se observó también una acusada disminución en los niveles de expresión de los genes que codifican para los transportadores OATP y BSEP. OATP se encarga de la reentrada de AB al hepatocito desde la circulación portal, mientras que BSEP controla la salida de sales biliares desde los hepatocitos a la luz del canalículo biliar. Por tanto, la responsable de los altos niveles de AB en el plasma de estos ratones mostrado en la Fig. 6 sería la disminución de la expresión de ambos transportadores, y no un incremento en la síntesis de AB. Esto podría originar una situación de colestasis, con acumulación de AB primarios (sintetizados en hígado) pero no AB secundarios (sintetizados por la MI) [88], dando lugar a la regulación diferencial de los distintos factores que interviene en la síntesis de estos

metabolitos. La presencia de Se en la dieta redujo algo la síntesis de colesterol, pero potencio el efecto de MC sobre el transporte de AB.

La regulación de la síntesis y circulación de AB es compleja y no se conoce completamente, aunque cada vez hay más pruebas de su interconexión con la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos [128, 152]. Como se comentó anteriormente, es muy posible que el exceso de metabolitos tóxicos causado por exposición a MC, tanto en el hígado como en el intestino, esté ocasionando la inactivación de algunas proteínas, de modo que, aunque presentes, no sean funcionales. Estos metabolitos también pueden modificarlas impidiendo su degradación, lo que prolongaría su vida media y su actividad incluso aunque se detuviera su síntesis. El acetato y el propionato generado por la MI participa en estos procesos de varias maneras. Una de ellas es mediante la acetilación de enzimas metabólicas promoviendo cambios en la vida media de las mismas, así como la acetilación de las histonas que determina la accesibilidad del DNA a la maquinaria transcripcional y de la expresión génica. Los cambios ocasionados en la MI por la exposición a MC y la modulación de dichos cambios por la presencia de Se en la dieta, podría explicar muchos de los aspectos que se discuten en este trabajo y que se estudiarán en el futuro.

5. Conclusiones

El trabajo presentado aquí nos permite a concluir que

- La exposición a la mezcla de metales pesados (As, Cd y Hg) y fármacos (diclofenaco y flumequina), MC, causa un impacto negativo sobre la salud de los ratones, que se traduce en daños hepáticos y renales, evidenciados por la subida de los niveles plasmáticos de transaminasas, urea y creatinina. Estos daños parecen estar causados por la generación de una situación de estrés oxidativo que sobrepasa los sistemas de defensa antioxidante de la célula.
- Los daños oxidativos en las membranas causan disfunción mitocondrial y un cambio metabólico basado en el efecto Warburg (glucólisis aerobia), lo que se traduce en elevados niveles de lactato en plasma. La represión de enzimas claves de la oxidación de la glucosa a través del ciclo de Krebs impulsa el desvío de esta hexosa hacia la ruta de las pentosas fosfato, a fin de fabricar NADPH destinado a contrarrestar la acción oxidante de los componentes de la MC.
- La exposición a MC también causa la desregulación de la síntesis y transporte de AB, contribuyendo a la acumulación de éstos en el plasma. En consecuencia, también se desregula la señalización mediada por AB, lo que se traduce en alteraciones del metabolismo de glúcidos y de lípidos
- La exposición a MC causa un gran impacto sobre la MI, cuya composición cambia drásticamente y se ve enriquecida en bacterias productoras de acetato y butirato, que reabsorbidos por el hígado, pueden ser responsables de los cambios observados en el metabolismo de los ratones expuestos a MC, bien directamente, ya que son precursores de acetil Co-A y succinato, o indirectamente, a través de la acetilación de enzimas metabólicas alterando la velocidad de recambio de las mismas, o de la acetilación de las histonas, lo que modifica la expresión de los genes.
- La presencia de un suplemento de selenio en la dieta de los ratones durante la exposición a MC aumenta la supervivencia de los ratones, paliando, al menos en parte, el efecto tóxico de los componentes de la mezcla.
- La MI desempeña un papel activo en la toxicidad de MC, ya que su modificación altera parcialmente los patrones de respuesta del ratón tanto a nivel sérico como hepático.

6. Bibliografía

- González N, Marquès M, Nadal M, Domingo JL. Occurrence of environmental pollutants in foodstuffs: A review of organic vs. conventional food. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;125:370-5.
- Tanguler H, Kabak B. Chemical Hazards in Foods. In: Malik A, Erginkaya Z, Erten H, editors. *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies*; Springer; 2019. p. 349-402.
- Sarigiannis DA, Hansen U. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals - a challenge for policy makers. *Environmental health : a global access science source*. 2012;11 Suppl 1(Suppl 1):S18.
- Thompson LA, Darwish WS. Environmental Chemical Contaminants in Food: Review of a Global Problem. *Journal of Toxicology*. 2019;2019:2345283.
- Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev*. 2014;66(4):948-83.
- 66/4/948 [pii]. PubMed PMID: 25073467; PubMed Central PMCID: PMC4180336.
- Calvani R, Picca A, Lo Monaco MR, Landi F, Bernabei R, Marzetti E. Of Microbes and Minds: A Narrative Review on the Second Brain Aging. *Frontiers in medicine*. 2018;5:53.
- Pasinetti GM, Singh R, Westfall S, Herman F, Faith J, Ho L. The Role of the Gut Microbiota in the Metabolism of Polyphenols as Characterized by Gnotobiotic Mice. *J Alzheimers Dis*. 2018;63(2):409-21.
- Flemer B, Gaci N, Borrel G, Sanderson IR, Chaudhary PP, Tottley W, et al. Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. *Gut microbes*. 2017;8(5):428-39.
- Jin Y, Wu S, Zeng Z, Fu Z. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2017;222:1-9.
- Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):157-84. doi: 10.1002/jcb.26234.
- Cameiro MFH, Barcelos GRM, Barbosa F, Jr., Adeyemi J, Gobe G. Metal and Metalloid-Induced Oxidative Damage: Biological Importance of Potential Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3586071.
- Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HV, Graziano JH, Thompson C, et al. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect*. 2013;121(3):295-302.
- Hu Y, Xiao T, Zhang A. Associations between and risks of trace elements related to skin and liver damage induced by arsenic from coal burning. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;208:111719.
- Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res*. 2014;24(4):378-99.
- Matovic V, Buha A, Bulat Z, Dukic-Cosic D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2011;62(1):65-76.
- Mezynska M, Brzoska MM. Review of polyphenol-rich products as potential protective and therapeutic factors against cadmium hepatotoxicity. *J Appl Toxicol*. 2019;39(1):117-45.
- Yang L, Zhang Y, Wang F, Luo Z, Guo S, Strahle U. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*. 2020;245:125586.
- Hazelhoff MH, Torres AM. Gender differences in mercury-induced hepatotoxicity: Potential mechanisms. *Chemosphere*. 2018;202:330-8.
- Jagadeesan G, Pillai SS. Hepatoprotective effects of taurine against mercury induced toxicity in rats. *J Environ Biol*. 2007;28(4):753-6.
- Claus SP, Guillou H, Ellero-Simatos S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2:16003.
- Duan H, Yu L, Tian F, Zhai Q, Fan L, Chen W. Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. *Science of The Total Environment*. 2020;742:140429.
- Ba Q, Li M, Chen P, Huang C, Duan X, Lu L, et al. Sex-Dependent Effects of Cadmium Exposure in Early Life on Gut Microbiota and Fat Accumulation in Mice. *Environ Health Perspect*. 2017;125(3):437-46.
- Tran NH, Reinhard M, Gin KYH. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Res*. 2018;133:182-207.
- Wilkinson JL, Hooda PS, Barker J, Barton S, Swinden J. Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. *Crit Rev Env Sci Tec*. 2016;46(4):336-81.
- De Liguoro M, Maraj S, Merlanti R. Transgenerational toxicity of flumequine over four generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;169:814-21.
- Ungemach FR, Mueller-Bahr D, Abraham G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*. 2006;296:33-8.
- Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current medical research and opinion*. 2010;26(7):1715-31.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*. 2004;427(6975):630-3.
- He BS, Wang J, Liu J, Hu XM. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere*. 2017;181:178-89.
- Miller S, Walker SW, Arthur JR, Nicol F, Pickard K, Lewin MH, et al. Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100(5):543-50.
- Messaoudi I, El Heni J, Hammouda F, Saïd K, Kerkeni A. Protective Effects of Selenium, Zinc, or Their Combination on Cadmium-Induced Oxidative Stress in Rat Kidney. *Biological trace element research*. 2009;130(2):152-61.
- Rodríguez-Moro G, Roldan FN, Baya-Arenas R, Arias-Borrego A, Callejón-Leblic B, Gomez-Ariza JL, et al. Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(2):1762-75.
- D'Amato A, Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Man AL, Le Gall G, Branca JJV, et al. Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome*. 2020;8(1):140.
- Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grøc V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One*. 2011;6(3):e17996.
- Tirelle P, Breton J, Riou G, Déchelotte P, Coëffier M, Ribet D. Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. *BMC Microbiology*. 2020;20(1):340.
- Estepa J, Luque-Almagro V, Cobos I, Escibano M, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, et al. The nit1C gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environmental microbiology reports*. 2012;4:326-34.
- Callejón-Leblic B, Selma-Royo M, Collado MC, Abril N, García-Barrera T. Impact of Antibiotic-Induced Depletion of Gut Microbiota and Selenium Supplementation on Plasma Selenoproteome and Metal Homeostasis in a Mice Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021.
- Yang Y-W, Chen M-K, Yang B-Y, Huang X-J, Zhang X-R, He L-Q, et al. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(19):6749-56.
- Callejón-Leblic B, Selma-Royo M, Collado MC, Abril N, García-Barrera T. Impact of antibiotic-induced depletion of gut microbiota and selenium supplementation on plasma selenoproteome and metal homeostasis in mice model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021.
- Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in applied microbiology*. 2008;47(5):367-73.

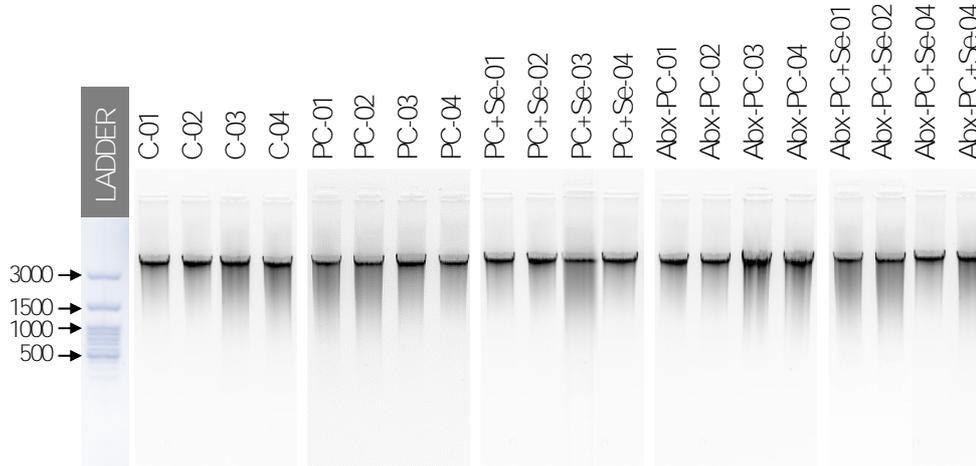
41. Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of microbiological methods*. 2011;86(3):351-6.
42. García-Sevillano MA, Abril N, Fernández-Cisnal R, García-Barrera T, Pueyo C, López-Barea J, et al. Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*. 2015;11(5):1432-50.
43. Jurado J, Fuentes-Almagro CA, Prieto-Alamo MJ, Pueyo C. Alternative splicing of *c-fos* pre-mRNA: contribution of the rates of synthesis and degradation to the copy number of each transcript isoform and detection of a truncated *c-Fos* immunoreactive species. *BMC Mol Biol*. 2007;8:83.
44. Prieto-Alamo MJ, Cabrera-Luque JM, Pueyo C. Absolute quantitation of normal and ROS-induced patterns of gene expression: an in vivo real-time PCR study in mice. *Gene Expr*. 2003;11(1):23-34.
45. Abril N, Ruiz-Laguna J, García-Sevillano M, Mata AM, Gómez-Ariza JL, Pueyo C. Heterologous microarray analysis of transcriptome alterations in *Mus spretus* mice living in an industrial settlement. *Environ Sci Technol*. 2014;48(4):2183-92.
46. Montes-Nieto R, Fuentes-Almagro CA, Bonilla-Valverde D, Prieto-Alamo MJ, Jurado J, Carrascal M, et al. Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics*. 2007;7(23):4376-87.
47. Ruiz-Laguna J, Vélez JM, Pueyo C, Abril N. Global gene expression profiling using heterologous DNA microarrays to analyze alterations in the transcriptome of *Mus spretus* mice living in a heavily polluted environment. *Environmental science and pollution research international*. 2016;23(6):5853-67.
48. Lin CY, Zhao L, Huang T, Lu L, Khan M, Liu J, et al. Spexin Acts as Novel Regulator for Bile Acid Synthesis. *Frontiers in physiology*. 2018;9:378.
49. Merrell MD, Nyagode BA, Clarke JD, Cherrington NJ, Morgan ET. Selective and cytokine-dependent regulation of hepatic transporters and bile acid homeostasis during infectious colitis in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2014;42(4):596-602.
50. Hashimoto M, Kobayashi K, Watanabe M, Kazuki Y, Takehara S, Inaba A, et al. Knockout of mouse *Cyp3a* gene enhances synthesis of cholesterol and bile acid in the liver. *J Lipid Res*. 2013;54(8):2060-8.
51. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
52. Flohé L, Günzler WA. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-20.
53. Löhr GW, Waller HD. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Methods Enzymol Anal*. 1974;2:636-43.
54. Baer KN, Benson WH. Influence of chemical and environmental stressors on acute cadmium toxicity. *Journal of toxicology and environmental health*. 1987;22(1):35-44.
55. López-Pacheco IY, Silva-Núñez A, Salinas-Salazar C, Arévalo-Gallegos A, Lizarazo-Holguin LA, Barceló D, et al. Anthropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects. *The Science of the total environment*. 2019;690:1068-88.
56. Kashida Y, Takahashi A, Moto M, Okamura M, Muguruma M, Jin M, et al. Gene expression analysis in mice liver on hepatocarcinogenesis by flumequine. *Archives of Toxicology*. 2006;80(8):533-9.
57. Trombini C, Kazakova J, Montilla-López A, Fernández-Cisnal R, Hampel M, Fernández-Torres R, et al. Assessment of pharmaceutical mixture (ibuprofen, ciprofloxacin and flumequine) effects to the crayfish *Procambarus clarkii*: A multilevel analysis (biochemical, transcriptional and proteomic approaches). *Environmental Research*. 2021;200:111396.
58. García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL. Cadmium toxicity in *Mus musculus* mice based on a metallomic study. Antagonistic interaction between Se and Cd in the bloodstream. *Metallomics*. 2014;6(3):672-81.
59. García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gomez-Ariza JL. Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. *Metallomics*. 2013;5(12):1644-55.
60. García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Navarro-Roldán F, Montero-Lobato Z, Gómez-Ariza JL. A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics*. 2014;104:66-79.
61. Choi BS, Kang DW, Lee JY, Park ES, Hong YP, Yang JS, et al. Acute Toxicity of Arsenic in Rats and Mice. *Korean J Occup Environ Med*. 2003;15(4):323-34.
62. Oller J, Oller S. *Toxins and the Research*. 2010. p. 133-67.
63. Kang J, Hossain MA, Choi B, Cho JH, Kang SJ, Ku HO, et al. Toxicological Evaluation of Flumequine in Pubertal Male Rats After Oral Administration for Six Weeks. *Journal of veterinary research*. 2018;62(1):87-96.
64. Ritter L, Boobis AR, Greenlees K, Mitsumori K. Flumequine (WHO Food Additives Series 51). JECFA 2001 Contract No.: 1074.
65. Gomaa S. Adverse effects induced by diclofenac, ibuprofen, and paracetamol toxicity on immunological and biochemical parameters in Swiss albino mice. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 2018;79(1):5.
66. Kieliszek M, Błażej S. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. *Molecules*. 2016;21(5):609.
67. EFSA. Safety and efficacy of selenium compounds (E8) as feed additives for all animal species: sodium selenite, based on a dossier submitted by Todini and Co SpA. EFSA J 14:4442. 2016.
68. Morris JS, Crane SB. Selenium toxicity from a misformulated dietary supplement, adverse health effects, and the temporal response in the nail biologic monitor. *Nutrients*. 2013;5(4):1024-57.
69. Kennedy EA, King KY, Baldrige MT. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1534.
70. Assefa S, Köhler G. Intestinal microbiome and metal toxicity. *Current Opinion in Toxicology*. 2020;19:21-7.
71. Otani K, Tanigawa T, Watanabe T, Shimada S, Nadatani Y, Nagami Y, et al. Microbiota Plays a Key Role in Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage. *Digestion*. 2017;95(1):22-8.
72. Roggenbeck BA, Leslie EM, Walk ST, Schmidt EE. Redox metabolism of ingested arsenic: Integrated activities of microbiome and host on toxicological outcomes. *Current Opinion in Toxicology*. 2019;13:90-8.
73. Rodríguez-Moro G, Roldán FN, Baya-Arenas R, Arias-Borrego A, Callejón-Leblic B, Gómez-Ariza JL, et al. Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(2):1762-75.
74. Bao R-k, Zheng S-f, Wang X-y. Selenium protects against cadmium-induced kidney apoptosis in chickens by activating the PI3K/AKT/Bcl-2 signaling pathway. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24(25):20342-53.
75. Fan R-F, Liu J-X, Yan Y-X, Wang L, Wang Z-Y. Selenium relieves oxidative stress, inflammation, and apoptosis within spleen of chicken exposed to mercuric chloride. *Poult Sci*. 2020;99(11):5430-9.
76. Xu Z, Wang Z, Li J-j, Chen C, Zhang P-c, Dong L, et al. Protective effects of selenium on oxidative damage and oxidative stress related gene expression in rat liver under chronic poisoning of arsenic. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;58:1-7.
77. Kuras R, Janasik B, Stanislawski M, Wasowicz W. Revision of the reciprocal action of mercury and selenium. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2018;31.
78. Owumi S, Dim U. Biochemical alterations in diclofenac-treated rats: Effect of selenium on oxidative stress, inflammation, and hematological changes. *Toxicology Research and Application*. 2019;3:239784731987435.
79. Levitt DG, Levitt MD. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med*. 2016;9:229-55.
80. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J*. 2016;15:817-28.
81. Koontz JM, Dancy BCR, Horton CL, Stallings JD, DiVito VT, Lewis JA. The Role of the Human Microbiome in Chemical Toxicity. *International Journal of Toxicology*. 2019;38(4):251-64.
82. Ozardali I, Bitiren M, Karakilçik AZ, Zerir M, Aksoy N, Musa D. Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental

- liver injury of rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2004;56(1-2):59-64.
83. Alnuaimi M, Saeed I, Ashraf S. Effect of Various Heavy Metals on the Enzymatic Activity of *E. coli* Alkaline Phosphatase. 2012.
 84. Poupon R. Liver alkaline phosphatase: A missing link between cholelithiasis and biliary inflammation. *Hepatology*. 2015;61(6):2080-90.
 85. Hussein AB, Abbas A, Hussein N, Noreldaim E. Investigation of physiological responses of *Procambarus clarkii* and some enzyme activities to selected heavy metals. *Open Journal of Environmental Biology*. 2019;4(1):023-7.
 86. Lu W, Cheng F, Jiang J, Zhang C, Deng X, Xu Z, et al. FXR antagonism of NSAIDs contributes to drug-induced liver injury identified by systems pharmacology approach. *Scientific reports*. 2015;5:8114
 87. Kang J, Hossain MA, Choi B, Cho J-H, Kang S-J, Ku H-O, et al. Toxicological Evaluation of Flumequine in Pubertal Male Rats After Oral Administration for Six Weeks. *Journal of veterinary research*. 2018;62(1):87-96.
 88. Han CY. Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target? *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2069.
 89. Jia Y, Son K, Burris WR, Bridges PJ, Matthews JC. Forms of selenium in vitamin-mineral mixes differentially affect serum alkaline phosphatase activity, and serum albumin and blood urea nitrogen concentrations, of steers grazing endophyte-infected tall fescue. *Journal of animal science*. 2019;97(6):2569-82..
 90. Hu X, Chandler JD, Orr ML, Hao L, Liu K, Uppal K, et al. Selenium Supplementation Alters Hepatic Energy and Fatty Acid Metabolism in Mice. *The Journal of nutrition*. 2018;148(5):675-84.
 91. Morales-Prieto N, Ruiz-Laguna J, Abril N. Dietary Se supplementation partially restores the REDOX proteomic map of *M. spretus* liver exposed to p,p'-DDE. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2018;114:292-301.
 92. Wang H, He QX, Wang GJ, Xu XW, Hao HP. FXR modulators for enterohepatic and metabolic diseases. *Expert Opin Ther Pat*. 2018;28(11):765-82.
 93. Curcelli EC, Muller SS, Novelli Filho JLVB. Beneficial effects of diclofenac therapy on serum lipids, oxidized low-density lipoprotein and antioxidant defenses in rats. *Life Sciences*. 2008;82(15):892-8.
 94. Yu YJ, Raka F, Adeli K. The Role of the Gut Microbiota in Lipid and Lipoprotein Metabolism. *J Clin Med*. 2019;8(12).
 95. Fu Y, Liu S, Yin S, Niu W, Xiong W, Tan M, et al. The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget*. 2017;8(34).
 96. Gwangwa MV, Joubert AM, Visagie MH. Crosstalk between the Warburg effect, redox regulation and autophagy induction in tumourigenesis. *Cellular & molecular biology letters*. 2018;23:20.
 97. Hu Y, Li J, Lou B, Wu R, Wang G, Lu C, et al. The Role of Reactive Oxygen Species in Arsenic Toxicity. *Biomolecules*. 2020;10(2):240.
 98. Tang C, Li S, Zhang K, Li J, Han Y, Zhan T, et al. Selenium deficiency-induced redox imbalance leads to metabolic reprogramming and inflammation in the liver. *Redox Biology*. 2020;36:101519.
 99. Rodríguez-López E, Tamayo-Ortiz M, Ariza AC, Ortiz-Panozo E, Deierlein AL, Pantic I, et al. Early-Life Dietary Cadmium Exposure and Kidney Function in 9-Year-Old Children from the PROGRESS Cohort. *Toxics*. 2020;8(4).
 100. Hazelhoff MH, Bulacio RP, Torres AM. Trimetazidine Protects from Mercury-Induced Kidney Injury. *Pharmacology*. 2021;106(5-6):332-40.
 101. Chang YW, Singh KP. Arsenic induces fibrogenic changes in human kidney epithelial cells potentially through epigenetic alterations in DNA methylation. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(4):4713-25.
 102. Dhanvijay P, Misra AK, Varma SK. Diclofenac induced acute renal failure in a decompensated elderly patient. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2013;4(2):155-7.
 103. Li S, Zhao Q, Zhang K, Sun W, Jia X, Yang Y, et al. Se deficiency induces renal pathological changes by regulating selenoprotein expression, disrupting redox balance, and activating inflammation. *Metallomics*. 2020;12(10):1576-84.
 104. Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front Microbiol*. 2017;8:2224.
 105. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nature reviews Microbiology*. 2018;16(7):410-22.
 106. Morton JT, Marotz C, Washburne A, Silverman J, Zaramela LS, Edlund A, et al. Establishing microbial composition measurement standards with reference frames. *Nat Commun*. 2019;10(1):2719.
 107. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*. 2017;551(7681):507-11.
 108. Sun Z, Huang S, Zhang M, Zhu Q, Haiminen N, Carrieri AP, et al. Challenges in benchmarking metagenomic profilers. *Nat Methods*. 2021;18(6):618-26.
 109. Tang L. More than microbial relative abundances. *Nat Methods*. 2019;16(8):678.
 110. Contijoch EJ, Britton GJ, Yang C, Mogno I, Li Z, Ng R, et al. Gut microbiota density influences host physiology and is shaped by host and microbial factors. *eLife*. 2019;8.
 111. Props R, Kerckhof FM, Rubbens P, De Vrieze J, Hernandez Sanabria E, Waegeman W, et al. Absolute quantification of microbial taxon abundances. *The ISME journal*. 2017;11(2):584-7.
 112. Tkacz A, Hortalá M, Poole PS. Absolute quantitation of microbiota abundance in environmental samples. *Microbiome*. 2018;6(1):110.
 113. Jian C, Luukkonen P, Yki-Järvinen H, Salonen A, Korpela K. Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLoS one*. 2020;15(1):e0227285-e.
 114. Fiedorová K, Radvanský M, Němcová E, Grombířková H, Bosák J, Černochová M, et al. The Impact of DNA Extraction Methods on Stool Bacterial and Fungal Microbiota Community Recovery. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(821).
 115. Singh K, Gobert AP, Coburn LA, Barry DP, Allaman M, Asim M, et al. Dietary Arginine Regulates Severity of Experimental Colitis and Affects the Colonic Microbiome. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:66.
 116. Machate DJ, Figueiredo PS, Marcelino G, Guimarães RdCA, Hiane PA, Bogo D, et al. Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4093.
 117. Nearing JT, Comeau AM, Langille MGI. Identifying biases and their potential solutions in human microbiome studies. *Microbiome*. 2021;9(1):113.
 118. Feng P, Ye Z, Kakade A, Virk AK, Li X, Liu P. A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants: Possible Roles of Probiotics and Gut Microbiota. *Nutrients*. 2018;11(1):22.
 119. Maseda D, Ricciotti E. NSAID-Gut Microbiota Interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11(1153).
 120. Duan H, Yu L, Tian F, Zhai Q, Fan L, Chen W. Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. *The Science of the total environment*. 2020;742:140429.
 121. Sun W, Zhu J, Li S, Tang C, Zhao Q, Zhang J. Selenium supplementation protects against oxidative stress-induced cardiomyocyte cell cycle arrest through activation of PI3K/AKT. *Metallomics*. 2020;12(12):1965-78.
 122. Pereira AM, Pinna C, Biagi G, Stefanelli C, Maia MRG, Matos E, et al. Supplemental selenium source on gut health: insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. *FEMS Microbiol Ecol*. 2020;96(11):faa212.
 123. Kasaikina MV, Kravtsova MA, Lee BC, Seravalli J, Peterson DA, Walter J, et al. Dietary selenium affects host selenoproteome expression by influencing the gut microbiota. *FASEB J*. 2011;25(7):2492-9.
 124. Hrdina J, Banning A, Kipp A, Loh G, Blaut M, Brigelius-Flohé R. The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2009;20(8):638-48.
 125. Gibiino G, Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Rizzatti G, Binda C, Gasbarrini A. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Digestive and Liver Disease*. 2018;50(7):635-9.

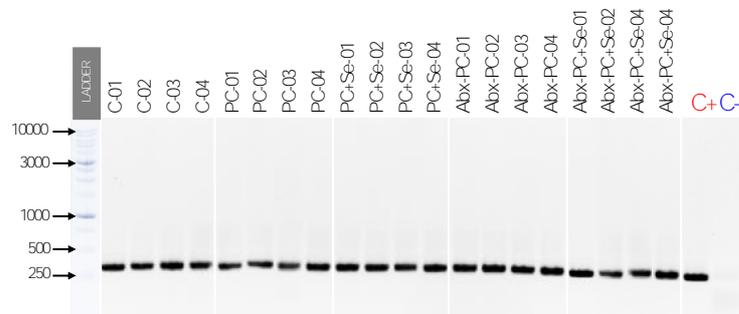
126. Besten G, van Eunen K, Groen A, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker B. The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism. *J Lipid Res.* 2013;54.
127. Yu H, Qin L, Hu H, Wang Z. Alteration of the Gut Microbiota and Its Effect on AMPK/NADPH Oxidase Signaling Pathway in 2K1C Rats. *BioMed Research International.* 2019;2019:8250619.
128. He J, Zhang P, Shen L, Niu L, Tan Y, Chen L, et al. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
129. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease.* 2018;50(5):421-8.
130. Wankhade UD, Zhong Y, Lazarenko OP, Chintapalli SV, Piccolo BD, Chen JR, et al. Sex-Specific Changes in Gut Microbiome Composition following Blueberry Consumption in C57BL/6J Mice. *Nutrients.* 2019;11(2).
131. Agranyoni O, Meningen-Mordechay S, Uzan A, Ziv O, Salmon-Divon M, Rodin D, et al. Gut microbiota determines the social behavior of mice and induces metabolic and inflammatory changes in their adipose tissue. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021;7(1):28.
132. Wankhade UD, Zhong Y, Lazarenko OP, Chintapalli SV, Piccolo BD, Chen JR, et al. Sex-Specific Changes in Gut Microbiome Composition following Blueberry Consumption in C57BL/6J Mice. *Nutrients.* 2019;11(2):313.
133. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Research International.* 2017;2017:9351507.
134. Stolz J, Basu P, Oremland R. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. *International Microbiology.* 2002;5(4):201-7.
135. Renu K, Chakraborty R, Myakala H, Koti R, Famurewa AC, Madhyastha H, et al. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review. *Chemosphere.* 2021;271:129735.
136. Owumi SE, Dim UJ. Biochemical alterations in diclofenac-treated rats: Effect of selenium on oxidative stress, inflammation, and hematological changes. *Toxicology Research and Application.* 2019;3:2397847319874359
137. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13):4777.
138. Chen L, Ma L, Bai Q, Zhu X, Zhang J, Wei Q, et al. Heavy metal-induced metallothionein expression is regulated by specific protein phosphatase 2A complexes. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(32):22413-26.
139. Trombini C, Hampel M, Blasco J. Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: An integrative and multi-biomarker approach. *Aquatic Toxicology.* 2019;208:146-56.
140. Facchinetti MM. Heme-Oxygenase-1. Antioxidants & redox signaling. 2020;32(17):1239-42.
141. Cantoni L, Valaperta R, Ponsoda X, Castell JV, Barelli D, Rizzardini M, et al. Induction of hepatic heme oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity. *Journal of Hepatology.* 2003;38(6):776-83.
142. So K-Y, Oh S-H. Heme oxygenase-1-mediated apoptosis under cadmium-induced oxidative stress is regulated by autophagy, which is sensitized by tumor suppressor p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2016;479(1):80-5.
143. Balali-Mood M, Naseri K, Tahergerabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology.* 2021;12(227).
144. Nouri A, Heidarian E, Nikoukar M. Effects of N-acetyl cysteine on oxidative stress and TNF-alpha gene expression in diclofenac-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol Mech Methods.* 2017;27(8):561-7.
145. Abiola T, Adebayo O, Babalola O. Diclofenac-Induced Kidney Damage in Wistar Rats: Involvement of Antioxidant Mechanism. *Journal of Biosciences and Medicines.* 2019;7:44-57.
146. Kim J, Keum Y-S. NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2746457.
147. Patel MS, Mahmood S, Jung J, Rideout TC. Reprogramming of aerobic glycolysis in non-transformed mouse liver with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Physiological Reports.* 2021;9(1):e14684.
148. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews.* 2015;90(3):927-63.
149. Okazaki K, Papagiannakopoulos T, Motohashi H. Metabolic features of cancer cells in NRF2 addiction status. *Biophysical Reviews.* 2020;12.
150. Korwar AM, Hossain A, Lee T-J, Shay AE, Basrur V, Conlon K, et al. Selenium-dependent metabolic reprogramming during inflammation and resolution. *Journal of Biological Chemistry.* 2021;296.
151. Šarenac TM, Mikov M. Bile Acid Synthesis: From Nature to the Chemical Modification and Synthesis and Their Applications as Drugs and Nutrients. *Frontiers in Pharmacology.* 2018;9(939).
152. Lefort C, Cani PD. The Liver under the Spotlight: Bile Acids and Oxysterols as Pivotal Actors Controlling Metabolism. *Cells.* 2021;10(2).

7. Material suplementario

Mat. Supl. 1. Perfiles electroforéticos de los DNA de MI de ratón obtenidos. Se utilizaron geles de agarosa al 1.5% en TAE, teñidos con DSView™ Nucleic Acid Stain (5 µL/100 mL). Las muestras se ajustaron para cargar iguales cantidades (1µg de DNA por pocillo).



Mat. Supl. 2. Electroforesis para visualizar los amplicones obtenidos mediante PCR de los DNA de MI. Las PCR se realizaron a partir de 50 ng de DNA inicial y se cargaron 30 µL de mezcla de reacción por pocillo. Se utilizaron geles de agarosa al 1% en TAE, teñidos con DSView™ Nucleic Acid Stain (5 µL/100 mL). Se puso un control negativo sin DNA molde y se utilizó como control positivo 50 ng/pocillo de DNA extraído de un cultivo bacteriano puro.



Mat. Supl. 3. Valores medios de copias de rRNA 16S de cada uno de los filos por gramo de MI obtenidos mediante cuantificación absoluta por qPCR para cada grupo experimental.
 Se representa la media \pm SEM de las 3 réplicas técnicas obtenidas para cada uno de los 4 subgrupos en que se dividieron los 12 animales dentro de cada grupo experimental. C: control; PC: mezcla de contaminantes; PC+Se: mezcla de contaminantes y dieta enriquecida en Se; Abx-PC: pretratamiento con Abx antes de la exposición a la mezcla de contaminantes para deprimir la MI.0

Filo	Universal	Bacteroidetes	Firmicutes	Actinobacteria	Candidatus Saccharibacteria	Deferribacteres	Verrucomicrobia	Tenericutes	Beta- proteobacteria	Epsilon- proteobacteria	Gamma- proteobacteria
C-01	3.0E+12	2.6E+11	1.2E+12	1.6E+11	1.2E+09	8.5E+10	2.2E+07	1.0E+10	2.7E+07	3.2E+06	5.4E+10
C-02	3.1E+12	3.3E+11	2.0E+12	3.7E+11	4.7E+08	1.2E+11	5.3E+07	2.4E+09	5.8E+07	3.0E+07	1.1E+11
C-03	2.8E+12	4.2E+11	1.6E+12	2.3E+11	1.1E+09	7.0E+10	1.4E+07	8.0E+09	1.5E+08	2.3E+06	5.2E+10
C-04	2.8E+12	3.5E+11	1.4E+12	4.0E+10	2.1E+09	2.2E+11	2.3E+07	5.4E+08	6.6E+07	0.0E+00	0.0E+00
media	2.9E+12	3.4E+11	1.5E+12	2.0E+11	1.2E+09	1.2E+11	2.8E+07	5.2E+09	7.5E+07	9.0E+06	5.4E+10
SEM	6.6E+10	3.4E+10	1.6E+11	6.9E+10	3.3E+08	3.3E+10	8.5E+06	2.3E+09	2.6E+07	7.2E+06	2.3E+10
PC-01	3.3E+12	7.6E+10	2.9E+12	8.1E+10	4.5E+08	5.2E+09	2.9E+07	5.5E+10	1.1E+07	1.8E+06	3.6E+10
PC-02	1.6E+12	2.5E+11	8.5E+11	9.4E+10	8.0E+08	5.3E+10	2.1E+07	9.0E+10	1.0E+07	2.3E+06	3.3E+10
PC-03	2.0E+12	1.4E+12	1.5E+12	3.0E+10	2.0E+08	1.7E+09	4.1E+07	1.9E+09	9.5E+06	1.9E+06	2.5E+09
PC-04	3.2E+12	3.3E+11	4.4E+11	4.9E+10	6.1E+08	3.2E+10	8.2E+06	6.1E+10	1.2E+07	4.5E+06	5.2E+10
media	2.5E+12	5.0E+11	1.4E+12	6.3E+10	5.2E+08	2.3E+10	2.5E+07	5.2E+10	1.1E+07	2.6E+06	3.1E+10
SEM	4.3E+11	2.9E+11	5.3E+11	1.5E+10	1.3E+08	1.2E+10	7.0E+06	1.8E+10	6.0E+05	6.4E+05	1.0E+10
PC+Se-01	1.3E+12	2.0E+11	7.1E+11	3.5E+10	3.4E+08	7.6E+10	3.2E+07	3.5E+10	3.0E+07	4.1E+06	4.0E+10
PC+Se-02	1.9E+12	2.2E+10	1.4E+11	2.6E+09	2.6E+08	1.7E+10	3.4E+06	2.5E+09	1.3E+07	2.6E+06	8.3E+09
PC+Se-03	1.7E+12	9.4E+10	1.1E+12	3.5E+10	2.4E+08	6.8E+10	2.8E+07	2.9E+10	1.2E+07	2.3E+07	4.3E+10
PC+Se-04	1.9E+12	2.4E+11	7.1E+11	1.0E+11	3.7E+08	2.4E+10	4.3E+05	1.6E+10	1.1E+07	1.9E+06	4.1E+10
media	1.7E+12	1.4E+11	6.5E+11	4.4E+10	3.0E+08	4.6E+10	1.6E+07	2.1E+10	1.6E+07	7.9E+06	3.3E+10
SEM	1.4E+11	5.0E+10	1.9E+11	2.1E+10	3.2E+07	1.5E+10	8.1E+06	7.3E+09	4.6E+06	5.1E+06	8.2E+09
Abx-PC-01	1.9E+12	1.0E+11	5.4E+11	2.2E+11	2.5E+07	2.1E+07	4.8E+07	1.3E+09	1.4E+07	2.0E+06	2.1E+11
Abx-PC-02	1.9E+12	1.2E+11	9.1E+11	2.3E+10	2.6E+07	3.6E+10	6.5E+06	3.0E+10	1.2E+07	1.8E+06	4.8E+10
Abx-PC-03	1.6E+12	4.2E+11	7.3E+11	8.1E+09	3.9E+08	4.8E+06	9.5E+06	5.2E+10	1.0E+07	2.3E+06	5.1E+09
Abx-PC-04	1.6E+12	1.7E+11	1.0E+12	3.3E+09	6.4E+07	6.2E+07	4.4E+07	4.7E+10	1.3E+07	2.4E+06	1.3E+10
media	1.8E+12	2.0E+11	8.1E+11	6.4E+10	1.3E+08	9.0E+09	2.7E+07	3.2E+10	1.2E+07	2.1E+06	6.8E+10
SEM	8.2E+10	7.5E+10	1.1E+11	5.2E+10	8.8E+07	9.0E+09	1.1E+07	1.1E+10	7.5E+05	1.5E+05	4.7E+10