

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Efecto sobre la microbiota bacteriana intestinal de
una fracción de fructooligosacáridos de la raíz de
Psacalium decompositum”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Biotecnología

PRESENTA

Q.A. María Guadalupe Juárez Pérez

COMITÉ TUTORIAL

Directores

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Asesora

Dra. María Margarita Canales Martínez

Ciudad de México, julio de 2020



Comité tutorial

Director

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Profesor titular C

Departamento de Biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

fjfp@xanum.uam.mx

Director

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

aaaf@xanum.uam.mx

Asesora

Dra. María Margarita Canales Martínez

Profesor titular C

UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores – Iztacala

Universidad Nacional Autónoma de México

dra.margaritacanales@gmail.com

Ciudad de México, a 1 de julio de 2020

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobaron la tesis titulada “**Efecto sobre la microbiota bacteriana intestinal de una fracción de fructooligosacáridos de la raíz de *Psacalium decompositum***”, que presentó la **Q.A. María Guadalupe Juárez Pérez**.

El comité tutorial del proyecto de investigación está constituido por:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino
Director: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Asesora: Dra. María Margarita Canales Martínez

El comité sinodal está conformado por:

Presidente (a):

Dr. Julio César Almanza Pérez
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
icap@xanum.uam.mx



Secretario (a):

Dra. María Margarita Canales Martínez
UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores – Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México
dra.margaritacanales@gmail.com



Vocal:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores – Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México
icampos@unam.mx



Vocal:

Dr. Eduardo Zúñiga León
Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
pqen10@hotmail.com



Ciudad de México, a 1 de julio de 2020

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobaron la tesis titulada “**Efecto sobre la microbiota bacteriana intestinal de una fracción de fructooligosacáridos de la raíz de *Psacalium decompositum***”, que presentó la **Q.A. María Guadalupe Juárez Pérez**.

El comité tutorial del proyecto de investigación está constituido por:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino
Director: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Asesora: Dra. María Margarita Canales Martínez

El comité sinodal está conformado por:

Presidente (a):

Dr. Julio César Almanza Pérez
*Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
jcap@xanum.uam.mx*

Secretario (a):

Dra. María Margarita Canales Martínez
*UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores – Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México
dra.margaritacanales@gmail.com*

Vocal:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
*UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores – Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México
jcampos@unam.mx*

Vocal:

Dr. Eduardo Zúñiga León
*Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
pgen10@hotmail.com*

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el PNPC del CONACyT y además cuenta con apoyo de dicho consejo cuyo número de referencia es 001465. El consejo también brindó su apoyo a la alumna a través de la beca otorgada a nombre de María Guadalupe Juárez Pérez con números de CVU y Becario, 872104 y 638242, respectivamente.

Parte de este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana. También en los Laboratorios de Farmacognosia y Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.



*La vida es un desafío, afróntalo.
La vida es amor, compártelo.
La vida es un sueño, hazlo realidad.*

Proverbio Hindú

AGRADECIMIENTOS

Gracias ma' y pa' por la dulzura y amor con que van junto a mí por esta vida, por apoyarme, por verme crecer y por ser quienes siempre vuelven mis pies al suelo.

Gracias Hermanas y sobrinos, todos ustedes unos loquillos, pero con esa característica, con su presencia y amor, han tranquilizado a mi alma cada vez que me he sentido sola.

Tío Gau†, gracias por todo lo que ha hecho por mi durante estos años, por las pláticas intelectuales, las de anécdotas y las bromas, todo aquello ha iluminado y lo atesoro en mi corazón. De usted he aprendido y lo admiro mucho. Gracias a todo su personal por la amabilidad y cuidados que han tenido por mí a lo largo de todo este tiempo, especialmente a las mujeres de la cocina por procurarme todos los días.

Mary y Dulce, gracias por su bella amistad, por compartir sus valores, sus experiencias y sus sueños, por construir junto conmigo recuerdos locos y bonitos.

Dr. Alarcón y Dr. Paco Pepe, gracias por la confianza, por el apoyo, por el trato de amistad, por la contribución a mi crecimiento científico y personal, ¡realmente son geniales!

Dra. Margarita, gracias por su disposición para colaborar en este proyecto, por el tiempo otorgado, por la amabilidad y calidez con que me acogió en el laboratorio.

Dr. Jorge, le agradezco muchísimo por su apoyo y por haberme recibido amablemente, siempre con una sonrisa sincera. También por la considerable paciencia que me tuvo y por haberme concedido mucho de su valioso tiempo.

Dra. Anita Hernández, Dr. Julio Almanza y Dr. Iván Jasso: ¡Ufff! En serio, por haberme salvado cuando más lo necesité, por compartirme sus conocimientos y brindarme su amistad, ¡gracias de corazón!

Agradezco al Ing. Guadalupe Cruz Pérez, quién me ayudó a conseguir, en un mercado local de chihuahua, las raíces de la especie. Sin duda su disposición en

cuanto a tiempo y ganas fueron muy importantes para poder realizar este proyecto. Gracias primo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por contar en su oferta con el posgrado en Biotecnología y por apoyarnos como alumnos a través de la beca de Eventos de Difusión y de Investigación en Ciencia y Tecnología, con la cual podemos asistir a congresos internacionales fuera de México. Pienso que esta oportunidad cuyo objetivo es impactar sobre nuestra evolución académica, por añadidura nos permite desarrollar otro tipo de aptitudes y actitudes cuando tenemos esa oportunidad.

Agradezco también al CONACyT por la beca otorgada durante el periodo de maestría y al COMECyT, por el apoyo brindado en el último periodo trimestral.



En recuerdo del
Dr. Gaudencio Pérez
Gutiérrez.

[Fallecido a causa de la
COVID-19]

“El día que salí al aeropuerto por vez primera, pasé a despedirme de ti al consultorio '¿Ya te vas, hija? Cuídate mucho y mandas mensaje a tu mamá, que Dios te bendiga'. Tengo presente aún la sonrisa con la que me dijiste eso y el abrazo cálido que nos dimos. Estaba muy emocionada y fue un logro que siempre consideraré compartido, supuse que te daba un gusto sincero por mí, porque así lo expresaste en tus comentarios. Hacer el posgrado fue un sueño durante mucho tiempo, por lo que siempre aprecié tu apoyo y le eché ganas. Estos tiempos han sido duros para todos y duele que no te despedamos como te mereces.

Hoy día, existimos muchas personas agradecidas contigo. De hecho, somos miles un milagro de vida porque tú nos trajiste al mundo o las salvaste. Me quedo con las veces que conversamos sobre tus aventuras de cuando eras un joven con ganas de comerse el mundo, de tus hazañas cuando niño aquí en el pueblo o de cuando eras estudiante de medicina, me quedo con el recuerdo de tus palomazos con mariachi en las fiestas y también como cuando me dijiste mensa por no gustarme el caviar. Me alegra profundamente haber coincidido contigo en esta tierra, siendo tu mi querido tío. Gracias por los valores de familia que has dejado en todos nosotros, por el ejemplo de lucha y perseverancia. Gracias porque desde niña, ustedes fueron un ejemplo de superación para mí. Fuiste una persona maravillosa, y no dudo que sigas haciendo milagros. Hasta entonces.

Te querré por siempre.”

07 de junio de 2020.

“Solía ser como un gran amigo.

Sé que volver a verlo es imposible, pero estoy agradecida con Dios porque nos permitió coincidir en esta vida. Quedó pendiente regalarle un tomo de mi tesis; hoy a cambio, le agradezco por esas pláticas bonitas, por la historia del gusano, por sus chistes a veces malos, por su apoyo moral y profesional cuando más lo necesité y por la confianza que tenía en mí.

Que Dios ilumine su camino, en mi corazón enciendo una luz para usted.”

05 de mayo de 2020.

*Con un
agradecimiento
sincero al
**Dr. David Buzo
Leal.***

[Fallecido a causa
de la COVID-19]



Santiago Moreno

*Jefe de servicio de
Enfermedades Infecciosas
del Hospital Universitario
Ramón y Cajal de Madrid,
España.*

Párrafo extraído del artículo "Agonía y resurrección del doctor Moreno", de El País.



“Si ahora mismo algo puede solucionar el problema es la **investigación prioritaria**, investigar qué **medicamentos** debes dar a un paciente desde el primer momento y más tardíamente cuando está malito. **Investigar en busca de una vacuna**. Y en ausencia de esta, la investigación epidemiológica. Son los epidemiólogos los que pueden trazar qué va a pasar con la epidemia en los próximos meses y, por tanto, la cantidad de medidas que se deben adoptar. **Nuestro país no se caracteriza precisamente por valorar la investigación en lo que vale**. Ahí sí que se cometen errores, y es verdad que cualquiera que haya estado en el Gobierno **lo ha hecho mal, porque a la vista está**. Yo creo que esto **nos ha llegado tan dentro y ha dañado tanto el país y el mundo que ha demostrado que es preciso estar preparado para investigar lo que haga falta.**”

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción.....	1
1.1. Microbiota humana	1
1.2. <i>Psacalium decompositum</i> : planta medicinal utilizada por etnias de México y Estados Unidos.....	7
2. Marco teórico.....	9
2.1. Conocimiento de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo	9
2.1.1. Conocimiento de la microbiota a través de cultivos y técnicas de biología molecular	10
2.1.2. Metagenómica de amplificación del gen marcador ARNr 16S	12
2.2. Homeostasis y disbiosis intestinal	15
2.3. Influencia de la microbiota intestinal en el desarrollo de obesidad y diabetes.....	19
2.4. Sistema inmune y su relación con la microbiota intestinal	21
2.5. Prebióticos y probióticos.....	25
2.5.1. Fructooligosacáridos.....	26

2.6. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	27
3. Antecedentes: farmacognosia de <i>Psacalium decompositum</i>	32
4. Justificación	35
5. Hipótesis.....	36
6. Objetivos	36
6.1. General	36
6.2. Específicos	36
7. Metodología.....	37
7.1. Obtención de la fracción de fructooligosacáridos (FOS) de <i>Psacalium decompositum</i>	37
7.2. Identificación quimiotaxonómica de la especie	38
7.3. Modelo experimental	39
7.4. Análisis microbiológico	40
7.5. Secuenciación metagenómica de amplificación del gen marcador ARNr 16S	42
7.5.1. Extracción del ADN.....	42
7.5.2. Construcción de la librería y secuenciación metagenómica.....	44
7.5.3. Análisis bioinformático	45
7.6. Análisis estadístico	47
8. Resultados y discusión	48
8.1. Obtención de la fracción de FOS e identificación quimiotaxonómica de la especie	48
8.2. Análisis microbiológico	49
8.3. Análisis de la secuenciación metagenómica.....	53

8.3.1. Calidad del material genético.....	53
8.3.2. Control de calidad del ADN y preparación de librería	54
8.3.3. Control de calidad de la secuenciación.....	54
8.3.4. Procesamiento y análisis de secuencias.....	55
8.3.5. α y β diversidad	64
8.4. Efecto de la fracción de FOS sobre el peso y el consumo de alimento y agua	68
9. Conclusiones.....	71
10. Perspectivas.....	73
11. Bibliografía	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas utilizadas para caracterizar la microbiota intestinal.	11
Tabla 2. Plataformas de secuenciación de ADN utilizadas para el análisis de microbiomas.....	14
Tabla 3. Medios de cultivo empleados para el análisis microbiológico.....	41
Tabla 4. Diseño experimental para la secuenciación metagenómica.	43
Tabla 5. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>Psacalium decompositum</i> ...	48
Tabla 6. Cuantificación y pureza del ADN.....	53
Tabla 7. Calidad del ADN de las muestras.	54
Tabla 8. Tamaño de amplicón a secuenciar	54
Tabla 9. Estadísticas de los datos crudos secuenciados.	55
Tabla 10. Contribución de los phyla predominantes de la microbiota intestinal....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución y diversidad de la microbiota a lo largo del tracto GI.	3
Figura 2. Clasificación taxonómica de <i>Psacalium decompositum</i>	8
Figura 3. Diagrama de flujo para la secuenciación de las tecnologías de nueva generación	13
Figura 4. Alteración de la microbiota intestinal.	16
Figura 5. Jerarquía bacteriana en la microbiota intestinal.....	17
Figura 6. Alteración de la microbiota intestinal por una dieta alta en grasas.....	18
Figura 7. Vías de fermentación de la producción de AGCC.....	28
Figura 8. Descripción general de los efectos de los AGCC en la disfunción endotelial.	30
Figura 9. Fructana de tipo inulina en la fracción de FOS	34
Figura 10. Metodología para obtener la fracción de FOS	37
Figura 11. Modelo experimental del estudio	39
Figura 12. Procesamiento y análisis de secuencias por Geneious.	46
Figura 13. Pipeline del procesamiento y análisis de secuencias por QIIME.	47
Figura 14. Identificación quimiotaxonómica de <i>Psacalium decompositum</i>	49
Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de microorganismos y hongos en medios de cultivo no selectivos.	50
Figura 16. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de microorganismos en medios de cultivo selectivos y diferenciales.	52

Figura 17. Phyla de la microbiota intestinal.	56
Figura 18. Géneros microbianos de interés presentes en la biota intestinal del modelo de estudio.....	58
Figura 19. Mapa de frecuencia de géneros.	61
Figura 20. Mapa de frecuencia de especies.	61
Figura 21. Mapa de frecuencia de la predicción funcional del metagenoma.....	63
Figura 22. Gráfico de las curvas de rarefacción.	66
Figura 23. Diversidad α de cada conjunto de datos.....	66
Figura 24. Gráfico de PCA a nivel de especie.	67
Figura 25. Efecto de los tratamientos sobre el peso.	68
Figura 26. Efecto de los tratamientos sobre el consumo de alimento.	69
Figura 27. Efecto de los tratamientos sobre el consumo de agua.....	70

ABREVIATURAS

ADN	Ácido acidodesoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Adenina-Timina
ATP	Adenosina trifosfato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ES	Error estándar
GC	Guanina-Citosina
NGS	Next Generation Sequencing
pb	Pares de bases
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
UFC	Unidad formadora de colonias

RESUMEN

Psacalium decompositum es un arbusto que crece en el norte de México y en el suroeste de Estados Unidos. Una decocción con agua de la raíz de esta especie es utilizada por curanderos Tarahumaras, Yaquis y Pimas como remedio tradicional para aliviar dolores y como tratamiento alternativo de enfermedades. Una fracción de fructooligosacáridos (FOS) obtenida de esta especie mostró efectos hipoglucémico y antiinflamatorio a nivel experimental. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de esta fracción sobre la microbiota bacteriana intestinal en ratas sanas. Se formaron tres grupos experimentales: 1) grupo control, 2) grupo control prebiótico y 3) grupo experimental FOS. Los tratamientos fueron administrados diariamente, por vía intragástrica, durante 15 días. Se colectaron las heces al inicio y término del estudio, para realizar un análisis microbiológico (en medios selectivos y diferenciales y no selectivos) y metagenómico (región V3-V4 del gen ARNr 16S). El procesamiento y análisis de secuencias se realizó con el software Geneious V11 y con scripts en ambiente QIIME.

De acuerdo con el análisis microbiológico, no se encontró efecto estadísticamente significativo en la composición de microorganismos patógenos tras la administración de la fracción de FOS. La asignación taxonómica mostró que los phyla predominantes en la microbiota intestinal son Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria. Además, en el grupo tratado con FOS la abundancia encontrada de géneros benéficos como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y microbiota productora de butirato fue mayor con respecto a los grupos control. Los resultados sugieren que la fracción tiene un efecto parecido al reportado para la inulina de achicoria, la cual presenta efecto prebiótico. Este estudio demuestra que la fracción de FOS de *P. decompositum* mejora la abundancia de géneros microbianos considerados como benéficos en la microbiota intestinal de ratas sanas. El efecto puede estar mediado por la producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente butirato, y también por el crecimiento de microorganismos que ayudan a mantener la homeostasis intestinal.

Palabras clave. *Psacalium decompositum*, fructooligosacáridos, butirato, efecto prebiótico.

ABSTRACT

Psacalium decompositum is a shrub that grows in northern Mexico and the southwestern of United States. A decoction with water of the root of this species is used by healers Tarahumaras, Yaquis and Pimas as a traditional remedy to relieve pain and as an alternative treatment for diseases. Experimentally, a fraction of fructooligosaccharides (FOS) obtained from this species has been shown to have hypoglycemic and anti-inflammatory effects. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of FOS on the gut microbiota in a model with healthy rats, arranged in 1) a control group, 2) a prebiotic control group and 3) an experimental group FOS. The treatments were administered daily intragastric route for 15 days. The feces were collected at the beginning and end of the study for a microbiological (in selective and differential and non-selective culture media) and metagenomic analysis (region V3-V4 of the 16S rRNA gene). Sequence processing and analysis was performed with the Geneious V11 software and with scripts in QIIME environment.

In the microbiological analysis, no statistically significant effect was found after administration of the FOS fraction on pathogenic microorganisms. The taxonomic assignment shows that the predominant phyla in the intestinal microbiota corresponds to Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria. In addition, in the FOS group treatment the abundance found of beneficial genera such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and butyrate-producing microbial genera, is greater with respect to the control groups. The results suggest that the fraction has an effect like as to reported for chicory inulin, that has a prebiotic effect. This study shown that the FOS fraction of *P. decompositum* improves the abundance of microbial genera considered beneficial in the gut microbiota of healthy rats. The effect may be mediated by short-chain fatty acids production, mainly butyrate, and also with the growth of microorganisms that help maintain gut homeostasis.

Keywords. *Psacalium decompositum*, fructooligosaccharides, butyrate, prebiotic effect.

1. Introducción

1.1. Microbiota humana

El cuerpo humano está colonizado por una amplia gama de microorganismos: bacterias, virus y eucariotas que forman comunidades específicas de cada entorno anatómico (Weinstock, 2012). Estas comunidades representan más de 10^{14} células microbianas/humano, que viven pacíficamente en nuestro cuerpo, encontrándose en la piel, el tracto genitourinario, respiratorio y gastrointestinal (GI) (Cavalcante y col., 2015). En conjunto, se conocen colectivamente como la microbiota humana y cada comunidad tiene, dependiendo del entorno corporal en el que se encuentre, su propia estructura y composición. El término “microbiota” se refiere el número total de organismos existentes en un determinado entorno y es un término más correcto que el antiguamente utilizado “flora” o “microflora”, algo característico de las plantas (Fraher y col., 2012). De este término deriva “microbioma”, definido como la capacidad total del genoma de una comunidad colectiva de bacterias en un entorno particular. El objetivo fundamental de la investigación de un microbioma es medir la estructura y la dinámica de las comunidades microbianas, las relaciones entre sus miembros, así como las sustancias que son producidas y consumidas, la interacción con el hospedero y las diferencias entre hospederos sanos y con alguna enfermedad (Weinstock, 2012).

El microbioma humano es un tema bastante investigado, por lo que los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que incluso sea denominado como otro órgano del cuerpo humano, debido a sus productos, a su capacidad de respuesta al ambiente y a su integración con otros sistemas. Ha sido también denominado como nuestro “segundo genoma”, pues la suma de los genes de los microorganismos que conforman el microbioma es más de 100 veces superior al número de los genes humanos (Weinstock, 2012). A pesar de todas estas investigaciones, que comenzaron con el cultivo bacteriano hasta llegar a la secuenciación metagenómica del gen ARNr 16S, nuestro conocimiento sobre la microbiota humana es aún

incompleto. Un ejemplo de esto es el sistema GI, sólo en la boca se han encontrado aproximadamente 700 especies de microorganismos (de nueve phyla), una riqueza taxonómica parecida a la del colon, aunque con menor abundancia. En la mucosa esofágica se han detectado 95 especies de seis phyla; la mayoría son similares o idénticas a las especies que se encuentran en la cavidad oral. En el estómago se han encontrado secuencias de 128 especies bacterianas (de unos ocho phyla), que pueden corresponder tanto a microorganismos provenientes de los alimentos ingeridos y que sobreviven a la acidez gástrica, como a microorganismos residentes (principalmente *Helicobacter pylori*, el cual está asociado a la mucosa gástrica en algunos individuos y es el único microorganismo capaz de sobrevivir en el estómago). En el intestino delgado las poblaciones bacterianas aumentan en la proximidad al colon. Debido al tránsito lento de los restos de alimentos, la composición de la microbiota en ese punto va a ser cambiante, con una proporción creciente de especies anaeróbicas. En el colon se estima que hay aproximadamente 800 especies presentes, que representan nueve phyla bacterianos, siendo los anaerobios obligados de los phyla *Bacteroidetes* y *Firmicutes* los más abundantes. El rápido crecimiento microbiano en el ciego y el colon ascendente se debe principalmente a la hidrólisis de polisacáridos y la fermentación de carbohidratos, mientras que en el colon transversal y descendente el crecimiento se ralentiza y la fermentación de aminoácidos se vuelve más importante. De hecho, la población microbiana es menor en el ciego y mayor en las heces, cambiando la composición de las especies a medida que los anaerobios facultativos disminuyen del 25% al 1% o menos de la comunidad (Pei y col., 2004; Aas y col., 2005; Bik y col., 2006; Dethlefsen y col., 2006).

El sistema GI humano es un sistema complejo, que comienza desde la cavidad oral y continúa a través del estómago e intestinos y termina en el ano, como se muestra en la Figura 1. La densidad y composición del microbioma cambia a lo largo del sistema, las bacterias tienen diversas funciones, muchas de las cuales son beneficiosas para la salud, incluyendo la producción de vitaminas, la absorción de iones (Ca, Mg y Fe), protección contra patógenos, desarrollo histológico, mejora del sistema inmune y fermentación de alimentos “no digeribles” a ácidos grasos de

cadena corta (AGCC) y otros metabolitos. Los papeles de los hongos y virus aún no han sido examinados con gran detalle, sin embargo, se sabe que tienen una función importante en la dinámica de la microbiota y en la fisiología e inmunidad del hospedero relacionadas con la enfermedad y la salud (Hillman y col., 2017).

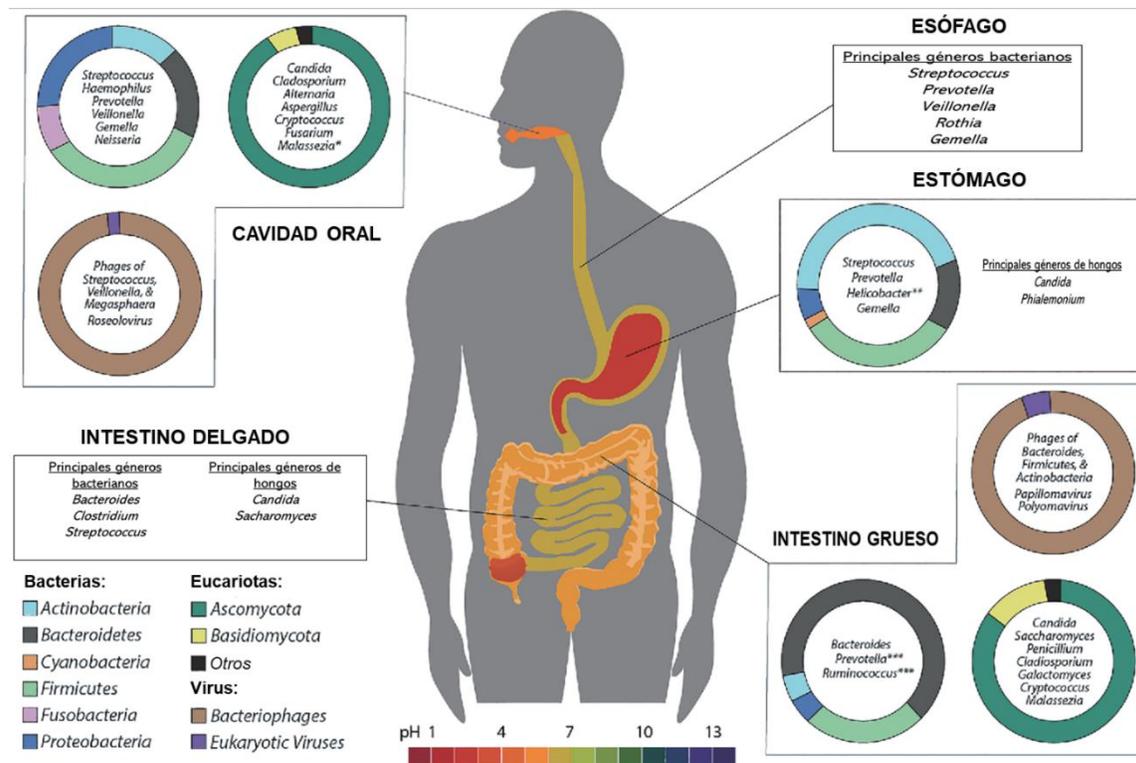


Figura 1. Distribución y diversidad de la microbiota a lo largo del tracto GI.

La composición del microbioma de bacterias, eucariotas y virus entre los nichos fisiológicos del sistema GI humano. Los colores de las gráficas de anillo corresponden a las leyendas en la esquina inferior izquierda y a la escala de pH. **Malassezia* fue muy abundante en un estudio, pero no se ha detectado en ningún otro. **La abundancia de *Helicobacter* puede ser muy variable entre individuos. ***La proporción de estos y otros géneros del colon varían con la edad, dieta y localización geográfica (Hillman y col., 2017).

La microbiota fecal es un ecosistema bacteriano altamente complejo y diverso, en donde existe una jerarquía de bacterias anaerobias dominantes ($>10^9$ unidades formadoras de colonias, o UFC, por gramo), representadas por los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Propionibacterium*, y subdominios ($<10^9$ UFC/g) de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente *E. coli*, y los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio* y *Methanobrevibacter*

(Mariat y col., 2009). Es una microbiota grande y diversa que ha sido reconocida durante mucho tiempo como contribuyente a la maduración intestinal, a la nutrición del hospedero y a la resistencia a los patógenos, procesos mediados a través de la regulación en la proliferación epitelial intestinal, el metabolismo energético y la respuesta inmune asociada a procesos inflamatorios (Dethlefsen y col., 2006).

Factores como la alimentación, la actividad física, el estrés y los medicamentos, pueden afectar la dinámica de la microbiota intestinal, pero la alimentación tiene mayor impacto: por ejemplo, una dieta alta en contenido de grasa y proteína animal y baja en carbohidratos (parecida a la llamada dieta occidental) ha sido asociada con un alto nivel de *Bacteroides* y bajo nivel de *Prevotella*. Por el contrario, una dieta con alto contenido de carbohidratos, pero bajo contenido de grasa y proteína animal está asociada con el patrón inverso. En cuanto a las dietas ricas en proteínas, estas pueden incrementar la actividad de enzimas bacterianas tales como β -glucuronidasa, nitrorreductasa o azorreductasa, que producen metabolitos tóxicos y pueden disparar una respuesta inflamatoria. Se ha encontrado que el impacto de diferentes dietas en la composición de la microbiota intestinal se nota dentro de las 24 h siguientes y es estadísticamente significativo. Estos cambios microbianos en el tracto GI tienen consecuencias en la respuesta metabólica e inflamatoria del hospedero (Guerrero y Álvarez, 2017).

La actividad física puede modificar el perfil microbiano a uno más sano a través de la estimulación de especies bacterianas promotoras de salud; de hecho, se ha demostrado que existe una relación entre la concentración plasmática de creatinina (un marcador de ejercicio extremo) y una dieta rica en proteínas (necesaria cuando se realiza deporte), la cual podría resumirse en que el ejercicio y la dieta son impulsores de la biodiversidad en el intestino (Clarke y col., 2014; Lambert y col., 2015; Bressa y col., 2017). La afectación por el estrés es un tema bastante complejo, pero se sabe que la microbiota intestinal se relaciona entre el intestino y el hospedero mediante la modulación del eje cerebro-intestino, que es un sistema de comunicación neuro humoral bidireccional entre el intestino y el cerebro. Es decir, las señales del cerebro modifican las modalidades motoras, sensoriales y

secretoras del tracto GI y, a su vez, las señales del intestino pueden afectar el comportamiento emocional, el estrés y los sistemas de modulación del dolor a través de las vías neuronal, endocrina e inmune. De esta manera, el eje intestino-cerebro se ha expandido al eje biota-intestino-cerebro, que influye en el desarrollo del sistema nervioso central (Desbonnet y *col.*, 2015; Pusceddu y *col.*, 2015; Kato y *col.*, 2016). El ser humano depende de su microbiota nativa para la nutrición y resistencia a la colonización por patógenos, pues como se ha descrito anteriormente, la microbiota intestinal es esencial para el desarrollo de la respuesta inmune del hospedero y las interacciones humano-microorganismo pueden ser alteradas por muchos aspectos, particularmente por los antibióticos, los cuales tienen diferentes espectros antimicrobianos y su efecto sobre la microbiota varía de drástico a bastante leve (Dethlefsen y *col.*, 2008; Graf y *col.*, 2015). El uso de antibióticos de amplio espectro ejerce un impacto negativo sobre la integridad intestinal, ya que elimina no sólo a las bacterias patógenas, sino también a las beneficiosas. Por ello, una medida recomendable cuando se sigue un tratamiento antimicrobiano es incrementar la ingestión de alimentos probióticos para restablecer la microbiota bacteriana intestinal saludable que ha sido devastada (Gimeno, 2004).

Como ya se mencionó, la alimentación es el factor principal que afecta, positiva o negativamente a la microbiota intestinal. Las dietas complejas proporcionan una variedad de factores que promueven y/o inhiben el crecimiento de phyla específicos, como los microorganismos especializados en la fermentación de carbohidratos. Las dietas poco equilibradas promueven la consecuente alteración de la dinámica intestinal, dando lugar a la destrucción de la mucosa a través de la alteración de la permeabilidad de la pared intestinal, de tal manera que bacterias patógenas y sus toxinas pueden atravesarla y una dieta pobre en fibra da lugar a un menor peristaltismo y a un retardo en el tránsito intestinal del alimento, lo que, a su vez, también provoca una alteración del equilibrio bacteriano (Gimeno, 2004; Graf y *col.*, 2015). Generalmente se ha recurrido, y se recomienda, al consumo de prebióticos y probióticos en la dieta, para apoyar nutricionalmente a nuestras bacterias intestinales favorables y mantener la integridad intestinal. Más adelante, en el apartado 2.4, se describen estos conceptos.

Hasta la fecha, todos los prebióticos conocidos son carbohidratos, principalmente oligosacáridos, conocidos por resistir la digestión en el intestino delgado humano y llegar al colon, donde son fermentados por la microbiota intestinal. Hay estudios que han proporcionado evidencia de que la inulina, la oligofruktosa, la lactulosa y el almidón resistente cumplen con todos los aspectos de esa definición, incluida la estimulación de *Bifidobacterium*, un género bacteriano beneficioso. De hecho, la mayoría de los alimentos pueden contener una variedad de carbohidratos químicamente distintos, con propiedades gastrointestinales y metabólicas variadas, y que se han clasificado como “carbohidratos disponibles” y “carbohidratos resistentes”. Los primeros se digieren y absorben en el intestino delgado, proporcionando carbohidratos para el metabolismo, y los últimos resisten la digestión en el intestino delgado o se absorben/metabolizan mal. Nutricionalmente, el carbohidrato resistente más prominente es la fibra dietética, la que, según el Codex Alimentarius se define como polímeros de carbohidratos con tres o más unidades monoméricas, que no se digieren ni se absorben en el intestino delgado humano e incluye también lignina. La fibra dietética también se ha clasificado como soluble e insoluble. Tradicionalmente, se consideró que las fibras solubles tienen beneficios sobre los lípidos séricos, mientras que las fibras insolubles se vincularon con los beneficios de laxante. Bajo esta clasificación se encuentran carbohidratos de interés, como el almidón resistente y los oligosacáridos de tipo inulina, los cuales son fibras solubles. Sin embargo, a pesar de estas generalizaciones de uso común, la evidencia científica es inconsistente (Fuentes y col., 2011; Slavin, 2013; Graf y col., 2015).

Aunque la fibra dietética se encuentra en diversos alimentos como granos integrales, verduras, frutas, legumbres y oleaginosas y han demostrado tener efecto prebiótico, es importante conocer fuentes de obtención de oligosacáridos, especialmente de fructooligosacáridos, los cuales son conocidos por su efecto prebiótico sobre microorganismos benéficos. Este tipo de fibra se puede encontrar en miel, cerveza, cebolla, espárragos, centeno, avena, trigo, alcachofas, plátanos y la achicoria, aunque con contenido y grado de polimerización diferentes. Sin embargo, se pueden utilizar en una amplia gama de productos como ingredientes,

debido a sus propiedades tecnológicas y nutricionales. Tecnológicamente se utilizan como texturizantes, ligantes de agua y, sobre todo, como sustitutos de grasas y azúcares (edulcorantes), lo que sirve para dar consistencia a distintos «productos bajos en calorías», aunque también se pueden encontrar en productos lácteos, productos de panadería, en helados y salsas *light* (Gimeno, 2004). Estas propiedades resultan interesantes, ya que, en un futuro se podría diseñar un producto o ingrediente a partir de la especie de estudio del presente trabajo.

1.2. *Psacalium decompositum*: planta medicinal utilizada por etnias de México y Estados Unidos

Psacalium decompositum es una planta perteneciente a la familia Compositae (Asteraceae), su clasificación taxonómica se indica en la Figura 2. Es un arbusto que también se conoce comúnmente como “matarique” y puede soportar temperaturas ligeramente bajo cero. Casi siempre está verde, aunque durante el verano tiende a tomar una coloración blanca y los ejemplares adultos son de la talla grande, alcanzando los 3 metros de altura (Rivero, 2011). Se distribuye principalmente en el norte de México, Arizona y Nuevo México. En conjunto con otras especies del mismo género, como *Psacalium peltatum*, *Psacalium sinuatum* y *Psacalium sp.*, y la especie *Acourtia thurberi* (que pertenece a la misma familia) forma un complejo de plantas medicinales, reconocido como complejo matarique, el cual es utilizado para tratar diabetes principalmente en dichas zonas (Anaya y col., 1996; González y col., 2008). Todas las especies del complejo comparten nombres y características de raíz similares y se usan como remedios para otras enfermedades como reumatismo, enfermedades gastrointestinales y enfermedades del riñón (Mora, 2016).

P. decompositum es la planta más valorada del grupo, debido a que además de utilizarse en su ámbito natural, también se comercializa en mercados a distancia y es considerada como la especie más efectiva del complejo en el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente (Mora, 2016). La raíz es la parte utilizada medicinalmente y una infusión obtenida de ella tiene un olor acre, con sabor picante

y amargo (Anaya y col., 1996). Una decocción de las raíces y el rizoma de esta especie es utilizada por los grupos étnicos de la región de los Mayos y Guarijio de Sonora, por el pueblo Yaqui y Pima del sur de Arizona, por los Raramuri y los campesinos del estado de Chihuahua para el tratamiento de trastornos reumáticos, dolor, cólico hepático y renal, neuralgia, úlceras y resfriados así como remedio antidiabético. Esta última propiedad ha sido ampliamente evaluada y se han identificado diferentes compuestos activos como el cacalol y otros alcaloides sesquiterpénicos (Jiménez y col., 2006; Rivero, 2011; Castillo y col., 2018). Sin embargo, una fracción de fructooligosacáridos obtenida de la fracción acuosa también mostró dicho efecto, además de poseer efecto antiinflamatorio e hipolipidémico (Jiménez y col., 2011; Merino y col., 2014).

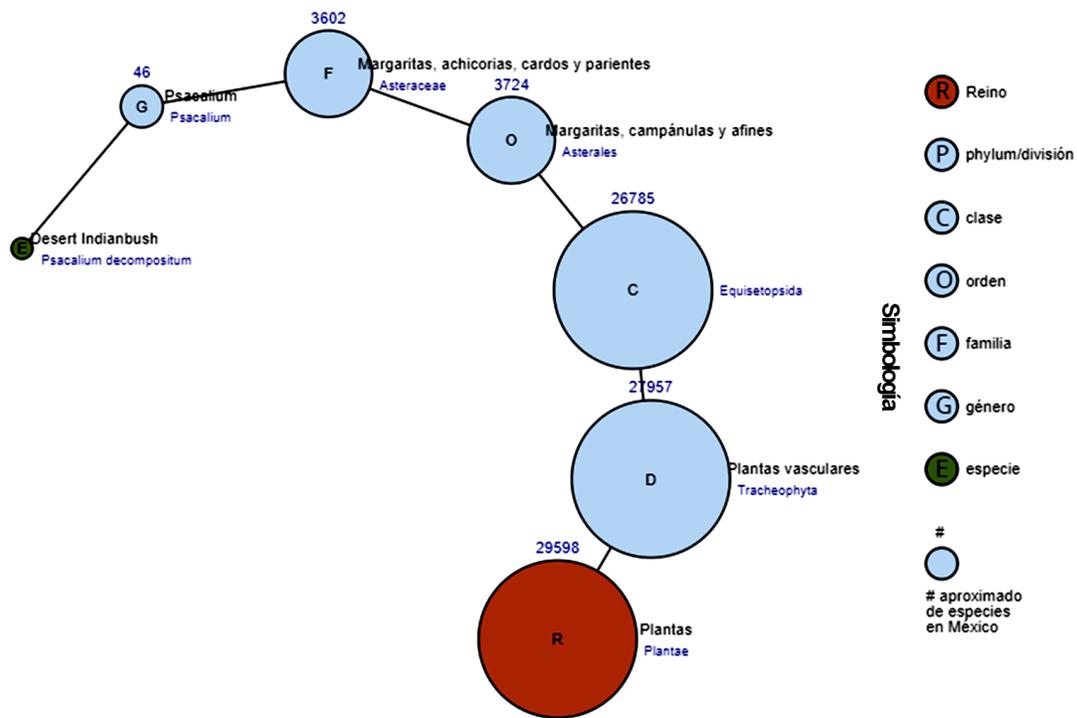


Figura 2. Clasificación taxonómica de *Psacalium decompositum*. (CONABIO, 2020).

2. Marco teórico

2.1. Conocimiento de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo

A principios de la década de 1990 comenzó a ser de gran interés estudiar la función de la microbiota intestinal en la salud humana. Sin embargo, esta asociación fue propuesta desde antes por Elie Metchnikoff, cuando en 1907 planteó la hipótesis de que las bacterias intestinales generaban una autointoxicación (“putrefacción”) que envenenaba nuestro organismo, y que la acidificación del mismo por medio de los *lactobacilos* que contienen los yogures podría contribuir a mantener la salud y a prolongar la vida (Fraher y col., 2012; Ribera, 2017). El cultivo microbiológico y los ensayos bioquímicos fueron estándares importantes para la identificación de especies bacterianas asociadas a la microbiota intestinal durante muchos años. Durante el transcurso de la década de 1990 se desarrollaron diversas técnicas (moleculares) independientes del cultivo bacteriano, que se basan principalmente en la secuenciación de los genes para el ARNr 5S y 16S, con secuencias variables que difieren para cada especie y son un identificador conveniente. Con ello avanzó mucho el conocimiento de la microbiota intestinal. Utilizando estas técnicas se puede obtener: 1) la diversidad microbiana, 2) información cualitativa y cuantitativa sobre especies bacterianas y 3) cambios en la microbiota intestinal durante la enfermedad (Fraher y col., 2012; Weinstock, 2012; Lagier y col., 2015). Ejemplos de estas técnicas son la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP), la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), los microarreglos de ADN y la secuenciación de amplicones mediante la secuenciación masiva de dichos genes (Fraher y col., 2012).

2.1.1. *Conocimiento de la microbiota a través de cultivos y técnicas de biología molecular*

El primer método utilizado para conocer la composición de la microbiota intestinal fue el cultivo bacteriano. Aunque esta técnica es barata, requiere de mucho trabajo y proporciona una visión limitada de la diversidad microbiana, ya que sólo alrededor del 30% de todos los microorganismos que la conforman han sido cultivados. Esto no quiere decir que los organismos no cultivados de la microbiota no sean cultivables, sino que requieren de condiciones de crecimiento permisivas para poder crecer, que aún no se han desarrollado o descubierto (Fraher y col., 2012; Lagier y col., 2015). Staley y Konopka trataron de explicar este problema en 1985, mediante el concepto de anomalía del gran recuento en placa (*great plate count anomaly*). Ellos describieron que las bacterias que no crecieron durante su estudio hasta formar colonias visibles en los medios de cultivo eran nutricionalmente diferentes de aquellas que sí lo hacían. Esta idea fue el parteaguas con el que se comenzaron a desarrollar nuevos métodos para conocer el ecosistema bacteriano de la biota intestinal (Harwani, 2013).

En primer lugar, el grupo de investigación de Woese describió al gen ARNr 16S como una molécula marcadora para evaluar la diversidad y evolución microbiana y en 1986, Norman Pace y sus colegas lograron describir la diversidad de microorganismos sin necesidad de cultivarlos, mediante la secuenciación de los genes de ARNr 5S y 16S de muestras de diferentes ambientes (Hernández y col., 2014). Para llegar a eso, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representó una herramienta molecular esencial para poder realizar estudios efectivos de genes ARNr 16S de una amplia gama de entornos. Aun así, y al igual que ocurre con todos los métodos moleculares, para perfilar comunidades microbianas son importantes la comprensión y la mitigación de los sesgos asociados con la amplificación por PCR para mejorar el diseño experimental y la solidez de los resultados, además de establecer protocolos metodológicos estandarizados (Rodicio y Mendoza, 2004; Yarza y col., 2014). Los sesgos de PCR se pueden clasificar en dos categorías generales: selección, que es el resultado de diferencias inherentes en las eficiencias

de amplificación, y deriva, que es el resultado de fluctuaciones estocásticas y, por lo tanto, no reproducibles (Kennedy y col., 2014). En la Tabla 1 (Fraher y col., 2012) se muestran las ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas a través del tiempo con las que se fue conociendo la composición de la microbiota intestinal.

Tabla 1. Técnicas utilizadas para caracterizar la microbiota intestinal.

TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cultivo	Aislamiento de bacterias en medios selectivos	Económico, semicuantitativo	De trabajo intensivo, <30% de la microbiota intestinal se ha cultivado hasta la fecha
qPCR	Amplificación y cuantificación de ARNr 16S. La mezcla de reacción contiene un compuesto que emite fluorescencia cuando se une al ADN bicatenario	Identificación filogenética, cuantitativo, rápido	Sesgo de PCR, incapaz de identificar especies desconocidas
DGGE/TGGE	Separación en gel de amplicones de ARNr 16S usando desnaturalizante/temperatura	Se puede cortar bandas de forma rápida y semicuantitativa, para un análisis posterior	No identificación filogenética, sesgo PCR
T-RFLP	Los cebadores marcados fluorescentemente se amplifican y luego se usan las enzimas de restricción para digerir el amplicón de ARNr 16S. Fragmentos digeridos separados por electroforesis en gel	Rápido, semicuantitativo, económico	No identificación filogenética, sesgo PCR, baja resolución
FISH	Las sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente hibridan con secuencias de ARNr 16S diana complementarias. Cuando ocurre la hibridación, la fluorescencia se puede cuantificar usando citometría de flujo	Identificación filogenética, semicuantitativo, sin sesgo de PCR	Dependiente de las secuencias de sonda: incapaz de identificar especies desconocidas
Microarreglos de ADN	Las sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente se hibridan con secuencias de nucleótidos complementarias.	Identificación filogenética, semicuantitativo, rápido	Hibridación cruzada, sesgo PCR, difícil de detectar especies presentes en bajos niveles

	Fluorescencia detectada con un láser		
Secuenciación del gen de ARNr 16S clonado	Clonación del amplicón de ARNr 16S de longitud completa, secuenciación de Sanger y electroforesis capilar	Identificación filogenética, cuantitativo	Sesgo PCR, laborioso, caro, sesgo de clonación
Secuenciación directa de amplicones de ARNr 16S	Secuenciación paralela masiva de amplicones de ARNr 16S parciales, por ejemplo, 454 Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GmbH Ltd, Mannheim, Alemania) (amplicón inmovilizado en perlas, amplificado por PCR en emulsión, la adición de luciferasa da como resultado una señal quimioluminiscente)	Identificación filogenética, cuantitativo, rápido, identificación de bacterias desconocidas	Sesgo PCR, caro, laborioso
Secuenciación <i>shotgun</i> del microbioma	Secuenciación paralela masiva del genoma completo (por ejemplo, 454 Pyrosequencing® o Illumina®, San Diego, CA, EE. UU.)	Identificación filogenética, cuantitativo	Caro, análisis de datos computacionalmente intensos

Abreviaturas, por sus siglas en inglés: DGGE, electroforesis en gel de gradiente desnaturizante; FISH, hibridación *in situ* fluorescente; qPCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa-cuantitativa; TGGE, electroforesis en gel con gradiente de temperatura; T-RFLP, polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción terminales.

2.1.2. *Metagenómica de amplificación del gen marcador ARNr 16S*

La metagenómica se define como el análisis de ADN genómico de toda una comunidad, difiere de la genómica porque en ella el análisis de ADN genómico es de un organismo o célula individual. Este término fue propuesto por Handelsman en 1998, refiriéndose al análisis basado en las funciones del ADN de las especies. Proviene del griego *meta* “más allá”, de ahí que el término significa literalmente “más allá del estudio del genoma” (Hernández y col., 2014). Esta tecnología de secuenciación ha sido una de las herramientas moleculares que ha constituido uno de los avances más importantes de finales del siglo XX, ya que ha permitido detectar e identificar ácidos nucleicos bacterianos de bacterias cultivadas y no cultivables a través del gen ARNr 16S, presente únicamente en bacterias. El progreso en la secuenciación del ADN ha facilitado el desarrollo de bases de datos, siendo la base

GenBank la más grande (Lagier y col., 2015). A partir de estas bases de datos se realizan las asignaciones taxonómicas y se permite obtener información relacionada con:

- I. Diversidad filogenética. Identificación de los microorganismos presentes en la comunidad microbiana, su cuantificación, distribución, sus relaciones filogenéticas y su dinámica.
- II. Metagenómica funcional. Búsqueda de actividades enzimáticas o nuevas rutas metabólicas.
- III. Metagenómica comparativa. Relación de especies con funciones específicas o funciones limitadas bajo determinados hábitats.
- IV. Evolución de genes.

El desarrollo de un estudio metagenómico comprende cuatro etapas, como se indica a continuación (Figura 3).



Figura 3. Diagrama de flujo para la secuenciación de las tecnologías de nueva generación (NGS), donde se encuentra la secuenciación metagenómica.

Cada etapa consiste en lo siguiente (Garavito y col., 2017):

- A. Extracción de ADN. Consiste en el aislamiento del material genético directamente de las muestras.
- B. Construcción de la librería metagenómica. Se obtienen amplicones del gen ARNr 16S etiquetados (*barcode*).
- C. Secuenciación. Se emplean plataformas de secuenciación, siendo Illumina la más ampliamente utilizada. Su tecnología de secuenciación se basa en la polimerización por síntesis.
- D. Análisis bioinformático. Consiste en la desmultiplexación (eliminación de etiquetas), análisis de calidad de la secuenciación, eliminación de quimeras, ensamble y asignación taxonómica.

Existen diferentes plataformas de secuenciación y en la Tabla 2 se indican cuáles son, así como la tecnología que emplea cada una.

Tabla 2. Plataformas de secuenciación de ADN utilizadas para el análisis de microbiomas.

Plataforma	Método	Características	ARNr 16S	Shotgun	Comentarios
Plataformas establecidas					
Instrumento basado en Sanger o capilaridad (Zimmermann y col., 1988)	Fluorescente, terminador dideoxi	Lecturas de 750 pb Alta precisión	Longitud completa secuenciada con 2-3 lecturas	Ayuda de lecturas largas con comparaciones de bases de datos	Método más costoso Rendimiento relativamente bajo, baja cobertura de 16S o <i>shotgun</i>
Roche – 454 (Quince y col., 2009)	Emisión de luz de pirosecuenciación	Lecturas de 400 pb	Hasta tres regiones variables por lectura	Ayuda de lecturas largas con comparaciones de bases de datos	El costo limita la cobertura de <i>shotgun</i> , pero la cobertura 16S es buena
Illumina (Bronner y col., 2014)	Fluorescente, secuenciación gradual	Lecturas de 100-150 pb	Solamente una región variable por lectura	Las lecturas cortas no parecen limitar el análisis	Muy alta cobertura, debido a la alta producción del instrumento y muy bajo costo.
Plataformas poco utilizadas					
Ion Torrent (Merriman y col., 2012)	Detección de protones	Lecturas de más de 200 pb	Como otros NGS	Como Illumina	Una alta cobertura, aunque lecturas más largas que Illumina
PacBio (Rhoads y Au, 2015)	Fluorescente, secuenciación de una sola molécula	Lecturas de hasta 10 kpb, baja exactitud	La precisión es un problema para la correcta identificación del taxón	Las lecturas largas podrían ayudar en el ensamblado	Atractivo para lecturas largas, pero los límites de precisión son bajos
Oxford Nanopore (Jain y col., 2016)	Señal electrónica a medida que el ADN pasa a través de un poro. Secuenciación de una sola molécula	Lecturas largas	Desconocido	Las lecturas largas podrían ayudar en el ensamblado	No disponible aún

Todas estas técnicas han proporcionado información valiosa, porque con ellas se ha elucidado casi por completo la composición del microbioma humano, y en específico la microbiota bacteriana intestinal. Las comunidades bacterianas, tienen un papel importante que incluso pueden considerarse como un objetivo nutricional y farmacológico potencial para la investigación de diversas enfermedades, ya que son clave para mantener una microbiota saludable (homeostasis) o en desequilibrio (disbiosis), debido a su dinámica, estructura y las sustancias que producen-consumen.

2.2. Homeostasis y disbiosis intestinal

La microbiota intestinal es un elemento crucial para el bienestar y la salud de los individuos, al influir directamente en el metabolismo. Aunque evolutivamente los microorganismos preceden a los seres humanos en más de 400 millones de años, la microbiota intestinal ha evolucionado junto con la humanidad, contribuyendo al desarrollo de mecanismos dirigidos a enfrentar microorganismos agresores, maximizar la energía extraíble de los nutrientes y producir nutrientes/vitaminas esenciales (Verdelho y Cortez, 2016). La homeostasis intestinal se relaciona con el estado de resistencia de la microbiota a alteraciones externas y endógenas; se establece y mantiene a través de microorganismos comensales beneficiosos, la barrera funcional y la respuesta inmunotolerante (Wang, 2015). Los patobiontes colónicos, que son microorganismos endógenos benignos que se encuentran en el colón y tienen la capacidad de inducir enfermedades, son directamente reprimidos por dichos microorganismos (comensales beneficiosos), en parte a través de la inducción de respuestas inmunorreguladoras, que involucran a células reguladoras T, interleucinas (principalmente IL-10) y la regeneración de la proteína derivada de los islotes 3 γ (REGIII γ) (Kamada y col., 2013; Sebastián y Sánchez, 2018). La disbiosis en la microbiota o la enfermedad inflamatoria intestinal provoca un desequilibrio en la homeostasis energética que conduce a obesidad (Dahiya y col., 2017), provoca la pérdida de microorganismos protectores y/o la acumulación de

patobiontes cologénicos, lo que conduce a una inflamación crónica que implica hiperactivación de las células TH1 y TH17 (Figura 4) (Kamada y col., 2013).

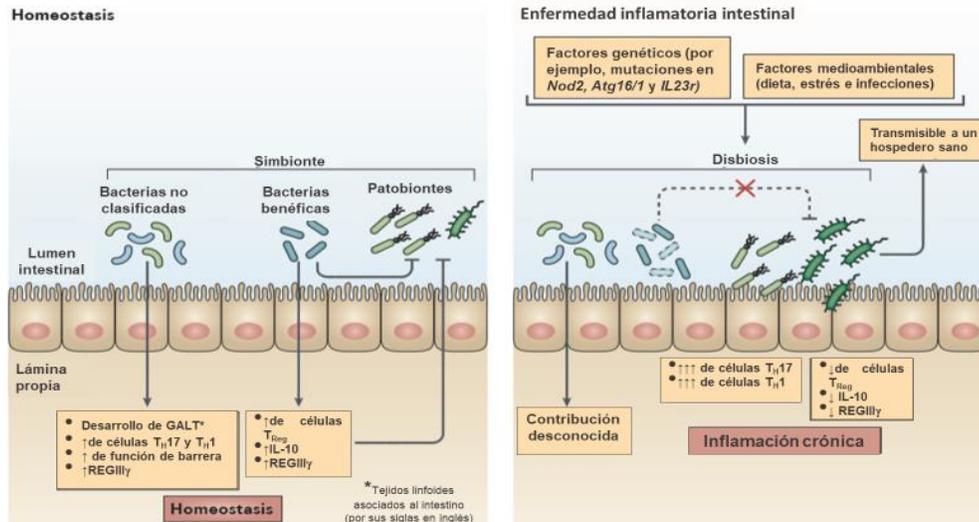


Figura 4. Alteración de la microbiota intestinal.
A Microbiota saludable; **B** Microbiota en disbiosis.
 (Kamada y col., 2013).

La microbiota intestinal juega un papel importante en la peristalsis y en la expresión de diversos genes implicados en la regulación del metabolismo, la angiogénesis, la función de la barrera mucosa, el desarrollo del sistema nervioso entérico y la maduración de la inmunidad de la mucosa intestinal (Grigorescu y Dumitrascu, 2016). En una persona saludable las células microbianas superan en número a las células del cuerpo en una proporción de diez a uno. Tan solo en el intestino existen aproximadamente 1×10^{12} microorganismos, que forman un consorcio que está relacionado con el organismo humano e interactúa con él a través de diferentes mecanismos, influyendo en su desarrollo, fisiología, inmunidad y nutrición (González y Ruiseco, 2017). Se ha afirmado que la composición de la microbiota intestinal puede variar entre personas de la misma etnia, nación y estilo de vida (Guida y Venema, 2015); además es dinámica y sensible a los cambios en la alimentación, lo que puede hacer que varíe en diferentes etapas de la vida (Bäckhed, 2011).

Una gran parte de la composición de la microbiota intestinal se ha descrito e identificado gracias a los avances en las tecnologías genómica e informática (Figura 5), aunque la composición exacta aún es desconocida. Se ha logrado caracterizar la población microbiana a través del proyecto del microbioma humano y se ha encontrado que el 80-90% corresponde a los phyla Bacteroidetes (Bacteroides y Prevotella) y Firmicutes (*Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*), seguido de Actinobacteria (*Bifidobacterium*) y Proteobacteria (*Helicobacter*, *Escherichia*) (Cani y Delzene, 2009, Fraher y col., 2012, Tagliabue y Elli, 2013). Pero aún falta mucho por descubrir, sobre todo porque cada especie puede afectar a la salud de manera diferente. El phylum Bacteroidetes agrupa en su mayoría a bacterias Gram negativas, mientras que Firmicutes agrupa a bacterias Gram positivas (Fukuda y Ohno, 2014; Guida y Venema, 2015; Dahiya y col., 2017).

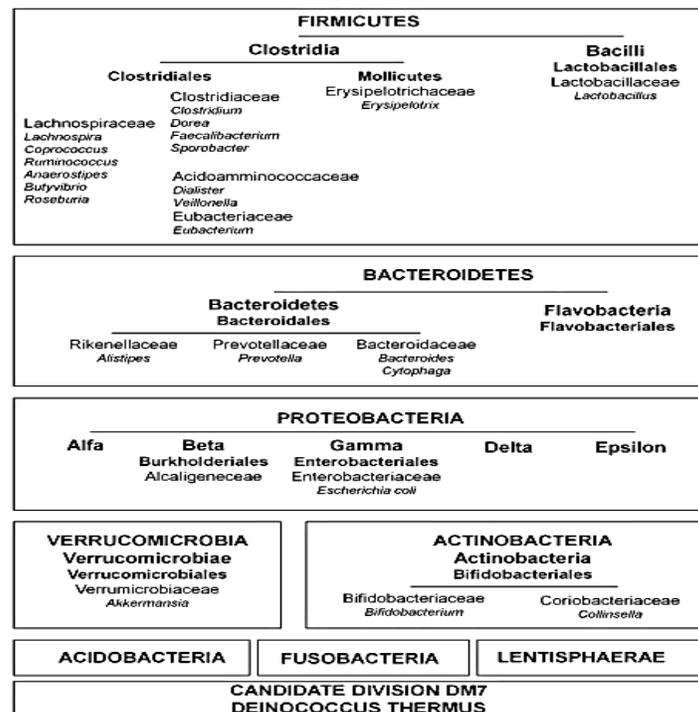


Figura 5. Jerarquía bacteriana en la microbiota intestinal. (Tagliabue y Elli, 2013).

Es importante destacar esta clasificación, ya que los principales compuestos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas son lipopolisacáridos (LPS);

compuestos conocidos por ser potentes estimuladores de la inflamación y que, en concentraciones altas, pueden producir endotoxemia. Los LPS son glucolípidos que se componen de fracciones de lípidos y polisacáridos unidos por un enlace covalente. La capacidad de estos compuestos para promover la inflamación de bajo grado y las alteraciones metabólicas depende de su composición y del tipo de microorganismo que los produce. En condiciones normales, su presencia no tiene efectos negativos para la salud, pero cuando estos compuestos se producen en forma continua en el intestino desencadenan una respuesta inflamatoria que desempeña un papel importante en el desarrollo de diabetes (Larsen y col., 2010). Algunos factores pueden favorecer su paso al sistema circulatorio y llegar a causar endotoxemia metabólica. Uno de ellos es la alimentación, pues el consumo de una dieta alta en grasas conlleva a una acumulación y almacenamiento de energía excesiva, que es aprovechada por dicho grupo de bacterias, aumentando así la permeabilidad intestinal (Cani y Delzene, 2009; Larsen y col., 2010) (Figura 6).

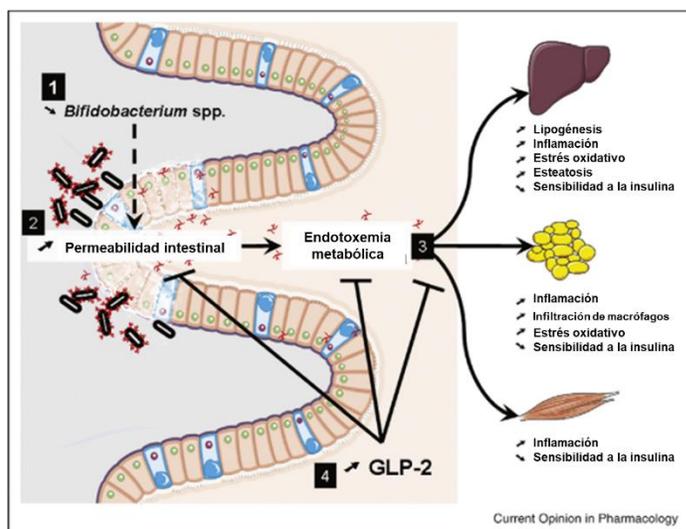


Figura 6. Alteración de la microbiota intestinal por una dieta alta en grasas. Una dieta alta en grasas altera la composición de la microbiota con una disminución específica de *Bifidobacterium spp.* (1), ocasionando permeabilidad intestinal asociada con niveles elevados de LPS bacteriano en plasma (2); esto conlleva a la endotoxemia metabólica (3), la cual promueve el desarrollo de trastornos metabólicos inducidos por inflamación de bajo grado (resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, esteatosis, estrés oxidativo e infiltración de macrófagos en el tejido adiposo) (Cani y Delzene, 2009).

Es necesario definir los mecanismos que expliquen cómo es que las alteraciones intestinales están involucradas en el desarrollo de enfermedades metabólicas, como obesidad, diabetes, hipertensión, dislipidemias y síndrome metabólico, con la finalidad de desarrollar nuevas terapias que permitan su prevención y tratamiento (Gil y col., 2016).

2.3. Influencia de la microbiota intestinal en el desarrollo de obesidad y diabetes

Al nacer, el colon humano es rápidamente colonizado por microorganismos intestinales que actúan como un factor ambiental que afecta la fisiología y el metabolismo del hospedero, particularmente en el contexto de la obesidad y sus trastornos metabólicos relacionados. Experimentos realizados, en donde se comparó la composición de la microbiota intestinal de ratones colonizados y ratones sin gérmenes, demostraron que los microorganismos intestinales inducen una variedad de respuestas del hospedero dentro de la mucosa intestinal, como el control de la barrera intestinal y del metabolismo de las células de tejidos fuera del intestino, como el hígado y el tejido adiposo. Por lo tanto, modulan la homeostasis de los lípidos y la glucosa, así como la inflamación sistémica en el hospedero (Delzenne y col., 2011). Factores ambientales, como una dieta rica en grasas y un estilo de vida sedentario, son las causas de la gran prevalencia de obesidad y diabetes tipo 2 en la población. Estas enfermedades se caracterizan por mantener un inflamación de bajo grado, cuyo origen se debe al aumento de la concentración plasmática de LPS, el cual aumenta durante una dieta alta en grasas y conduce a la endotoxemia metabólica. Experimentalmente, se ha demostrado que este componente provoca dicho daño: mediante una infusión subcutánea continua de baja velocidad de LPS en ratones se indujo la mayoría, si no todas, las características de las enfermedades metabólicas. Las fibras dietéticas reducen el impacto de una dieta alta en grasas con respecto a la aparición de enfermedades metabólicas, a la normalización de la relación Gram negativas y Gram positivas y a la endotoxemia plasmática (Cani y col., 2007; Cani y col., 2008).

La obesidad es un problema importante de salud pública que amenaza tanto a los países industrializados como a los países en desarrollo. Gran parte de esto se debe a la adopción de un estilo de vida "moderno". Esta enfermedad se caracteriza por un grupo de trastornos metabólicos crónicos importantes, que puede incluir resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), esteatosis hepática no alcohólica (no alcohólico), aterosclerosis, hipertensión e hipercolesterolemia,

asociado a un perfil inflamatorio crónico de bajo grado, causa de la exacerbación de todo lo anterior y que conduce a una mayor morbilidad y mortalidad (Conterno y col., 2011; Kotzampassi y col., 2014). Es una condición compleja que se desarrolla a partir de un desequilibrio prolongado de consumo de alimentos y por el gasto energético. Aunque factores como el estilo de vida, la dieta y el ejercicio contribuyen en gran medida al desarrollo de esta epidemia moderna, también la composición de la microbiota intestinal juega un papel importante (Guinane y Cotter, 2013).

La interacción entre el sistema inmune, el metabolismo y la microbiota intestinal juega un papel importante en el control de la homeostasis metabólica y el desarrollo de obesidad, la cual implica un deterioro de la respuesta inmune que afecta tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa. La microbiota intestinal, a través de receptores inmunes innatos, se ha convertido en uno de los factores clave que regula los eventos que desencadenan la inflamación aguda asociada con la obesidad y el síndrome metabólico. Los trastornos inflamatorios conducen a la activación de varias vías de transducción de señales, producción alterada de citocinas y quimiocinas, así como alteraciones en la migración celular, que a su vez causan disfunción metabólica. El tejido adiposo inflamado, con un aumento de la infiltración de macrófagos, se asocia con un desarrollo deteriorado de la propagación de los monocitos y la diferenciación entre las células adiposas, lo que conduce a la acumulación de lípidos ectópicos y resistencia a la insulina (Cavalcante y col., 2015). Se han propuesto diferentes mecanismos para comprender el impacto de la microbiota, tanto en el mantenimiento de la salud metabólica como en el desarrollo de la obesidad y la DMT2 (Palau y col., 2015):

- 1) Modulación de la homeostasis energética mediante la regulación del aprovechamiento de la energía proveniente de la dieta, almacenamiento de grasa, lipogénesis y oxidación de ácidos grasos (metabolismo energético del hospedero).
- 2) Modulación de la integridad de la barrera intestinal, mediante la regulación de la permeabilidad epitelial, la motilidad intestinal y el transporte de productos de

digestión (como ácidos grasos de cadena corta, que son fuentes de energía para los colonocitos).

- 3) Regulación de la secreción de hormonas gastrointestinales, suprimiendo la secreción del inhibidor de la lipoproteínlipasa (factor adiposo inducido por ayuno), lo que provocaría la liberación de ácidos grasos de los triglicéridos y lipoproteínas circulantes en el tejido muscular y el tejido adiposo y promovería la acumulación de grasa corporal.
- 4) Modulación del estado inflamatorio del hospedero, al contribuir al aumento sistémico del LPS, que deteriora la sensibilidad a la insulina (endotoxemia metabólica).

En conjunto, la microbiota intestinal puede ser considerada como un "órgano" altamente dinámico, cuya composición celular se ve afectada por diversos factores y por la fisiología del hospedero, esencialmente por la obesidad (Bäckhed, 2011). Se cree que las endotoxinas derivadas de las bacterias Gram negativas en el intestino pueden ser una de las causas o mediadores de la inflamación sistémica de bajo grado; su circulación, especialmente en pacientes con DMT2, está influenciada por alteraciones en la dieta (Grigorescu y Dumitrascu, 2016). Las interacciones con el sistema inmune innato contribuyen al desarrollo de obesidad y la resistencia a la insulina por la inducción de la señalización inflamatoria en macrófagos a través de receptores tipo Toll (TLR) (Greiner y Bäckhed, 2011).

2.4. Sistema inmune y su relación con la microbiota intestinal

El sistema inmunológico es importante porque protege al organismo de agentes microbianos patógenos, toxinas, partículas extrañas, células tumorales y procesos autoinmunes. Cuando un agente nocivo (antígeno) se introduce en el organismo, se desencadena una respuesta (anticuerpo) y el reconocimiento del antígeno como "algo no propio" es a lo que se denomina inmunidad. Por el contrario, si lo reconoce como "algo propio", no se producen nuevos anticuerpos y entonces se denomina tolerancia inmunológica (Zaldívar, 2002). Las células que componen el sistema inmune provienen de células madre de la médula ósea, clasificándose en dos tipos

a) mieloides y b) linfoides. Del progenitor mieloide se derivan los eritrocitos e inflamocitos. Este último grupo se subdivide en 1) megacariocitos, que preceden a las plaquetas; 2) mastocitos, que son un tipo de células que contienen gránulos de histamina, cuya principal función es participar en las reacciones inflamatorias e inmunológicas del organismo; 3) granulocitos, cuyas funciones principales son la eliminación de infecciones parásitas (eosinófilos), así como eliminar bacterias (basófilos y neutrófilos) y 4) fagocitos, que ingieren cualquier material extraño (eosinófilos, neutrófilos y monocitos) y una vez que han penetrado al tejido desde el torrente sanguíneo aumentan de tamaño (macrófagos) (Ramos y col., 2008).

Del progenitor linfoide derivan: 1) algunas células dendríticas, 2) linfocitos B que producen moléculas denominadas anticuerpos (inmunoglobulinas), 3) linfocitos T divididos en linfocitos Th y citotóxicos (Tc). Los linfocitos Th a su vez se dividen en Th1 y Th2, ambos producen diferentes tipos de citocinas. También derivan 4) linfocitos NK (Natural Killer), los cuales no maduran en el timo ni secretan inmunoglobulinas, son células grandes que destruyen tumores y células infectadas por virus, sin necesidad de estimulación antigénica específica (Ramos y col., 2008). Específicamente, el sistema inmune innato censa, responde y modula la respuesta a microorganismos y a productos microbianos por medio de receptores que están codificados en la línea germinal (sistema inmune innato), llamados receptores de reconocimiento de patrones (RRP) (Sánchez y col., 2010; Netea y col., 2011). Estos receptores son proteínas que se localizan de forma estratégica por toda la célula: en las membranas celulares, donde median el reconocimiento de patógenos extracelulares (como bacterias u hongos), en los endosomas, donde detectan invasores intracelulares como virus, y en el citoplasma. Existen cuatro clases de RRP: 1) receptores tipo Toll (TLR), 2) receptores de lectina de tipo C (RLC), 3) receptores del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD o NLR) y 4) receptores tipo ARN helicasas inducibles por ácido retinóico (RIG-I o RLR) (Netea y col., 2011; Guerrero y Álvarez, 2017).

Los TLR constituyen el prototipo de los PRR y son los mejor caracterizados, pues hasta la fecha se han descrito más de 10 TLR funcionales en humanos (Moreno y

col., 2014). Se caracterizan por ser receptores transmembranales, por tener un dominio extracelular con regiones repetitivas ricas en leucina (RRL), de 24 a 29 aminoácidos, además de una o dos regiones ricas en cisteína y un dominio intracelular de aproximadamente 200 aminoácidos (Sánchez y col., 2010). Los TLR se agrupan en dos tipos de familias; la primera corresponde a una familia de moléculas de superficie y citoplasmáticas que participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMP) a través de la RRL, y la segunda a moléculas intracelulares liberadas de las células en apoptosis, designadas colectivamente como señales de peligro o patrones moleculares asociados a daño (DAMP) y conocidas como alarminas (Sánchez y col., 2010; Rojo y col., 2012; Moreno y col., 2014). Los TLR representan un puente entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo, ya que la activación del sistema inmune innato induce la fagocitosis, la opsonización y la producción de mediadores de la inflamación, bloqueando la propagación del patógeno.

Como ya se describió anteriormente, existen diferentes tipos de TLR y cada uno responde a un diferente ligando: por ejemplo, TLR2 reconoce peptidoglicanos (PGN), ácido lipoteicoico (ALT) y lipoproteínas de bacterias Gram positivas, así como el zimósán de levaduras; TLR3 reconoce ARN de doble cadena (dcARN). TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) de la pared de bacterias Gram negativas y las proteínas de choque térmico (HSP) de 60 y 70 kDa, entre otros; TLR5 reconoce la flagelina bacteriana y TLR9 participa en el reconocimiento de CpGs, de ADN no metilado. TLR1, TLR6 y TLR10 pueden formar heterodímeros con TLR2 aumentando la especificidad por sus ligandos (Sánchez y col., 2010). La inmunidad innata, representada principalmente por los TLR y NOD, reconoce a ligandos específicos y activa factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, CREB-1, induciendo la producción de citocinas inflamatorias como IL-8, IL-12, IL-6, IL-1 β , IL-18 y TNF- α e IL-10, promueven el crecimiento, la diferenciación y activación celular, son producidas transitoriamente y controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta, como cambios en la morfología de los tejidos, evitar la apoptosis y favorecer la angiogénesis, llegando a ocasionar lesiones neoplásicas y cáncer (Hernández y Alvarado, 2001; Sánchez y col., 2010).

El sistema inmunitario innato del tracto GI consiste en una barrera física que está compuesta de células epiteliales intestinales (CEI), representadas por enterocitos absorbentes, células caliciformes productoras de moco, células enteroendocrinas productoras de hormonas y células de Paneth, que producen péptidos antimicrobianos y lectinas, entre otras moléculas. La permeabilidad selectiva de la barrera epitelial contribuye, al mismo tiempo que permite la absorción de nutrientes, a las respuestas inmunitarias al contacto con productos microbianos, que se reconocen a través de RRP y desencadenan diferentes cascadas de señalización intracelular contra PAMP o DAMP (Ignacio y col., 2016). Se sabe que la interacción entre la microbiota intestinal y los TLR ayuda a mantener la homeostasis de la inmunidad intestinal y que la ingesta alta en grasas o la obesidad pueden debilitar la integridad intestinal, lo que conduce a la penetración de la microbiota intestinal o sus productos bacterianos en la circulación y lleva a la activación de los TLR en las células inmunes y a la inflamación sistémica de bajo grado en el hospedero. Las células altamente metabólicas, incluidos los hepatocitos y los adipocitos, expresan estos receptores. Aunque la interacción de los TLR en estas las células metabólicas con la microbiota intestinal no está clara, algunos estudios sugieren que las funciones de los TLR pueden implicar una regulación, tanto metabólica como inmunológica (Yiu y col., 2017).

Para mediar los efectos de las dietas y evitar el desarrollo de enfermedades o bien, para ayudar al hospedero a mantener la salud intestinal (pues el intestino es el punto de entrada de los nutrientes hacia la circulación y es la barrera contra toxinas de distintos orígenes), se ha recurrido al uso prebióticos o incluso al uso directo de microorganismos que se sabe son restauradores de la microbiota intestinal. A continuación se define cada término, los principales compuestos que han demostrado tener mejor efecto prebiótico, sus productos de fermentación y las funciones metabólicas más relevantes en las que estos últimos intervienen.

2.5. Prebióticos y probióticos

La evidencia del papel de la microbiota intestinal en la preservación de la salud metabólica es constatable por el efecto de los prebióticos (como los carbohidratos no digeribles). Estos compuestos son ingredientes no digeribles, pero que son fermentados por cepas bacterianas beneficiosas específicas y estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad (liberación de productos finales de fermentación bacteriana) de la microbiota GI, favoreciendo en última instancia la salud. Por su parte, los probióticos (generalmente contenidos en productos lácteos fermentados como el yogur), son microorganismos saludables que, cuando se administran por vía oral en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud. Se ha reportado que los probióticos reducen el tamaño de los adipocitos en diferentes tejidos, siendo este parámetro de gran importancia para evaluar el potencial antiobesidad de los mismos. En conjunto, los prebióticos y probióticos han sido introducidos en el mercado como suplementos promotores de la salud, observándose efectos beneficiosos, como la mejora del entorno intestinal y la prevención de infecciones microbianas patógenas (Gimeno, 2004; Fukuda y Ohno, 2014).

Los prebióticos más comúnmente utilizados son los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, lactulosa y carbohidratos no digeribles como inulina, celulosa, almidones resistentes, hemicelulosas, gomas y pectinas (Dahiya y col., 2017). Los carbohidratos dietéticos, como los almidones no digeribles (resistentes) y la fibra dietética, son sustratos para producir, mediante fermentación, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, que son absorbidos fácilmente. Los AGCC pueden reducir el riesgo de desarrollar trastornos gastrointestinales, cáncer y enfermedades cardiovasculares. La velocidad y la cantidad de producción de AGCC depende de la composición y la cantidad de microbiota presente en el colon, la fuente de sustrato y el tiempo de tránsito intestinal (Wong y col., 2006). Comúnmente los prebióticos deben cumplir con los siguientes criterios: a) resistencia a la acidez gastrointestinal, hidrólisis por enzimas de mamíferos y absorción gastrointestinal; b) fermentación por la

microbiota intestinal y c) estimulación selectiva del crecimiento de bacterias intestinales asociadas con la salud y bienestar (Gibson y col., 2004).

2.5.1. *Fructooligosacáridos*

Los fructooligosacáridos son cadenas de fructosa natural que comienzan a polimerizarse a partir de la sacarosa y son producidos por plantas y microorganismos. Son bien conocidos por sus propiedades prebióticas y su uso en la elaboración de alimentos funcionales. Asimismo, se han asociado con respuestas a estrés (Peshev y Van den Ende, 2014). Su estructura y grado de polimerización (GP) les confiere su efecto prebiótico, sin embargo, esto no ha sido del todo bien explicado. Por ejemplo, se han evaluado fructooligosacáridos obtenidos de achicoria y de agave, los primeros de tipo inulina lineales, no ramificados (fructosas unidas mediante el enlace β -2,1) y los segundos de tipo mixto, ramificados (enlaces son β -2,1 y β -2,6): ambos indujeron el crecimiento de cepas probióticas seleccionadas (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei* CRL431), pero el efecto prebiótico fue mayor cuanto menor era el GP (Mueller y col., 2016). La actividad prebiótica de los fructooligosacáridos de tipo inulina se debe a que estos carbohidratos tienen una fermentación colónica específica por parte de las bifidobacterias, que son capaces de descomponerlos y utilizarlos por la enzima β -fructofuranosidasa, lo que les da una ventaja competitiva respecto a otras bacterias presentes en el intestino humano (Kolida y Gibson, 2007).

Aunque las propiedades inmunomoduladoras de los fructanos de tipo inulina en las células animales se conocen desde hace más tiempo, su verdadero modo de acción se dilucidó hace pocos años: estos prebióticos estimulan la actividad de las células inmunes a través de la señalización mediada por TLR. Con ello se sugiere que los productos de fermentación (AGCC y gas hidrógeno) conducen a un estado celular más reducido y a una modulación del sistema inmunitario, protegiendo de esta forma contra la enfermedad. Adicionalmente, se han observado efectos sinérgicos con compuestos fenólicos, por lo que se ha sugerido que éstos también pueden aliviar los síntomas inflamatorios en sujetos enfermos. De esta manera, los

fructanos se convierten en ingredientes alimentarios funcionales valiosos por sus propiedades prebióticas y antioxidantes (Peshev y Van den Ende, 2014).

2.6. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

En los últimos años se ha mostrado interés en los metabolitos derivados de la microbiota, incluidos los AGCC, ácidos fenólicos, triptófano y ácidos biliares. Por lo general, las fibras dietéticas, las proteínas y péptidos, pueden fermentarse en el ciego y el colon. Los principales productos de estas reacciones fermentativas son AGCC, los cuales se definen como los grupos de ácidos grasos con menos de seis carbonos, que incluyen ácido fórmico (C1), ácido acético (C2), ácido propiónico (C3), ácido butírico (C4) y ácido valérico (C5). Los principales AGCC en el intestino son C2, C3 y C4, que representan más del 95% de estos compuestos. En general, C2 pueden formarse a partir de piruvato a través de acetil-CoA, C3 se producen principalmente a partir de succinato a través de la vía de succinato o de lactato a través de la vía de acrilato, C4 se forman por acetil-CoA y butiril-CoA, así como acetato y lactato (Figura 7). La concentración de los AGCC varía de ciego a colon, se estima que la cantidad total en el colon varía de 70 a 140 mM y cae a 20-70 mM en el colon distal. Después de ser absorbidos, son utilizados por los colonocitos, como ya se ha descrito, o se transportan a la circulación sanguínea y a otros órganos. Los AGCC ingresan a las células 1) por difusión pasiva, 2) por medio de mediadores como SMCT1 / Slc5a8 y MCT1/Slc16a1, y 3) por la activación de los GPCR (Parada y col., 2019). Los AGCC son producidos por bacterias de la biota intestinal a través de la fermentación sacarolítica de carbohidratos no digeribles, son absorbidos en el intestino delgado y representan el mayor flujo de carbono en el mismo. Los productos mayoritarios de esta fermentación son acetato, propionato y butirato, también lactato (aunque éste es un ácido orgánico que se puede adquirir a través de la dieta) (den Besten y col., 2013; Morrison y Preston, 2016). El butirato y el propionato se consideran antiobesogénicos y el acetato, principalmente, obesogénico. Curiosamente, el acetato y el propionato son producidos

principalmente por microorganismos del phylum *Bacteroidetes*, mientras que el butirato es producido por *Firmicutes* (Verdelho y Cortez, 2016).

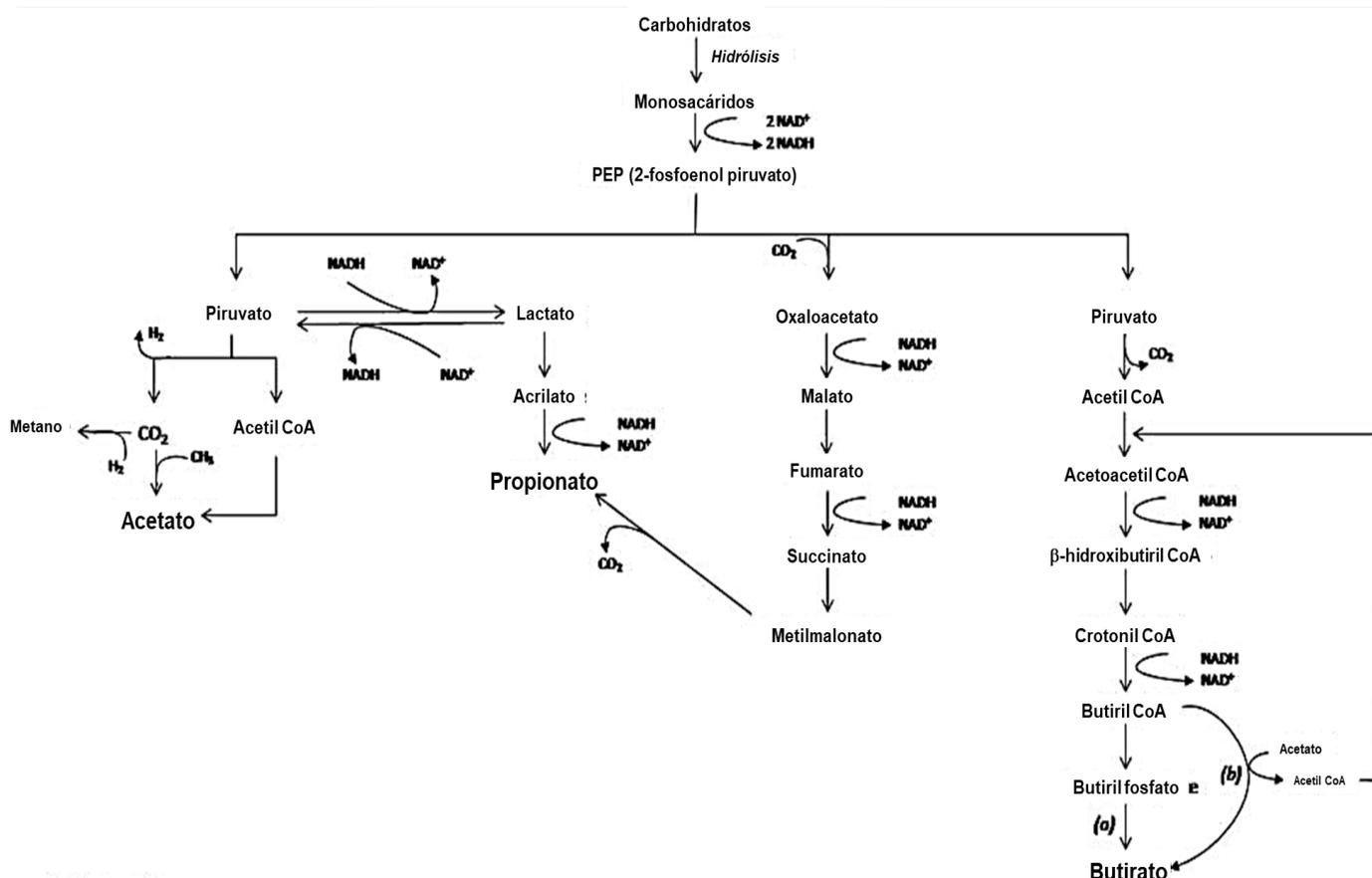


Figura 7. Vías de fermentación de la producción de AGCC. Las principales enzimas involucradas en la producción de butirato se indican como (a) butirato cinasas y (b) butiril CoA: acetato CoA transferasa (Parada y col., 2019).

Algunas funciones biológicas del butirato son la contribución a la maduración del epitelio colónico, la regeneración de la mucosa en el caso de atrofia, la inducción de la diferenciación celular y la estimulación de la apoptosis de células cancerígenas. Es, además, una fuente importante de energía para los colonocitos, lo que aumenta la salud del intestino y con ello disminuye su permeabilidad y previene la endotoxemia metabólica, y también aumenta la sensibilidad a la insulina a través de la estimulación de la liberación de la incretina péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) (Verdelho y Cortez, 2016), entre otras funciones. Estudios con animales han mostrado que la concentración absoluta y proporción molar de butirato, así como su distribución a lo largo del intestino, varía con la utilización de diferentes fuentes de oligosacáridos. Con base en estos hallazgos, es posible hipotetizar que los fructanos de tipo inulina tengan un efecto especial en elevar la concentración de butirato en el colon. Otros estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los fructanos de tipo inulina estimulan selectivamente el crecimiento de *Bifidobacterias* o *Lactobacilli*, ambos considerados como benéficos para el hospedero. Estas bacterias son reconocidas por crear condiciones poco favorables para el crecimiento de patógenos potenciales como enterobacterias y algunos miembros del género *Clostridia* (Kleessen y col., 2001).

Por su parte, el propionato inhibe la expresión de resistina en el tejido adiposo, la cual está relacionada con el desarrollo de la resistencia a la insulina (Moreno y Martínez, 2002), y la síntesis de colesterol a través de la inhibición de la acetil-CoA sintetasa. Respecto al acetato, se trata del AGCC más absorbido, es un sustrato para la lipogénesis y la síntesis de colesterol en el hígado y el tejido adiposo (Verdelho y Cortez, 2016). Entre las funciones de los AGCC en el organismo, la primordial es servir como nutrientes para las células epiteliales del colon, además modulan el pH intracelular y colónico, transportan iones y regulan la proliferación, diferenciación y expresión de genes, como los involucrados en la expresión de transportadores de glucosa (GLUT2) y genes de respuesta temprana (*c-myc*, *c-jun* y *c-fos*) (Tappenden y McBurney, 1998). Los niveles altos de AGCC disminuyen el pH, influyendo directamente en la composición de la biota del colon, reduciendo, por ejemplo, a patógenos del género *Clostridium*. También disminuyen la solubilidad de

los ácidos biliares, aumentan indirectamente la absorción de minerales y reducen la absorción de amonio por la disociación del amonio a aminas (Wong y col., 2006; den Besten y col., 2013).

El efecto de los AGCC sobre la producción de citocinas inflamatorias en las células endoteliales e inmunes y el reclutamiento de células inmunes y su trans migración a través de la capa endotelial siguen siendo, aun así, controvertido. Se ha reportado que estos compuestos (principalmente butirato y propionato) modulan las respuestas inmunes e inflamatorias mediante la activación de los receptores de ácidos grasos libres (FFA) tipo 2 y 3 (receptores FFA2 y FFA3), el receptor 109A acoplado a proteínas G (GPR109A) y la inhibición de las desacetilasas de histonas (HDAC) (Li y col., 2018; Parada y col., 2019) (Figura 8).

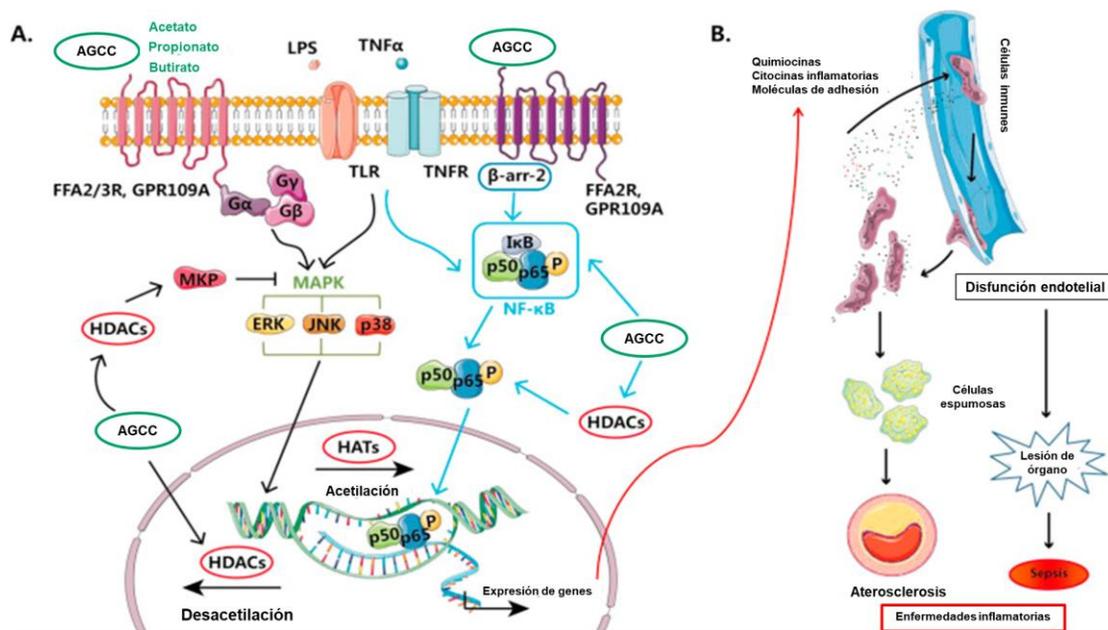


Figura 8. Descripción general de los efectos de los AGCC en la disfunción endotelial.

A: LPS o TNFα se une a su receptor y activa las vías de señalización MAPK y NF-κB para modular la expresión génica, incluidas las citocinas inflamatorias, las quimiocinas y las moléculas de adhesión, que son factores importantes en el desarrollo de la aterosclerosis y la sepsis. B: la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión dependientes de LPS o TNFα induce la adhesión de células inmunes y el reclutamiento a la lesión inflamatoria (Li y col., 2018).

Los AGCC también parecen jugar un papel importante en la regulación de la integridad de la barrera epitelial, mediante la regulación coordinada de proteínas de

unión estrecha (TJP, por sus siglas en inglés), que regulan el transporte intracelular entre el lumen y el sistema hepático. El aumento de la permeabilidad en dicha barrera normalmente se asocia con la translocación de bacterias y/o sus componentes de la pared celular, lo que desencadena una cascada inflamatoria que se ha asociado con la obesidad y la resistencia a la insulina. El aumento del LPS desencadena una cascada proinflamatoria mediada por TLR4 en las células inmunes, lo que conduce a la activación de vías de señalización río abajo, como el factor nuclear kappa- β (NF- κ β) y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), que puede conducir a la inflamación impulsada por citocinas como α -TNF e IL-6. De los AGCC, el butirato parece ser el regulador más importante de las TJP y se ha demostrado que mejora la función de barrera intestinal. Se ha demostrado que el butirato disminuye la translocación de LPS, lo que conduce a la inhibición de la activación de macrófagos, la producción de citocinas proinflamatorias y la infiltración de neutrófilos (Morrison y Preston, 2016).

3. Antecedentes: farmacognosia de *Psacalium decompositum*

A través de diversos estudios fitoquímicos se han encontrado y aislado más de diez compuestos químicos a partir de los extractos de *Psacalium decompositum*, siendo los sesquiterpenos cacalol, cacalona, maturina y maturinona los más abundantes en dicha especie (Anaya y col., 2006; Agnihotri y col., 2010; Mora, 2016; Castillo y col., 2018). Se ha propuesto que el cacalol inhibe la síntesis de ATP, la absorción de protones y el transporte de electrones, lo que sugiere que probablemente se comporta como un agente aleloquímico, interfiriendo con el metabolismo de otros organismos (Anaya y col., 2006); pero se ha demostrado que el efecto antiinflamatorio es prácticamente nulo. Por el contrario, algunos estudios han demostrado que la cacalona sí posee efecto antiinflamatorio, el cual podría estar asociado con la función inflamatoria de las prostaglandinas, lo que probablemente involucraría a otros mediadores además de COX (ciclooxigenasa), como histamina, 5-hidroxitriptamina, bradiquinina u óxido nítrico (Agnihotri y col., 2010). Por estos motivos, los efectos benéficos atribuidos en la medicina tradicional a *P. decompositum* estaban asociados con la actividad antiinflamatoria de cacalol y cacalona (Alarcón y col., 2000a y 2000b; Mora, 2016).

La actividad hipoglucémica ha sido evaluada empleando extractos liofilizados, obtenidos por la decocción de la raíz de la planta, evaluada sobre ratones sanos y con diabetes inducida experimentalmente por la administración de aloxana. Los resultados fueron significativos en cuanto a la disminución de la glucemia (Alarcón y col., 2000a). En otro estudio, se obtuvieron diferentes extractos por maceración de la raíz de *P. decompositum* con diferentes solventes orgánicos (hexano, metanol y agua); el extracto acuoso presentó efecto hipoglucémico significativo en ratones normoglucémicos después de su administración. Un precipitado obtenido a partir de la maceración de la raíz con agua, eliminando el líquido a alto vacío, se volvió a macerar con metanol, obteniéndose nuevamente un precipitado (fracción del

Precipitado Agua-Metanol (PAM)), que se evaluó en un modelo empleando ratones sanos y diabéticos. Este tratamiento mostró una actividad hipoglucémica significativa en ratones sanos y levemente diabéticos, pero la administración de esta fracción a animales con diabetes grave no tuvo efecto significativo. A partir de esta fracción y mediante técnicas cromatográficas se lograron aislar dos polisacáridos con actividad hipoglucemiante (Alarcón y col., 2000b).

Dichos polisacáridos se caracterizaron por análisis espectroscópicos y espectrométricos, y se encontró que las principales estructuras químicas presentes en la fracción del PAM correspondieron a fructooligosacáridos (FOS) de tipo inulina, es decir, lineales y con GP de 8 (Figura 9). El efecto hipoglucémico de la fracción fue notable en ratones sanos y diabéticos inducidos con aloxana, a dosis de 150 mg/kg de peso corporal (Jiménez y col., 2011). Se evaluó también el efecto antiobesidad, antiinflamatorio e hipolipidémico de la fracción PAM (llamada más específicamente fracción de FOS) en un modelo de ratas *Wistar* con obesidad inducida con fructosa, se midieron parámetros metabólicos y citocinas inflamatorias asociadas con la obesidad. Los resultados mostraron disminución del peso corporal, de colesterol, de triglicéridos y reducción significativa ($p < 0.05$) de los niveles de IL-6 (interleucina-6), IFN- γ (Interferón gamma), MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1), IL-1 β (interleucina-1 beta) y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) (Merino y col., 2014).

Dado que la fracción del PAM consiste principalmente de carbohidratos no absorbibles, parece probable que su bioactividad se deba a modificaciones en la microbiota intestinal. Por ello, se consideró importante, como primera aproximación, explicar estos efectos a través de la administración diaria de la fracción de FOS en ratas sanas.

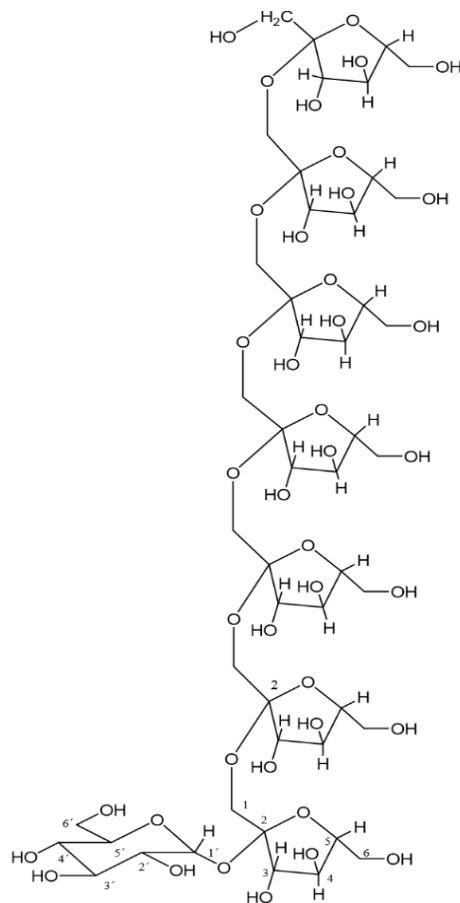


Figura 9. Fructana de tipo inulina en la fracción de FOS (Jiménez y col., 2011).

4. Justificación

Llevar una dieta alta en calorías complica el equilibrio en la salud de un humano y puede conducir a un complejo de síntomas que se denominan colectivamente síndrome metabólico. Las características clave del síndrome metabólico son obesidad, pérdida del control glucémico, dislipidemia e hipertensión. Sin embargo, también incluye enfermedades del corazón, resistencia a la insulina, síndrome de ovario poliquístico, esteatosis hepática no alcohólica y cáncer (den Besten y col., 2013). Estas enfermedades se caracterizan por mantener en el paciente un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal. Por ello, diversos estudios se han centrado en buscar alternativas para mantener la homeostasis intestinal recurriendo al desarrollo de prebióticos, como los carbohidratos no digeribles. Estos ingredientes no digeribles son fermentados por cepas bacterianas beneficiosas específicas (probióticos), que estimulan selectivamente el crecimiento y la liberación de productos finales de fermentación bacteriana que favorecen la salud del hospedero. Estudios previos han demostrado que *Psacalium decompositum* tiene propiedades importantes sobre la salud humana, dadas por compuestos sesquiterpenicos y una fracción de FOS. Por ello, evaluar el efecto sobre la microbiota intestinal de esta fracción contribuirá a fundamentarla como un prebiótico y sentar las bases para, en un futuro, desarrollar un alimento o ingrediente alimentario funcional con beneficios adicionales que impacten en la prevención y tratamiento de enfermedades.

5. Hipótesis

La fracción de FOS no absorbibles de *P. decompositum* con actividad hipoglucemiante, antioxidante, hipolipidémica y antiobesidad, modifica la microbiota bacteriana intestinal de ratas sanas.

6. Objetivos

6.1. General

Determinar el efecto de la administración de la fracción de FOS de *Psacalium decompositum* sobre la microbiota bacteriana intestinal de ratas sanas.

6.2. Específicos

- Evaluar el efecto de la fracción de FOS sobre la microbiota bacteriana intestinal en ratas sanas, mediante el cultivo en placa.
- Determinar la diversidad bacteriana en ratas tratadas con FOS mediante análisis metagenómico del gen bacteriano ARNr 16S.

7. Metodología

7.1. Obtención de la fracción de fructooligosacáridos (FOS) de *Psacalium decompositum*

Se realizó empleando la metodología propuesta por Merino y col. (2014), con modificaciones, de acuerdo con el siguiente diagrama:

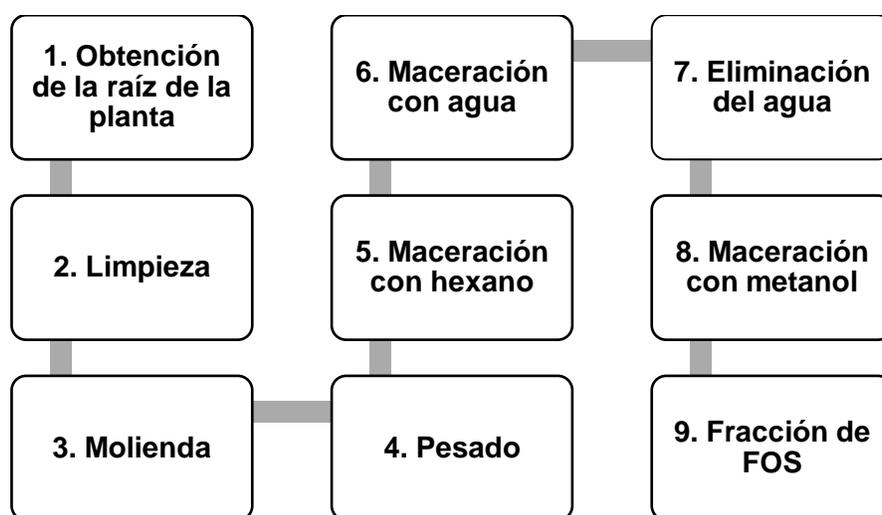


Figura 10. Metodología para obtener la fracción de FOS (Merino y col., 2014).

Las raíces de la planta fueron enviadas desde el estado de Chihuahua por paquetería. El origen de las raíces es de la sierra de Guachochi y tendrían, aproximadamente, de dos a tres meses de haber sido colectadas. El peso neto de las raíces fue de 1.080 kg. Después de retirar las impurezas presentes, las raíces se molieron en un molino de rotor para trituración en seco especial para cereales y alimentos, marca Brabender. El peso de la muestra triturada fue de 1.032 kg. Esta cantidad de muestra molida se maceró con hexano durante un periodo de 5 días, cambiando diariamente el disolvente, empleando un total de 7.15 L. Después, el material vegetal se extendió sobre charolas de vidrio con papel absorbente y se dejó evaporar durante 2 h en una campana de extracción. El material vegetal seco y libre

de hexano se maceró con agua destilada durante otros 5 días, empleando un total de 15.5 L de agua, de la cual se recuperaron 13.9 L.

El extracto hexánico se recuperó a temperatura y presión reducida (40°C y 360 mBar, respectivamente), se colocó en un recipiente de vidrio de color ámbar, se rotuló y almacenó a temperatura ambiente. En cuanto al extracto acuoso, la eliminación de agua se realizó colocando 50 mL de líquido previamente centrifugado sobre refractarios de vidrio, dejando secar durante 24 h a temperatura ambiente y con aireación constante. Después, con la ayuda de una laminilla, se desprendió el extracto acuoso (seco) de la superficie del recipiente. El polvo recuperado se pesó, se guardó en un frasco de vidrio color ámbar rotulado y se almacenó en un desecador para evitar la humedad.

Para obtener la fracción de fructooligosacáridos, se pesaron 15.007 g de extracto acuoso seco y se realizaron 10 lavados en intervalos de tiempo de 40 min con 20 mL de metanol, con agitación constante. Después de la decantación del extracto metanólico en el último lavado, el disolvente se evaporó extendiendo la mezcla sobre un refractario de vidrio, se cubrió con papel aluminio y se dejó sobre una campana de extracción durante 4 h. Transcurrido dicho tiempo, la fracción de FOS se guardó en un recipiente rotulado y se almacenó en un desecador.

7.2. Identificación quimiotaxonómica de la especie

Se realizó este procedimiento mediante cromatografía en capa fina en fase normal, empleando un sistema de elución hexano:acetonitrilo en una proporción 80:20. Se procedió tomando 10 μ L del extracto hexánico y se disolvió en 100 μ L de dicho solvente. Se colocaron 2 μ L en una placa cromatográfica recubierta de gel sílice y se dispuso dentro de una cámara con el sistema de elución. Los compuestos sesquiterpénicos se visualizaron con luz UV a longitud de onda de 254 y 365 nm, pero la identificación de cacalol, como marcador quimiotaxonómico de la especie, se realizó revelando por aspersion con sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N, seguido de la aplicación de temperatura a 100°C (Jiménez y col., 2011; Mora, 2016).

7.3. Modelo experimental

Se emplearon 24 ratas (*Rattus norvegicus*) macho, cepa Wistar, proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala de la Universidad Autónoma Nacional de México (FES-I UNAM). Con un peso promedio de 250 ± 50 g (seis semanas de edad, aproximadamente), se registró el peso al inicio y al final del estudio. Al momento de la recepción, los animales se encontraban en un estado microbiológico “convencional”, las condiciones ambientales de mantenimiento de la habitación del bioterio fueron de 18-26°C de temperatura y 40-70% de humedad con periodos de luz/oscuridad de 12 h. Aunque los animales tuvieron libre acceso al alimento y agua (*ad libitum*), diariamente se pesó el consumo de cada uno de ellos. Las ratas se agruparon de la siguiente manera (n=8): grupo control (GC), grupo control prebiótico (GCP) y grupo experimental (GEF) (Bai y col., 2016), como se muestra en la Figura 11. Se realizó un estudio subagudo durante 15 días (Hidaka y col., 1986), administrando vía intragástrica (IG) 4 mL/kg de peso corporal de solución salina isotónica (SSI) estéril comercial al grupo control (GC), 150 mg/kg de peso corporal de inulina de achicoria (GCP) (Menne y col., 2000) y 150 mg/kg de peso corporal de la fracción de FOS de *P. decompositum* (Merino y col., 2014). Las dosis de GCP y GEF se disolvieron en 4 mL/kg de peso corporal de SSI.

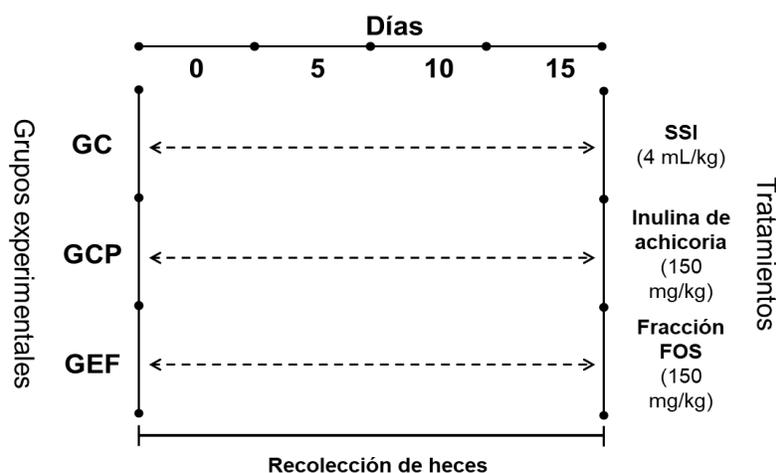


Figura 11. Modelo experimental del estudio (n=8).

Se recolectaron las muestras fecales antes de administrar los tratamientos (tiempo 0) y al finalizar el estudio (tiempo 15); estimulando a las ratas para defecar. Se recuperó una muestra por rata de cada grupo experimental en tubos cónicos estériles de 15 mL, preparados en condiciones asépticas con 5 mL de solución de NaCl al 0.9%, para el posterior análisis microbiológico mediante la técnica de siembra en placa. Por otra parte, tubos para microcentrifuga estériles de 1.5 mL se prepararon con 500 μ L de RNA $^{\text{later}}$ y tras la colecta de las muestras, se almacenaron en congelación para la extracción y purificación de ADN. Con el ADN purificado se hicieron dos “pools” por grupo, los cuales se utilizaron en el análisis metagenómico basado en el gen ARNr 16S.

Debido a la gran similitud y homología entre el genoma de roedores y humanos, los modelos animales son una herramienta fundamental para el estudio de condiciones morbosas que afectan a los humanos (Suárez y col., 2013). Además, los mecanismos del paso de los alimentos a través del tracto GI y la tasa de absorción de nutrientes han sido examinados comúnmente en modelos animales para obtener una mejor comprensión de los procesos que en el tracto GI pueden conducir a una mejor salud o disminuir la enfermedad. Sin embargo, la información de los modelos animales puede no ser directamente traducible a los humanos (Hillman y col., 2017). Por ello, se deben considerar las limitaciones del modelo animal al extrapolar, en un futuro, los hallazgos de este estudio a los humanos.

7.4. Análisis microbiológico

Los medios de cultivo utilizados para llevar a cabo el análisis microbiológico se indican en la Tabla 3. Todos los reactivos fueron proporcionados por el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala. Para la preparación de los medios de cultivo, primero se calcularon las cantidades necesarias, luego se disolvieron en un volumen específico aplicando temperatura. Los medios así disueltos se esterilizaron y, finalmente, se vertieron en cajas de Petri de tres septos dentro de una campana de flujo laminar. Cada muestra fecal se disgregó en los 5 mL de la solución de NaCl, agitando sobre un vortex.

Posteriormente se hicieron dos diluciones (1:100) de 50 μ L de la muestra en 5 mL de NaCl. Se tomaron 50 μ L de la muestra concentrada y de las diluciones, el volumen se extendió sobre el medio de cultivo contenido en la caja de Petri de tres septos hasta la absorción de la muestra, utilizando varillas de vidrio esterilizadas. Las cajas de Petri fueron incubadas a 37°C durante 24 h para permitir el crecimiento bacteriano. Finalmente, se hizo el conteo y se reportó como UFC/g de muestra.

Tabla 3. Medios de cultivo empleados para el análisis microbiológico.

Medio	USO	Clasificación
Müller-Hinton (M-H) (Eisenberg y col., 1981)	Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano de patógenos.	Medio de cultivo no selectivo
Papa dextrosa (PDA) (Ravimannan y col., 2014)	Medio utilizado para el aislamiento, cultivo y recuento de hongos y levaduras.	Medio de cultivo no selectivo
MacConkey (Mossel y col., 1962)	Medio selectivo para el aislamiento y la diferenciación de <i>Enterobacteriaceae</i> y otros bacilos Gram negativos.	Medio de cultivo selectivo y diferencial
Enterococcosel (Wheeler y col., 2002)	Medio selectivo para el aislamiento y el recuento de estreptococos fecales.	Medio de cultivo selectivo
Cetrimida (Brown y Lowbury, 1965)	Se utiliza para el aislamiento selectivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Medio de cultivo selectivo
Medio de cultivo <i>Estafilococos</i> 110 (S110) (Smuckler y Appleman, 1964)	Es utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos.	Medio de cultivo diferencial
Eosina azul de metileno (EMB) (Wynne y col., 1942)	Medio ligeramente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos (<i>Enterobacteriaceae</i> y diversos otros bacilos gram negativos).	Medio de cultivo selectivo y diferencial
Medio de cultivo tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Lotz y col., 1983)	Medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de <i>Vibrio cholerae</i> y otras especies de <i>Vibrio</i> .	Medio de cultivo selectivo y diferencial

7.5. Secuenciación metagenómica de amplificación del gen marcador ARNr 16S

7.5.1. Extracción del ADN

La extracción y purificación del material genómico se realizó con el Kit universal de extracción Dynabeads® DNA DIRECT de Invitrogen.

- *Tratamiento de las muestras*

Se trataron cinco muestras de grupo control (GC), ocho muestras del grupo control prebiótico (GCP) y siete muestras del grupo experimental FOS (GEF), todas correspondientes al último día del tratamiento (T₁₅). Las veinte muestras, con un peso promedio de 337±98 mg, se centrifugaron (11,200 x g/5 min) para retirar la mayor cantidad posible de la solución de RNA/*lateral*. Cada muestra se disgregó en 500 µL de buffer TEN (Tris 500 mM, EDTA 16 mM y NaCl 10 mM; pH 9.0) y se centrifugaron nuevamente (16,128 x g/2 min) para sedimentar los sólidos fecales. Se recuperó el sobrenadante junto con una pequeña capa color café parda que se forma sobre la superficie del sedimento y se transfirió el líquido de cada muestra a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, limpio y nuevo.

- *Aislamiento de ADN*

Para cada una de las muestras tratadas se realizó la extracción del ADN. En un pipeteado rápido, se agregaron 400 µL (1 unidad) de Dynabeads® completamente resuspendidas, para mezclar bien los componentes y formar un complejo entre el reactivo y el ADN. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min sin agitación. El tubo con la muestra se colocó sobre una barra magnética durante 5 min. La apariencia gelatinosa y color marrón oscuro indicó la formación del complejo ADN/Dynabeads®. Con cierto cuidado se desechó el sobrenadante y se retiró del imán, se agregaron 200 µL de buffer de lavado 1X en una sola acción de pipeteo rápida y se volvió a colocar en la barra magnética durante 5 min. Se retiró con cuidado y se desechó el sobrenadante de cada muestra, realizando el lavado

(purificación) tres veces más. Se disolvió el complejo ADN/Dynabeads® en 80 µL de buffer de resuspensión y se incubó a 65°C/5 min para la liberación del ADN. El ADN de cada muestra se recuperó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL nuevo y se adicionaron 80 µL de agua miliQ estéril. Posteriormente, se mezclaron las muestras para obtener dos “pools” y hacerlo por duplicado, tal como se indica en la Tabla 4. Finalmente, se evaluó la calidad y cantidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría, respectivamente. Las muestras se almacenaron a -4°C hasta ser enviadas a Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Tabla 4. Diseño experimental para la secuenciación metagenómica.

Grupo experimental	Pool₁ T₁₅	Pool₂ T₁₅
GC	3	2
GCP	4	4
GEF	4	3

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo y GEF: grupo experimental FOS.
T₁₅= Tiempo final (15 días).

- *Electroforesis en gel de agarosa*

Para preparar el gel al 1% se pesaron 0.2 g de agarosa y se disolvieron en 20 mL de buffer TBE 1X (Tris 500 mM, Ácido bórico y EDTA 500 mM; pH 8.0). Se calentó la mezcla en un horno de microondas casi hasta ebullición (se usó un tapón de plástico para evitar la evaporación de líquido) en intervalos de 10 s, aproximadamente. Se dejó enfriar un poco el preparado (hasta ≈50°C) y se agregaron 4 µL de Midori Green (Nippon Genetics Europe), mezclando con agitación suave. Se vertió la mezcla en la plataforma provista para contener el líquido y se colocó el peine para formar los pocillos; se dejó reposar hasta la formación del gel (solidificación). Finalmente, se retiraron el peine y la cinta adhesiva, y la plataforma con el gel solidificado se colocó en la celda de electroforesis, la cual se llenó con el volumen necesario de buffer TBE 1X.

En un pocillo se mezclaron 2 µL del marcador de tamaño (ADN del bacteriófago lambda, Sigma Aldrich) y 1.5 µL de buffer de carga, como control, y en los pocillos

siguientes 5 μ L de muestra (un pocillo para cada muestra) y 1.5 μ L de buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0.25%; xileno cianol 0.25%; glicerol 30%, en agua). Se colocó la tapa de la celda de electroforesis, se conectaron los cables de los electrodos de la celda a la fuente de poder y se aplicó un voltaje de 100 V para lograr la migración de las moléculas de ADN. La migración progresó hasta que el colorante se visualizó en aproximadamente $\frac{3}{4}$ de distancia de los pocillos próximos (unos 40 min). Transcurrido ese tiempo, se retiró de la celda de electroforesis la plataforma con el gel y se observaron en el transiluminador las bandas de ADN de color verde fluorescente.

- *Cuantificación de ADN*

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro micro-UV/Vis NanoDrop One (Thermo Scientific). Después de encenderlo, se seleccionó la modalidad de lectura (ADNbc; ADN bicatenario) y se calibró colocando 2 μ L de agua miliQ, Se colocó el mismo volumen de muestra, limpiando suavemente el pedestal del equipo entre cada medición.

7.5.2. *Construcción de la librería y secuenciación metagenómica*

La secuenciación genómica fue desarrollada a través de la plataforma de Illumina MiSeq (Macrogen, Seúl, Sorea) con lecturas de final pareado (*paired end*). La preparación de la librería “paired-end” indexada, consiste en 1) amplificación por PCR de las regiones V3 y V4 del gen ARNr 16S (tamaño de amplicón \approx 550 pb); 2) ligado de adaptadores en las posiciones 5' y 3', que a su vez se ligarán a las etiquetas indexadas (Nextera® XT indexes) (*barcode*), 3) amplificación por PCR (tamaño de amplicón \approx 630 pb) y 4) purificación en gel de los amplicones y verificación de la distribución de tamaños mediante un Bioanalizador (Agilent Technologies 2100, chip DNA 1000). La librería se carga en una celda de flujo donde los amplicones de tamaño \approx 630 pb se hibridan con una serie de oligonucleotidos complementarios a los adaptadores de la biblioteca (*barcodes*), los cuales están unidos a la superficie de la celda. Cada fragmento se amplifica a continuación en

grupos clónicos distintos, a través de la amplificación de puente. Cuando se completa la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación. La tecnología de síntesis de Illumina utiliza un método patentado basado en un terminador reversible, que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de la plantilla de ADN. Como los cuatro dNTPs reversibles y unidos al terminador son constantes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error. El resultado es una secuenciación altamente precisa base por base, que elimina virtualmente los errores específicos, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros.

7.5.3. *Análisis bioinformático*

La asignación de las unidades taxonómicas operacionales (OTU, por sus siglas en inglés) microbianas se llevó a cabo utilizando el software Geneious versión 9.1.8 (Kearse y col. 2012; Olsen y Qaadri., 2014) (Figura 12) y la configuración predeterminada en QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Kuczynski y col., 2012; Navas y col., 2013) (Figura 13). El proceso de filtrado y recorte de pares de bases (pb) de mala calidad se realizó con los complementos BBDuk y dada2/deblur, en Geneious y QIIME, respectivamente. En ambos procedimientos se eliminaron secuencias quiméricas con la herramienta UCHIME. El mapeo de referencia se estableció con un 97% de similitud con secuencias representativas, empleando la base de datos microbiana 16S de NCBI para Geneious y de Greengenes (GG_13_8) para QIIME. Se utilizó también la herramienta 16S Biodiversity en Geneious, la cual ejecuta el clasificador RDP v.2.12 para asignar una taxonomía (en el rango de dominio a género) así como una estimación de confianza para cada secuencia, comparándolas con una base de datos de ARNr 16S bacteriana y de arqueas. Esta herramienta, a través del *software* Krona, genera un gráfico interactivo de diversidad bacteriana que puede visualizarse en el navegador de Internet. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de las distancias filogenéticas ponderadas de UniFrac (Lozupone y col., 2005 y 2011)

entre comunidades y las estimaciones de la diversidad filogenética se realizaron utilizando los scripts en QIIME. También se realizó la predicción funcional del metagenoma mediante el software PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (Langille y col., 2013; Aßhauer y col., 2015). Los archivos con extensión “.qzv” se descargaron a través de <https://view.qiime2.org/> y los mapas de frecuencia se obtuvieron a en la página www.heatmapper.ca. Finalmente, se hicieron análisis complementarios a través del servidor MG-RAST (Meyer y col., 2008), un sistema de código abierto para la genómica comparativa (<https://www.mg-rast.org/>).

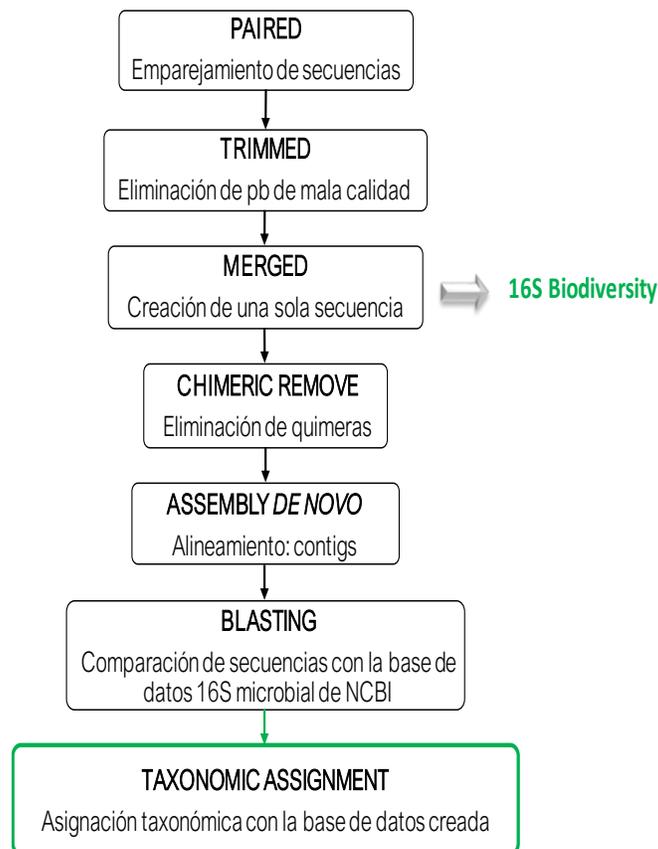


Figura 12. Procesamiento y análisis de secuencias por Geneious.

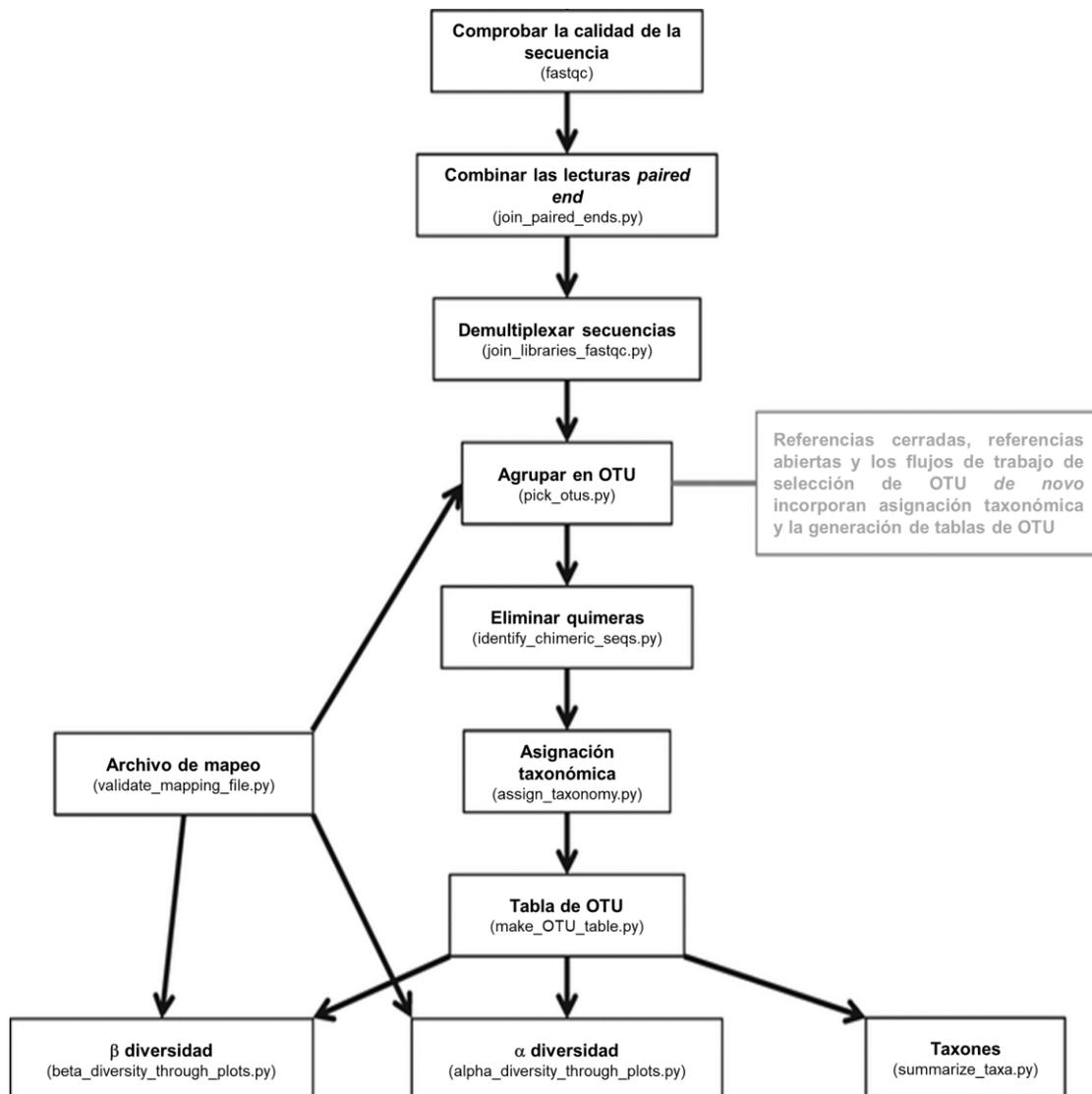


Figura 13. Pipeline del procesamiento y análisis de secuencias por QIIME.

7.6. Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos del análisis microbiológico, así como del consumo de agua y alimento, se usó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). También se compararon las medias de peso inicial y final de cada tratamiento mediante una prueba t de student. Todos estos datos fueron procesados en el software SPSS (versión 22). Con los datos de la secuenciación metagenómica, se realizó el análisis bioinformático descrito en la sección anterior (7.5.3).

8. Resultados y discusión

8.1. Obtención de la fracción de FOS e identificación quimiotaxonómica de la especie

En la Tabla 5 se muestran los rendimientos calculados al obtener la fracción de fructooligosacáridos:

Tabla 5. Rendimiento de los extractos obtenidos de *Psacalium decompositum*.

Extracto	Cantidad (g)	Rendimiento (100 g de raíz)
Hexánico	46.80	4.45%
Acuoso seco	42.63	4.13%
Fracción de FOS	9.28	0.89%

Se realizó la identificación quimiotaxonómica de la especie a partir del extracto hexánico (rico en cacalol y aceites esenciales), mediante la revelación de una mancha azul correspondiente al cacalol. Este resultado se contrastó con lo reportado en la bibliografía y con los resultados obtenidos anteriormente en el Laboratorio de Farmacología (Figura 14). Las marcas que se observan de distinto color pueden pertenecer a derivados de este sesquiterpeno. En los mercados de plantas medicinales de la Ciudad de México, *Psacalium peltatum* es un sustituto común de *P. decompositum*, porque también se conoce como "matarique" y las raíces y el rizoma también contienen cacalólidos, como maturina, acetato de maturina y maturinina, pero no cacalol o cacalona (Castillo y col., 2018), de ahí que estos dos últimos componentes se utilicen como marcadores quimiotaxonómicos para *P. decompositum*.

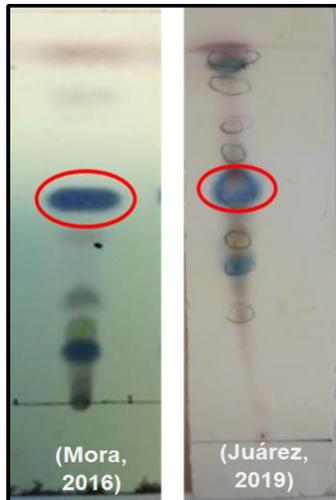


Figura 14. Identificación quimiotaxonómica de *Psacalium decompositum*.

Cromatografía en capa fina para la identificación de cacalol en el extracto hexánico de *P. decompositum*, se utilizó una placa cromatográfica recubierta de gel sílice y un sistema de elución hexano:acetonitrilo (80:20) (Jiménez y col., 2011; Mora, 2016).

8.2. Análisis microbiológico

El conteo bacteriano realizado en los diferentes medios se reportó como \log_{10} de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra fecal \pm SD (\log_{10} UFC/g). La Figura 15 indica qué tratamiento o tratamientos tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el conteo en los medios de cultivo no diferenciales de bacterias y hongos. Como puede apreciarse, tanto la fracción de FOS de *P. decompositum* como la de inulina de achicoria mostraron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el crecimiento de microorganismos patógenos en medio de cultivo Müeller-Hinton, respecto al control GC en el tiempo 0. También se observó efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el crecimiento de hongos y levaduras en Medio de cultivo Papa Dextrosa con ambos tratamientos (GCP y GEF). El hongo identificado en la microbiota intestinal de las ratas sanas (por medio del cultivo en medio Biggy) fue *Candida albicans*, cuyas características de las colonias se contrastaron con lo reportado en la bibliografía. En la Figura 16, puede observarse que el tratamiento administrado en GCP muestra tener efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el crecimiento de la especie *Escherichia coli* y los géneros *Enterobacter/Klebsiella*, así como *Staphylococcus spp* respecto a GC al inicio y término del estudio (T_0 y T_{15}). El tratamiento administrado en GEF únicamente tuvo efecto ($p < 0.05$) sobre *Enterobacter/Klebsiella* y *Staphylococcus spp*.

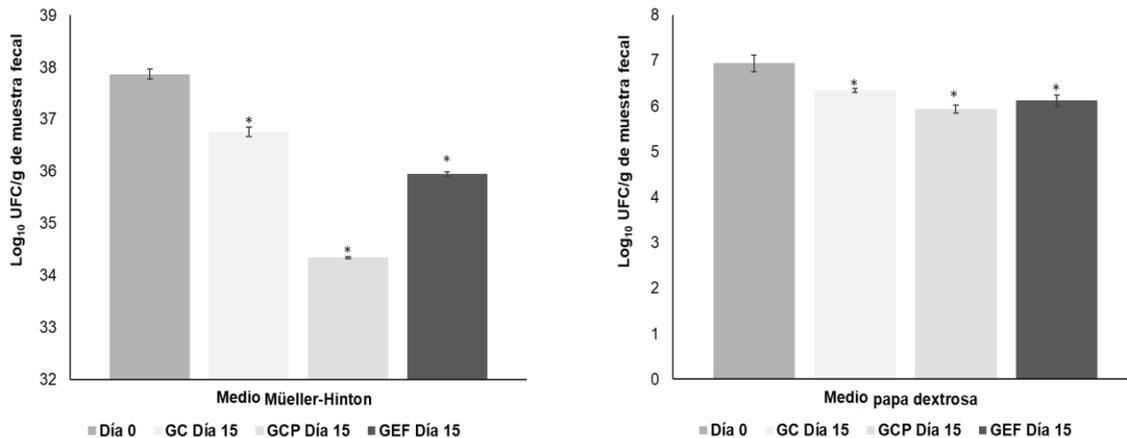


Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de microorganismos y hongos en medios de cultivo no selectivos.

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.

T₀= Tiempo de inicio (día 0), T₁₅= Tiempo final (15 días).

*Estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a GC T₀
(Media±ES)

Comparar los resultados de un análisis microbiológico de cultivo en placa con un análisis metagenómico no siempre es posible, pero el haber observado cambios en el crecimiento de microorganismos patógenos que se sabe están presentes a lo largo del tracto GI fue un punto de inicio para analizar el efecto de la fracción de FOS obtenida de *P. decompositum* sobre la biota intestinal de los animales de experimentación, a través de la secuenciación metagenómica. Tras estos resultados, se pensó que la fracción no es por sí misma antimicrobiana y que su efecto podría ser otro. Sobre todo, porque la dinámica de la microbiota es muy grande, es un ecosistema donde los productos metabólicos fabricados por diferentes especies bacterianas pueden ayudar a proliferar, disminuir o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Por ejemplo, se sabe que varias bacterias y cepas de *Candida* tienen interacciones complejas. Aunque las interacciones entre el LPS bacteriano y *Candida* han sido poco investigadas, se ha demostrado que el LPS de *E. coli* disminuye la probabilidad de que *Candida albicans* sobreviva (Bandara y col., 2010). En el presente estudio, no se puede inferir si la disminución de esta levadura está relacionada con este proceso, ya que la fracción de FOS no demostró tener efecto sobre el crecimiento de enterobacterias (Figura 16). De todas formas, también las *bifidobacterias* y lectinas de *lactobacilos* han demostrado

poseer actividad fungistática y fungicida contra cepas de *C. albicans* (Lakhtin y col., 2010).

Se utilizó inulina de achicoria como control positivo, debido a que se ha reportado con efecto prebiótico (Roberfroid y col., 1998; Niness, 1999; Menne y col., 2000; Van de Wiele y col., 2004) y su estructura contiene una cadena de fructooligosacáridos no ramificados. Aunque aún no se elucida cómo las diferentes estructuras de fructooligosacáridos tienen esta función (debido tanto a la estructura como a las diversas fuentes naturales de obtención), es un hecho que el efecto está relacionado con el grado de polimerización (GP) (Van de Wiele y col., 2007) y los géneros y especies productoras de AGCC, los cuales tienen propiedades inmunomoduladoras (Corrêa y col., 2016; Kumari y Kozyrskyj, 2017) y la estimulación de los colonocitos para la absorción de sodio (Palau y col., 2015), disminuyendo así la permeabilidad intestinal y la invasión de microorganismos patógenos (Van de Wiele y col., 2007). Mas adelante, en los resultados del análisis metagenómico se detallan otros géneros y especies productoras de butirato y propionato, los principales AGCC con funciones favorecedoras para el hospedero. Con base en dichos resultados, se tratará de elucidar el efecto hipoglucémico y antiinflamatorio de la fracción de FOS de *P. decompositum*.

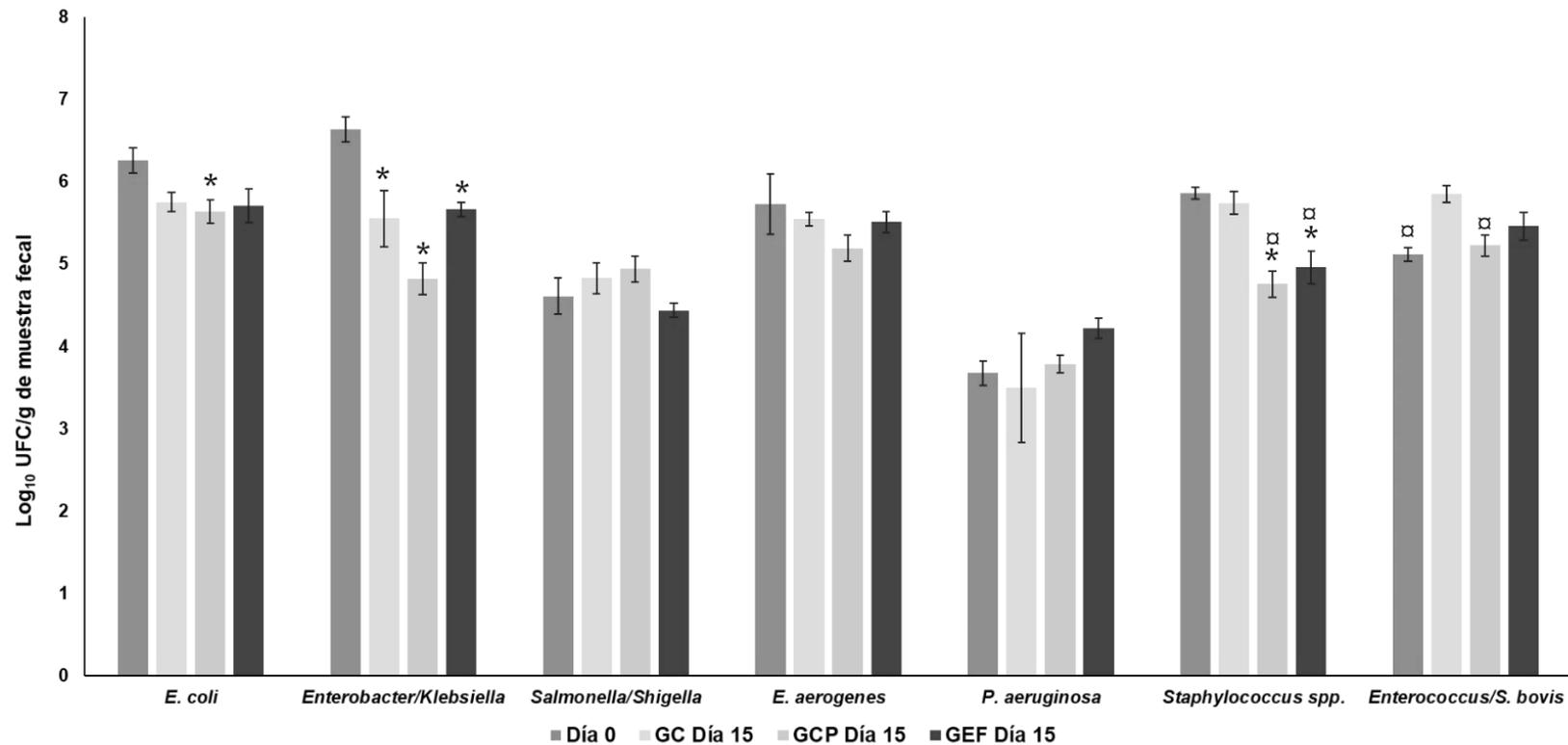


Figura 16. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de microorganismos en medios de cultivo selectivos y diferenciales.

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.

*Estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a GC T_0

□ Estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a GC T_{15}

T_0 = Tiempo de inicio (día 0), T_{15} = Tiempo final (15 días).

(Media \pm ES)

8.3. Análisis de la secuenciación metagenómica

8.3.1. Calidad del material genético

La electroforesis en gel de agarosa es una metodología para separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, y visualizarlos gracias al colorante (Midori Green) añadido al gel y evaluar el grado de degradación del ADN de las muestras (Fierro, 2014). La migración del ADN durante el proceso electroforético se limita por la velocidad de traslado y el tamaño de las moléculas de ADN a través del gel, que, al polimerizarse forma una red tridimensional con poros de distinto tamaño. De esta forma, la separación no únicamente se produce por las diferentes cargas de las moléculas, sino también por las diferencias en tamaño (Ruiz y col., 2017). El colorante de tinción emite fluorescencia verde cuando se une a ADN o ARN. Tiene dos picos de excitación de fluorescencia (~300 nm; ~400 nm) y un pico de excitación fuerte centrado alrededor de 500 nm. Por otro lado, la espectrofotometría UV/Visible nos permite confirmar que existe cantidad suficiente de ADN para la secuenciación. Este método proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de una muestra, sin contaminación de proteínas o disolventes orgánicos que absorben a longitudes de onda cercanas. Para evaluar la pureza de la muestra se determinó la proporción A260/A280 (Tabla 6). Se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor de la relación A260/A280 entre 1.8-2.0; un ADN de pureza aceptable debe ser >1.6, si es <1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas y si es >2.1, podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. Para la secuenciación de las muestras de nuestro estudio, los valores de la relación A260/A280 se encuentran apenas cercanos al límite de calidad (A260/A280 >1.6).

Tabla 6. Cuantificación y pureza del ADN.

Pool	Concentración (ng/μl)	A260/280	A260
GC	152.80	1.45	2.40
GCP	123.90	1.66	0.82
GEF	130.25	1.51	1.54

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
Datos obtenidos por duplicado.

8.3.2. Control de calidad del ADN y preparación de librería

En cada etapa del proceso de secuenciación se reportaron los resultados correspondientes a la evaluación de calidad del ADN de las muestras (concentración medida por fluorimetría), así como el tamaño de amplicón en pb (Tablas 7 y 8, respectivamente).

Tabla 7. Calidad del ADN de las muestras.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Resultado
GC	9.37	*
GCP	9.25	*
GEF	10.07	*

*Continúa el proceso para construcción de la librería.
GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
Datos obtenidos por duplicado.

Tabla 8. Tamaño de amplicón a secuenciar

Muestra	Tipo de librería	Concentración (ng/μL)	Tamaño (pb)	Resultado
GC	Metagenoma amplicon	50.89	605	*
GCP	Metagenoma amplicon	51.62	613	*
GEF	Metagenoma amplicon	51.72	616	*

*Continúa con secuenciación metagenómica.
GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
Datos obtenidos por duplicado.

En ambos casos, se puede observar que el proceso de secuenciación se realizó sin contratiempos, con resultados positivos.

8.3.3. Control de calidad de la secuenciación

La Tabla 9 indica los valores de calidad de la secuenciación. El valor Q está relacionado con el valor *Phred* (refleja la probabilidad de que la base sea correcta en código ASCII) de cada pb, un valor Q más alto indica una alta probabilidad de que el nucleótido asignado sea el correcto (Ewing y Green, 1998).

Tabla 9. Estadísticas de los datos crudos secuenciados.

Muestra	Total de bases leídas (pb) ¹	Lecturas totales ²	GC (%) ³	AT (%) ⁴	Q20 (%) ⁵	Q30 (%) ⁶
GC	68,773,985	228,485	53.433	46.570	91.858	83.375
GCP	61,586,707	204,607	53.226	46.775	91.997	83.599
GEF	65,981,909	219,209	53.490	46.510	91.589	83.078

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS. Datos obtenidos por duplicado.

¹Total de bases leídas: Número total de bases secuenciadas.

²Lecturas totales: Número total de lecturas. Para la secuenciación de extremo pareado (*paired-end*) de Illumina, este valor se refiere a la suma de lectura 1 (forward) y lectura 2 (reverse).

³GC (%): contenido de GC.

⁴AT (%): contenido AT.

⁵Q20 (%): Proporción de bases que tienen una puntuación de calidad de *Phred* de más de 20.

1/100 pb (99% de precisión).

⁶Q30 (%): Proporción de bases que tienen un puntaje de calidad de *Phred* de más de 30.

1/1000 pb (99.9% de precisión).

8.3.4. *Procesamiento y análisis de secuencias*

En total se procesaron 1,791,232 lecturas, se obtuvieron 935,570 secuencias y se ensamblaron 829,750. Se obtuvieron 55,760 contigs y 11,977 OTU. Se clasificaron 708,821 secuencias. Los phyla predominantes resultantes del análisis bioinformático fueron: Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria. Estos dos últimos phyla agrupan a muchos microorganismos productores de LPS, compuesto que desencadena una respuesta inflamatoria y desempeña un papel importante en el desarrollo de enfermedades. En los resultados se muestra que la abundancia de Bacteroidetes y Proteobacteria disminuye levemente en GEF y se mantiene en GCP, en comparación con GC (Figura 17). La Tabla 10 señala la contribución en valores de porcentaje, para ello se hizo la relación con el número de secuencias procesadas con las secuencias asignadas a cada phylum en cada grupo experimental. Estos datos indican los componentes mayoritarios presentes en la microbiota bacteriana intestinal.

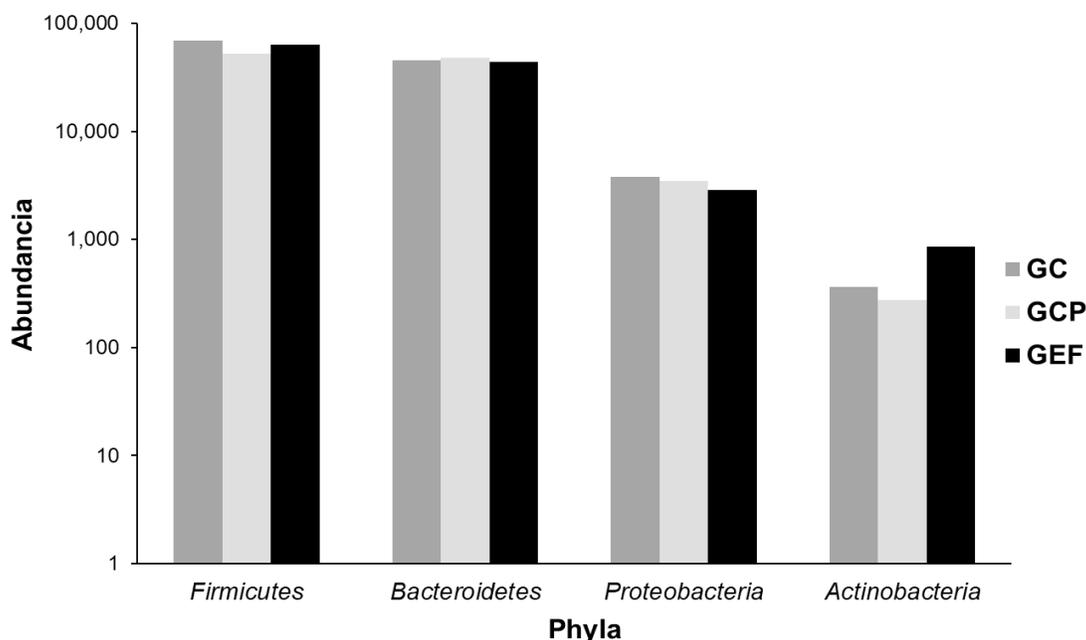


Figura 17. Phyla de la microbiota intestinal.
GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
Datos obtenidos por duplicado.

Tabla 10. Contribución de los phyla predominantes de la microbiota intestinal.

GRUPO	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
GC	57.40%	37.05%	3.18%	0.30%
GCP	49.58%	44.73%	3.24%	0.26%
GEF	55.93%	38.78%	2.55%	0.70%

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
Datos obtenidos por duplicado.

La abundancia asignada al phylum *Actinobacteria* corresponde principalmente a la presencia del género *Bifidobacterium* ($\approx 50\%$). Esto es importante, ya que este género y *Lactobacillus* son conocidos por su efecto como probióticos en la microbiota intestinal (Gomes y Malcata, 1999). En la Figura 18 se muestran géneros microbianos de interés en el presente estudio. Se puede observar que la abundancia de dichos géneros con efecto probiótico en el GEF es mayor respecto con los otros dos grupos experimentales. Bai y col. (2016) reportaron que los principales géneros productores de butirato son *Faecalibacterium*, *Odoribacter*, *Butirycimonas* y *Allobaculum*, aunque también se encuentran microorganismos productores de

butirato en algunas familias del orden de los *Clostridiales*, como *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* (Evans y col., 2014).

El butirato es producto del metabolismo de los FOS, junto con otros ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como acetato y propionato. En las secuencias analizadas, se encontró una abundancia mayor en GEF en al menos tres de los géneros productores de butirato, incluso con respecto a GCP, que fue el grupo experimental al que se le dosificó inulina de achicoria. Se ha descrito que bacterias del género *Phascolarctobacterium* y de la familia *Veillonellaceae* producen altas cantidades de butirato (Lecomte y col., 2015). En los resultados, la abundancia de estos géneros en los grupos experimentales se mantiene prácticamente sin cambios notorios. En el mismo gráfico también puede observarse que los principales géneros productores de LPS, como *Prevotella* y *Enterobacterias* (Madura, 2017), presentan una abundancia elevada en los tres grupos experimentales. En el caso de *Prevotella*, dicho valor fue ligeramente mayor en GCP, mientras que en el caso de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque su abundancia es baja, sobresale GEF con respecto a GCP y GC.

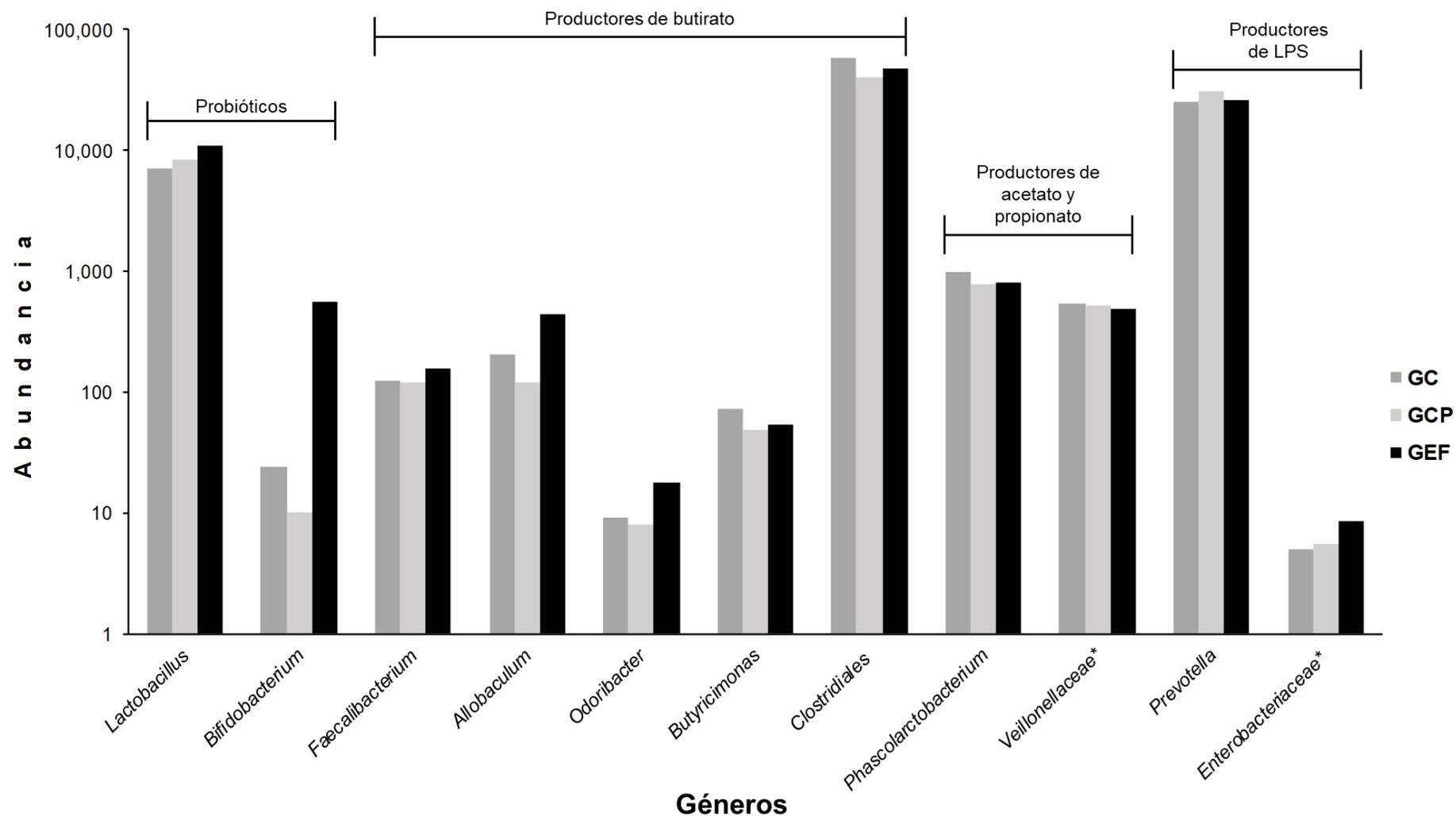


Figura 18. Géneros microbianos de interés presentes en la biota intestinal del modelo de estudio.

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.

Datos obtenidos por duplicado.

Como resultado del procesamiento de las secuencias en QIIME, se obtuvieron mapas de frecuencia de taxa, los cuales se interpretan de acuerdo a la coloración: un grupo experimental con una coloración de negro a verde (cerca del 1) indica que es, de los tres grupos experimentales, el que tiene una mayor abundancia del taxón; un grupo experimental con una coloración en negro (cerca del 0) indica que es el que tiene una abundancia en un valor intermedio y un grupo experimental con una coloración de negro a rojo (cerca de -1) indica que tiene una menor o nula abundancia del taxón. De acuerdo con esta explicación, puede observarse que los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; cuyas especies son *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus hamsteri*, respectivamente, muestran mayor abundancia en GEF y menor o nula en GC y GCP (Figuras 19 y 20). También se encuentran en este caso otros géneros que son productores de AGCC como *Roseburia*, *Papillibacter* o *Succinispira*. La presencia en la microbiota intestinal de especies pertenecientes a los géneros *Roseburia* y *Papillibacter* puede servir como biomarcador de salud, debido a que son productoras de butirato y también pueden ser útiles como probióticos para la restauración de la microbiota intestinal beneficiosa (Tamanai y col., 2017; Wei y col., 2018).

Roseburia inulinivorans es una bacteria anaerobia del colon humano que produce ácido butírico a partir de sustratos como glucosa, almidón o inulina (Scott y col., 2006). Quizás por esta razón es por lo que se observa una mayor abundancia en GEF, mientras que en GC y en GCP es poco frecuente o nula (Figuras 19 y 20). La especie que representa al género *Papillibacter* es *Papillibacter cinnamivorans*, su abundancia de ella es mayor en GCP, seguido de GEF y por último GC, donde la frecuencia es nula (Figuras 19 y 20). La abundancia en GEF de *Succinispira mobilis* es mayor con respecto a GC y GCP; incluso en GCP se muestra como nula (Figuras 19 y 20). Esta especie tiene la capacidad de llevar a cabo la reacción de descarboxilación del succinato a propionato. Este sustrato es otro AGCC y aunque es poco frecuente encontrarlo en las heces, su presencia en el intestino es importante ya que es una fuente de energía constante al sintetizarse ATP en dicha reacción (Janssen y O'Farrell, 1999).

También pueden visualizarse en el mapa géneros asociados con el desarrollo de enfermedades, como *Clostridium*, *Prevotella* y *Helicobacter*. En el caso de *Clostridium* y *Prevotella*, se observa que la abundancia es menor en GEF y GCP y elevada en GC. En el caso del tercer género, *Helicobacter*, la abundancia es elevada en GEF, seguida de GCP y GC. Otro género que afecta negativamente al hospedero es *Clostridium sensu stricto*, que aparece en los resultados con dos especies, una es *Clostridium disporicum* (observada en la Figura 20) y la otra *Clostridium paraputrificum* (Wang y col., 2016). Este género está asociado con el desarrollo de enteritis necrótica y se ha encontrado predominantemente en el yeyuno de pollos (39.1%) (Yang y col., 2019). Sin embargo, en los resultados obtenidos se muestra una abundancia elevada en GEF, seguido de GC y con frecuencia prácticamente nula en GCP. La especie *Anaerobiospirillum thomasi* ha sido descrita como causante de diarrea en humanos, pero no se han informado bacteriemias asociadas a este microorganismo (Streitenberger y col., 2015); en los resultados se observa que la abundancia de este taxón es elevada en GEF y GC, no así en GCP (Figura 20).

Leuconostoc, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, además de *Lactobacillus*, son géneros microbianos que agrupan a bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de ácidos orgánicos y bacteriocinas con actividad antimicrobiana, así como agentes antifúngicos (Kumar y col., 2011). En la Figura 19 aparecen tres de estos géneros mencionados y en la Figura 20 se indica que las especies encontradas son *Pediococcus cellicola* y *Streptococcus agalactiae*. Como puede apreciarse en ambos mapas, la abundancia es elevada en GCP y no en GEF. Por otro lado, se ha reportado que varios géneros bacterianos están involucrados en la degradación de fibra, principalmente *Butyrivibrio*, *Fibrobacter* y *Ruminococcus*. De hecho, especies de los dos últimos géneros son las más fibrolíticas (Krause y col., 1999). Las especies *Ruminococcus lactaris* y *Butyrivibrio crossotus*, que pueden tener dicha capacidad, aparecen en el mapa (Figura 20). En el caso de la primera, se observa abundantemente en GCP, mientras que la segunda es abundante en GEF y GCP.

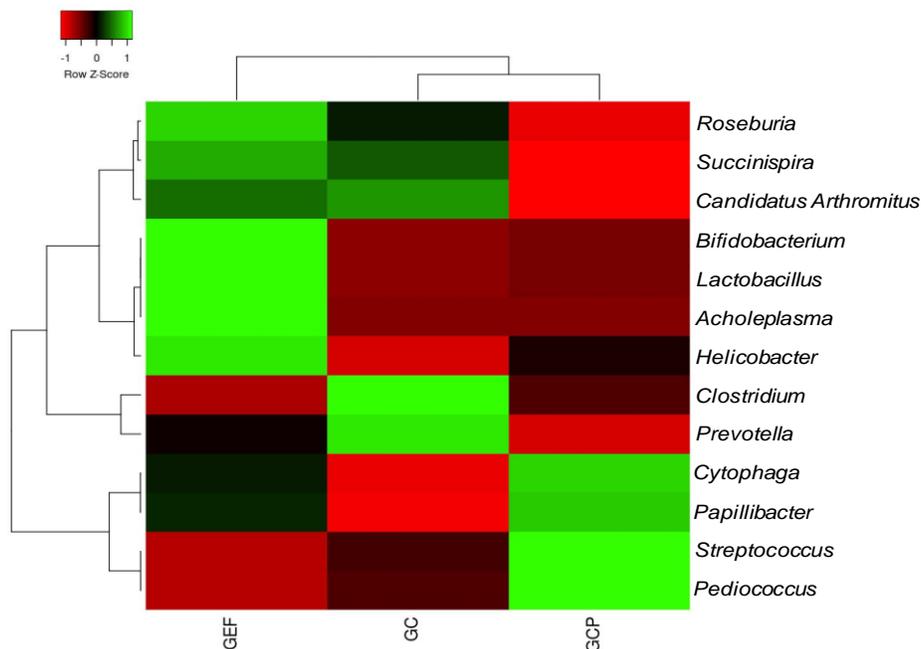


Figura 19. Mapa de frecuencia de géneros.
 GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
 Datos obtenidos por duplicado.

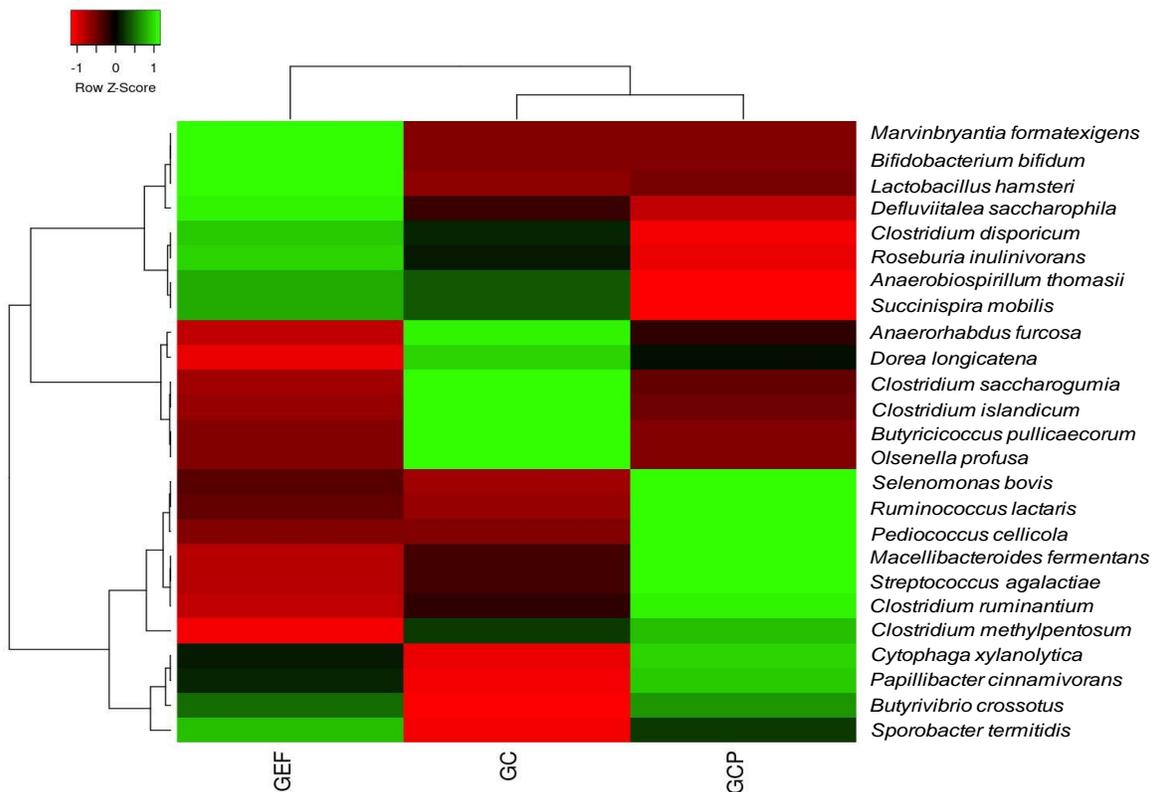


Figura 20. Mapa de frecuencia de especies.
 GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
 Datos obtenidos por duplicado.

La estructura de la inulina de achicoria y de la fructana presente en la fracción de *P. decompositum* contienen fructosa y glucosa unidas por enlaces β -2,1, unión que identifica a los FOS lineales. El enlace glucosídico tipo β está presente en carbohidratos que pueden ser el sustrato para diversos microorganismos que obtienen, a partir de ellos, diferentes tipos de productos finales. Pero averiguar sobre ello en la microbiota intestinal es difícil, ya que como se sabe es un sistema bastante dinámico. Aun así, existen reportes que pueden servir de apoyo. Por ejemplo, *Marvinbryantia formatexigens* es una especie reportada como metabolizadora exclusiva de FOS, que puede estimular el crecimiento de bacterias promotoras de salud (probióticas) (Mao y col., 2015), aunque se ha descrito que los prebióticos de tipo fructanos eran fermentados exclusivamente por bifidobacterias (Kolida y Gibson, 2007). Curiosamente, junto con *B. bifidum* y *L. hamsteri*, *M. formatexigens* encabeza el mapa de especies y, además, las tres especies están presentes con una abundancia elevada únicamente en GEF (Figura 20).

Otras especies importantes han sido descritas, como *Clostridium islandicum*; esta especie degrada celulosa y almidón resistente (Stanley y col., 2013) y *Clostridium saccharogumia* utiliza celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa, sacarosa y salicina como fuentes de carbono y energía (Clavel y col., 2007). Ambos taxones son más abundantes en GC que en GCP y GEF. Otras especies que emplean dicha clase de carbohidratos son *Defluviitalea saccharophila* y *Macellibacteroides fermentans*, las cuales, además de celobiosa, glucosa y manosa, también utilizan lactosa, maltosa, manitol, peptona, ramnosa, rafinosa, sacarosa y xilosa como donantes de electrones y obtienen como productos de fermentación lactato, acetato, butirato e isobutirato (Jabari y col., 2012a y 2012b). Se observa que en GEF hay una mayor abundancia del taxón *D. saccharophila*, seguida de GC y GCP. En el caso de *M. fermentans* se observa lo contrario: hay una mayor abundancia en GCP, luego en GC y nula en GEF.

Con respecto a la predicción funcional del metagenoma (Figura 21), la contribución de GEF parece favorecer fuertemente al ciclo de la urea. Esto resulta muy interesante, ya que niveles altos de AGCC reducen la absorción de amonio debido

a la disociación del amonio a aminas (Wong y col., 2006). Este efecto no se observa en GCP y GC; de hecho, en el caso de GCP, parece favorecerse principalmente la ruta de degradación de glicerol a 1,3-propanodiol. Otras contribuciones de GEF son la degradación de sacarosa IV (sacarosa fosforilasa), la biosíntesis de isopropanol, la ruta de biosíntesis de (r,r)-butanodiol, la ruta de degradación de glicerol a 1,3-propanodiol, la metanogénesis a partir de H₂ y CO₂, la derivación de *bifidobacterias*, la fermentación de succinato a butano, la fermentación de L-lisina a acetato y butanoato y la degradación de L-1,2-propanodiol, como se puede observar a continuación en el mapa de frecuencia.

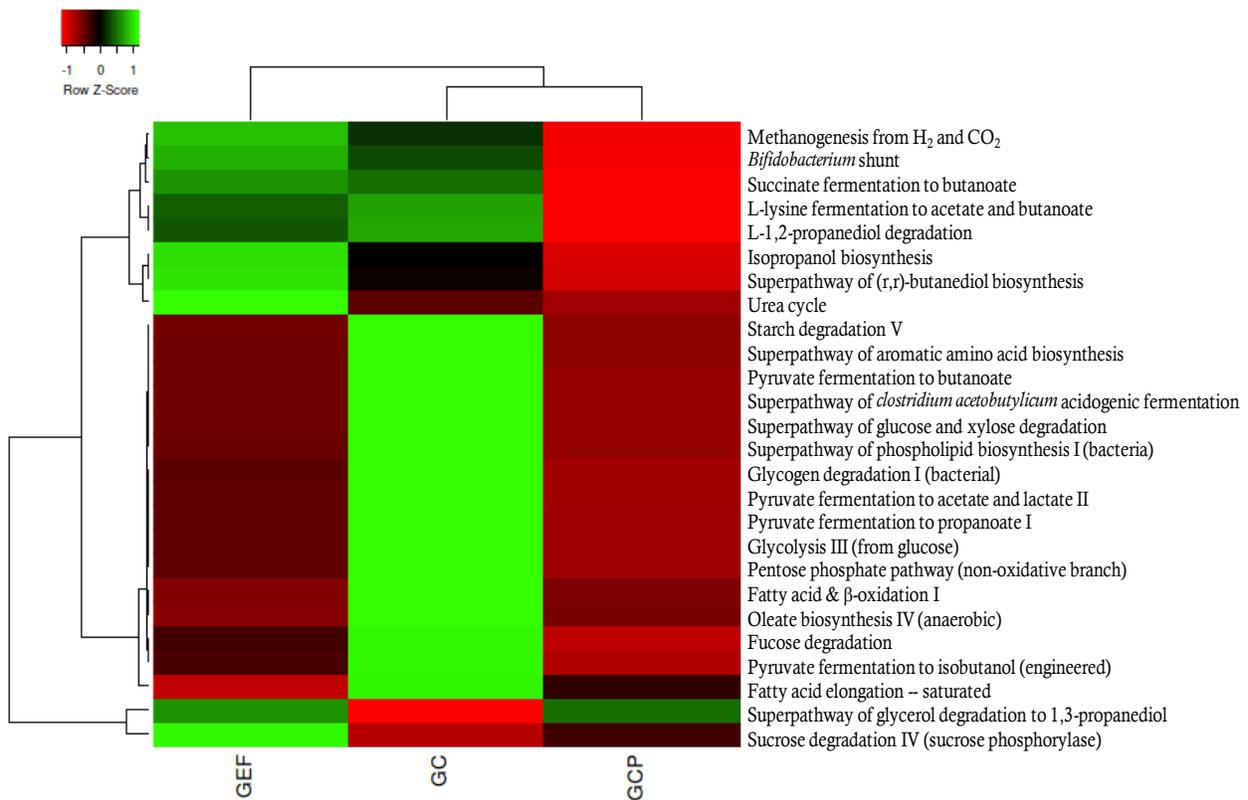


Figura 21. Mapa de frecuencia de la predicción funcional del metagenoma.

GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.

Datos obtenidos por duplicado.

Con base en todos estos resultados, se puede inferir que el efecto de la fracción de FOS de *P. decompositum* se debe a la producción de AGCC por microorganismos probióticos, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y al crecimiento de la especie que metaboliza exclusivamente FOS (*M. formatexigens*), de géneros y especies productores de butirato (como *Faecalibacterium*, *Odoribacter*, *Butirycimonas*, *Allobaculum*, *Roseburia*, *Succinispira*, algunas familias del género de los *Clostridiales*, como *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*) y de especies productoras de butirato a partir de diferentes sustratos (*B. crossotus* y *D. saccharophila*).

El efecto antiinflamatorio de la fracción y la disminución de citocinas inflamatorias antes reportados podría asociarse a que el crecimiento y abundancia de dichos géneros y especies ayudan a mantener la homeostasis intestinal a través de la producción de butirato, el cual, además de estimular la absorción de sodio en los colonocitos disminuye la translocación de LPS, lo que conduce a la inhibición de la activación de macrófagos, la producción de citocinas proinflamatorias y la infiltración de neutrófilos. Además, el butirato como fuente de energía para los colonocitos coadyuva a disminuir la permeabilidad intestinal a microorganismos patógenos y aumenta la sensibilidad a la insulina, a través de la estimulación de la liberación del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y del polipéptido inhibidor gástrico (GIP) (Verdelho y Cortez, 2016), lo que podría justificar el efecto hipoglucémico también reportado.

8.3.5. α y β diversidad

El tamaño adecuado de una muestra puede visualizarse al graficar una curva de rarefacción. Esta gráfica consiste en relacionar el número acumulativo de OTU observados contra el esfuerzo de muestreo (número de lecturas obtenidas en la secuenciación), a esto se le conoce como diversidad alfa (α). Cuanto mayor es la profundidad del muestreo mayor será el número de especies colectadas, y como resultado se obtiene una mayor pendiente en la curva. A medida que se continúa muestreando el número de nuevas especies deja de incrementarse, lo que trae

consigo en una pendiente menor. Una pendiente positiva indica que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para obtener muestras representativas de la totalidad de las secuencias, las pendientes negativas o cero indican lo contrario. Las gráficas se obtienen a partir de la tabla de abundancia de especies (Li y col., 2016). Como puede observarse en la Figura 22, las curvas correspondientes a GC, GCP y GEF alcanzaron eventualmente una asíntota en el valor de OTU de la comunidad, razón por la cual puede considerarse que el muestreo fue completo y que abarca la mayor diversidad taxonómica existente en cada uno de los grupos experimentales.

La diversidad α resume la diversidad de organismos de una muestra anotada en un solo número, este se estima a partir de la distribución de las anotaciones a nivel de especie. La riqueza de especies anotadas es el número de anotaciones de especies distintas en el conjunto combinado de datos, lo que se conoce como diversidad específica o índice de Shannon, el cual es un promedio ponderado por la abundancia del logaritmo de las abundancias de especies anotadas. Las anotaciones a nivel de especie provienen de todas las bases de datos de fuentes de anotaciones utilizadas por el servidor MG-RAST. La Figura 23 indica estos resultados para GC, GCP y GEF. Por otro lado, UniFrac es una medida de diversidad beta (β) que utiliza información filogenética para comparar muestras, junto con técnicas estadísticas multivariadas estándar, incluido el análisis de componentes y coordenadas principales (PCA y PCoA, respectivamente), identifica factores que explican las diferencias entre las comunidades microbianas (Lozupone y col., 2011). En la Figura 24 se muestra el gráfico de PCA, el cual indica que GEF y GCP, tienen similitud, pero no son iguales en cuanto a su diversidad. Puede observarse también que ambos difieren con respecto a GC.

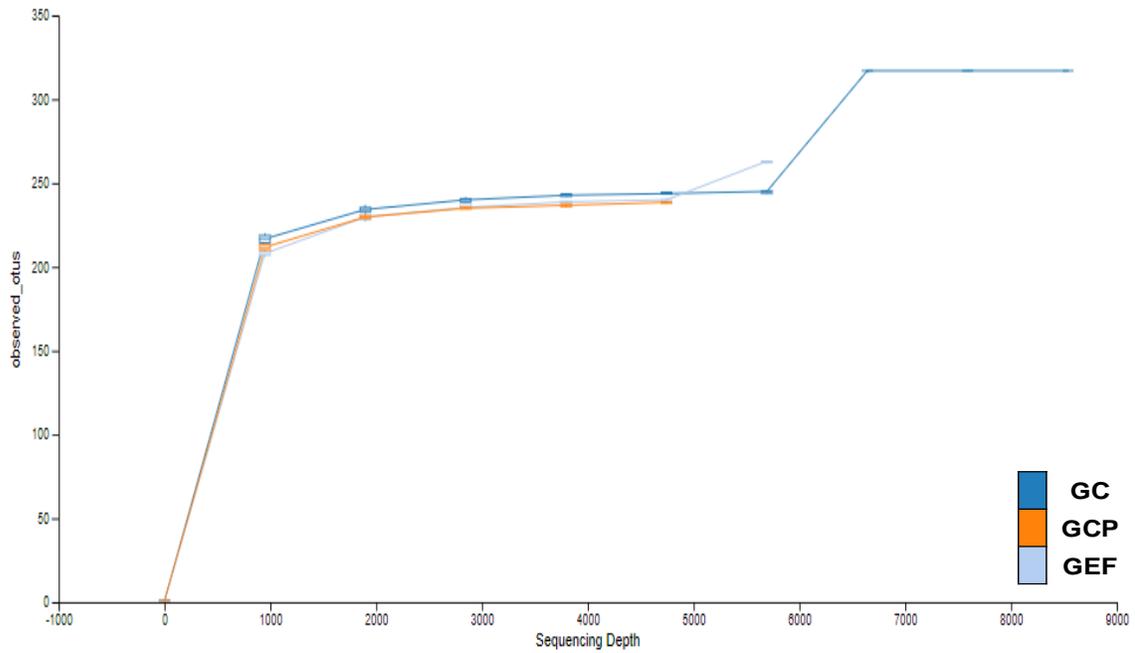


Figura 22. Gráfico de las curvas de rarefacción.
 GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
 Datos obtenidos por duplicado.

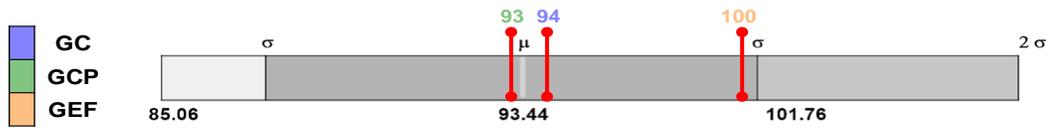


Figura 23. Diversidad α de cada conjunto de datos.
 Se muestran los valores mínimo, máximo y medio, con los rangos de desviación estándar (σ y 2σ).
 GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
 Datos obtenidos por duplicado.

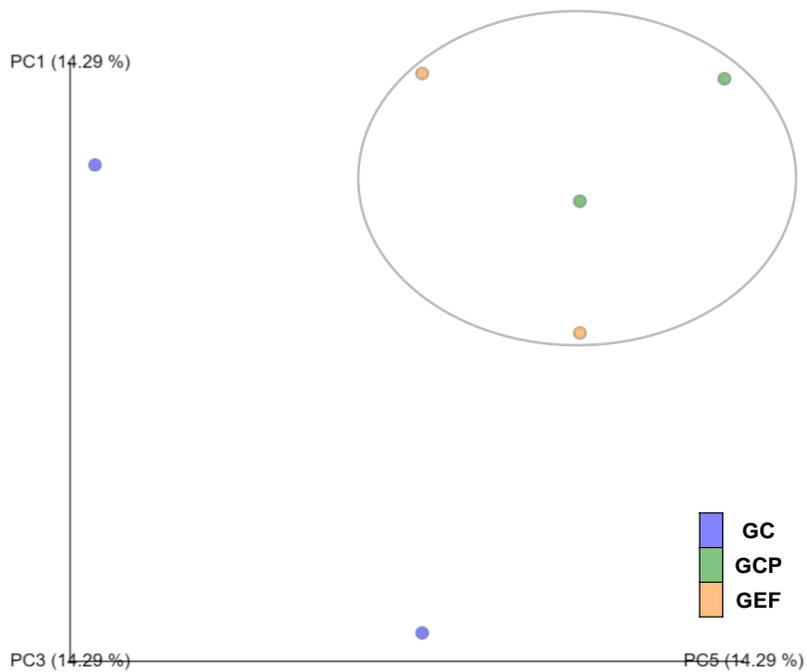


Figura 24. Gráfico de PCA a nivel de especie.
 GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
 Datos obtenidos por duplicado.

El que los resultados de los estudios microbiológico y de secuenciación dirigida del gen marcador ARNr 16S no sean exactamente iguales (por ejemplo, porque en el primero se observó la presencia de un microorganismo y en la asignación taxonómica no), puede deberse a diferentes factores, como errores experimentales durante el cultivo en placa o bien, por el “sesgo de profundidad”, ya que en ecosistemas complejos como la microbiota intestinal (que consta de $\approx 10^{12}$ bacterias por gramo de heces), los estudios metagenómicos actuales no pueden detectar bacterias en concentraciones de $<10^5$ bacterias/g (Lagier y col., 2015). Por tal motivo se realizaron los análisis de diversidad α y β , para aportar confiabilidad en los análisis de ARN 16S basados en OTU y garantizar la reproducibilidad en la investigación.

8.4. Efecto de la fracción de FOS sobre el peso y el consumo de alimento y agua

Durante el estudio, los animales ganaron peso: en el GC aumentó en promedio 9.41 g (\uparrow 3.02%), seguido del GEF con una ganancia promedio de 9.09 g (\uparrow 2.89%) y, por último GCP, cuya ganancia fue de 7.94 g en promedio (\uparrow 2.56%). En la Figura 25 se puede apreciar esta tendencia, con el registro del peso promedio de los animales de experimentación al inicio y el peso promedio al final del estudio.

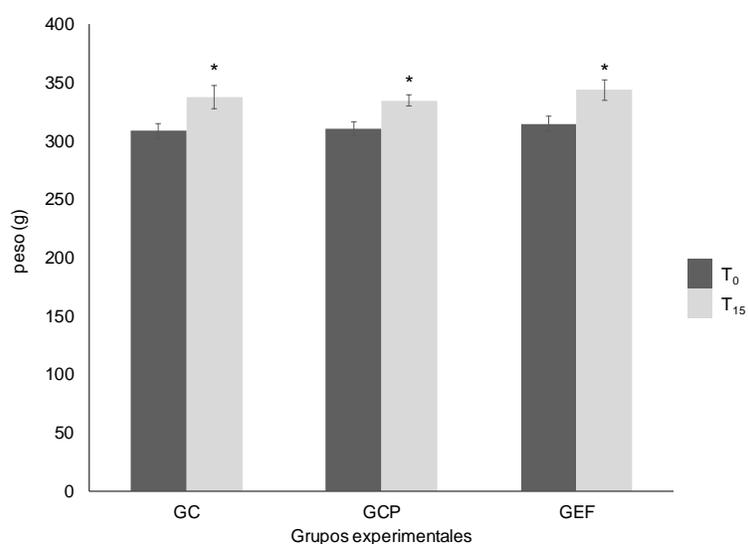


Figura 25. Efecto de los tratamientos sobre el peso.
GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
*Estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a T₀.
T₀= Tiempo de inicio (día 0), T₁₅= Tiempo final (15 días).
(Media \pm ES)

Es bien sabido que la microbiota intestinal desempeña un papel importante en la homeostasis energética y, de hecho, se cree que los cambios en la composición microbiana intestinal son un factor causal importante en el desarrollo de obesidad. Estudios metagenómicos confirman que la microbiota intestinal en sujetos obesos es más eficiente que en los sujetos delgados para recuperar la energía de los componentes dietéticos resistentes (Turnbaugh y col., 2006; Krajmalnik y col., 2012). Incluso se ha demostrado que la proporción de *Firmicutes/Bacteroidetes* aumenta en las personas obesas en comparación con las personas delgadas y

tiende a disminuir con la pérdida de peso (Angelakis y col., 2012; Koliada y col., 2017). Otros phyla como *Actinobacteria* (que agrupa al género *Bifidobacterium*) también pueden desempeñar un papel en el aumento de peso y la obesidad (Koliada y col., 2017). En nuestro estudio existe una relación evidente entre la composición de la microbiota intestinal con el aumento de peso observado en GCP y GEF, principalmente por la contribución del phylum *Firmicutes* y también con la abundancia de géneros como *Bifidobacterium*, *Clostridium* e incluso *Lactobacillus* (Angelakis y col., 2012; Wang y col., 2019). A su vez, el aumento de peso puede deberse a la presencia de acetato, otro AGCC que se produce a partir de la fermentación bacteriana y que se considera obesogénico (Wang y col., 2019).

En la Figura 26, se observa que el consumo de alimento se mantiene constante en el GEF, seguido del GCP y GC. Respecto al consumo de agua (Figura 27), se observa que es mayor y constante primero en el GEF, luego en GCP y GC, donde la variación que se observa es mínima, es decir, se mantuvieron prácticamente iguales a lo largo del estudio. En ambos graficos se observa también un aumento pronunciado en los primeros días del estudio, provocado, quizá, por una reacción de estrés en los animales.

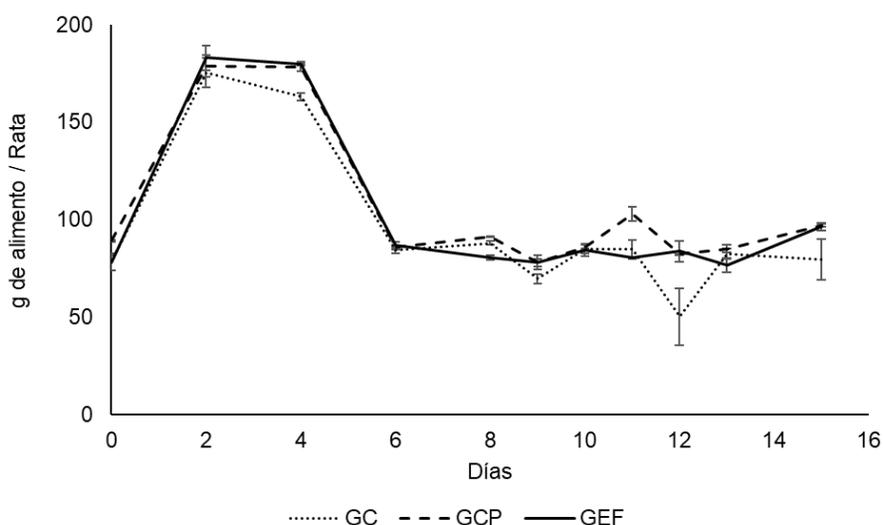


Figura 26. Efecto de los tratamientos sobre el consumo de alimento.
 GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
 *Estadísticamente significativo ($p < 0.05$).
 (Media \pm ES)

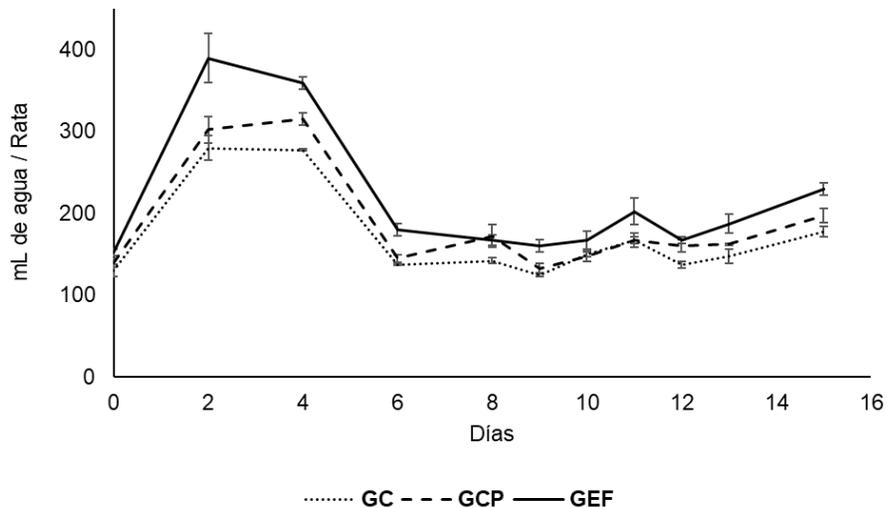


Figura 27. Efecto de los tratamientos sobre el consumo de agua.
 GC: grupo control, GCP: grupo control positivo, GEF: grupo experimental FOS.
 *Estadísticamente significativo ($p < 0.05$).
 (Media \pm ES)

Las razones por las que se observa una tendencia de mayor consumo de agua en GEF que en los otros grupos experimentales y una poca variabilidad en el consumo de alimento, en comparación con los otros grupos (GC y GCP), podrían estar también relacionadas con los AGCC. Por un lado, éstos están involucrados en la absorción de agua y sodio en el colon (Kleessen y col., 2001; Ochoa, 2013), por lo que los animales de experimentación de este grupo requirieron de mayor cantidad. Los AGCC también pueden regular el apetito y la ingesta de alimento a través de la mediación del sistema endocrino, pueden modular la actividad neuronal y los reflejos viscerales directamente a través de receptores expresados en las neuronas del nervio periférico, autónomo y somático. Sin embargo, aunque aún no se sabe si es solamente un compuesto o una combinación de AGCC lo que provoca la regulación del apetito, al parecer el propionato induce la regulación del apetito a corto plazo a través de los mecanismos mediados por PYY (péptido YY) y GLP-1 (Morrison y Preston, 2016), de ahí que la ingesta de alimento fue constante durante el estudio en GCP y GEF.

9. Conclusiones

- La fracción de FOS de *P. decompositum* y la inulina de achicoria, mostraron disminución significativa sobre el crecimiento de microorganismos patógenos en medio de cultivo Müeller-Hinton y sobre el crecimiento de hongos y levaduras en Medio de cultivo Papa Dextrosa.
- El hongo identificado en la biota intestinal de ratas sanas es *C. albicans*.
- Se caracterizó la biota intestinal de ratas sanas mediante el análisis microbiológico por cultivo en placa y por secuenciación del gen marcador ARNr 16S.
- La fracción de FOS de *P. decompositum* mejora la abundancia de géneros microbianos considerados como benéficos, así como de géneros microbianos probióticos y de géneros productores de butirato en la microbiota intestinal de ratas sanas.
- El efecto puede estar mediado por la producción de AGCC, principalmente butirato, y también por el crecimiento de microorganismos probióticos que estimulan el crecimiento de microorganismos, coadyuvando a mantener la homeostasis intestinal.
- Las curvas correspondientes a GC, GCP y GEF en el gráfico de rarefacción alcanzaron eventualmente una asíntota en el valor de OTU de la comunidad (diversidad α), por lo que puede considerarse que el muestreo fue completo y que se abarcó la mayor diversidad taxonómica o riqueza de especies filogenéticas, existente en cada uno de los grupos experimentales.
- De acuerdo con el gráfico de PCA el diseño del modelo experimental fue adecuado: por un lado, la inulina de achicoria y la fracción de FOS de *p. decompositum* tienen similitud, pero no son iguales en cuanto a su riqueza y ambos difieren con respecto al grupo al que se le administró la SSI (diversidad β).
- Los análisis de diversidad aportan confiabilidad en los análisis de ARN 16S basados en OTU y garantizan la reproducibilidad en la investigación.

-
- La fracción de FOS de *P. decompositum* tiene un efecto parecido a la inulina de achicoria, la cual ha sido reportada con efecto prebiótico al ser sustrato de microorganismos probióticos como *Bifidobacterias* y *Lactobacillos*.
 - El efecto antiinflamatorio e hipoglucémico puede deberse a la fermentación sacarolítica o al efecto prebiótico de la fructana de GP 8 presente en la fracción PAM de *P. decompositum*.

10. Perspectivas

- Realizar un estudio subagudo o crónico para la administración de la fracción de FOS de *P. decompositum* e inulina de achicoria, empleando un modelo experimental de animales sanos y con alguna enfermedad inducida como obesidad, diabetes o colitis.
- Medir parámetros bioquímicos y citocinas. Integrar análisis metabólico.
- Realizar secuenciación metagenómica de gen marcador ARN 16S (V3-V4) o metagenómica *shotgun* (V1-V9) para obtener un perfil de funciones metabólicas con mayor estimación de confianza.
- Realizar secuenciación del ARNr 18S (espacio transcrito interno ITS, por sus siglas en inglés) de hongos y levaduras.
- Realizar estudios celulares de la interacción entre los AGCC butirato y propionato con LPS bacteriano.
- Definir el grado de pureza de la fracción PAM para poder conocer la concentración de la fructana en el extracto.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y reológicas de la fracción de FOS de *P. decompositum*, para la obtención de un producto o ingrediente con aplicación tecnológica.
- Evaluación fisicoquímica, biológica y sensorial del producto/ingrediente obtenido.

11. Bibliografía

A

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5721-5732.
- Aßhauer, K., Wemheuer, B., Daniel, R., Meinicke, P. (2015). Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882-2884.
- Agnihotri, S., Wakode, S., Agnihotri, A. (2010). An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(2), 150-167.
- Alarcón, A. F., Jiménez, E. M., Reyes, C., R., González, P. B., Contreras, W. C., Román, R. R. (2000a). Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(3), 207-215.
- Alarcón, A. F., Jiménez, E. M., Reyes, C. R., Román, R. R. (2000b). Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 21-27.
- Anaya, A. L., Hernández, B. E., Torres, B. A., León, C. J., Jiménez, E. M. (1996). Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell (Asteraceae), matarique or maturin. *Journal of chemical ecology*, 22(3), 393-403.
- Angelakis, E., Armougom, F., Million, M., Raoult, D. (2012). The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiology*, 7(1), 91-109.

B

- Bäckhed, F. (2011). Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(Suppl. 2), 44-52.
- Bai, J., Zhu, Y., Dong, Y. (2016). Response of gut microbiota and inflammatory status to bitter melon (*Momordica charantia* L.) in high fat diet induced obese rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 717-726.
- Bandara, H. M., Lam, O. L. T., Watt, R. M., Jin, L. J., Samaranyake, L. P. (2010). Bacterial lipopolysaccharides variably modulate *in vitro* biofilm formation of *Candida* species. *Journal of medical microbiology*, 59(10), 1225-1234.
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., Pérez, P.G., Blaser, M. J., Relman, D. A. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 732-737.
- Bressa, C., Bailén, A. M., Pérez, S. J., González, S. R., Pérez, M., Montalvo, L. M. G., Maté, M. J. L., Domínguez, R., Moreno, D., Larrosa, M. (2017). Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLoS One*, 12(2).
- Bronner, I. F., Quail, M. A., Turner, D. J., Swerdlow, H. (2014). Improved protocols for Illumina Sequencing. *Current Protocols in human genetics*, 80, Capítulo 18-2.
- Brown, V. I., Lowbury, E. J. (1965). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical pathology*, 18(6), 752-756.

C

- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C., Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.
- Cani, P. D., Delzenne, N. M. (2009). Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6), 737-743.
- Castillo, A. J. I., Gómez, V. J. C., Rojano, V. N. A., Mendoza, C. M., Jiménez, E. M., López, V. H., Martínez, C. H., Gutiérrez, J. R., González, E. C., Reyes, C. R., Arrieta, C. I. (2018). Chemoinformatic Analysis of Selected Cacalolides from *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell and *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. and their effects on FcεRI-dependent degranulation in mast cells. *Molecules*, 23(12), 3367.
- Cavalcante, S. L., Galvão, J., Silva, J., Sales, N. J., Rodrigues, M. S. (2015). Obesity-driven gut microbiota inflammatory pathways to metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*, 6, 341.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O'Reilly, M., Jeffery, I. Wood, M. R., Kerins, D. M., Quigley, E., Ross, R. P., O'Toole, P., Molloy, M., Falvey, E., Shanahan, F., Cotter, P. (2014). Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*, 63(12), 1913-1920.
- Clavel, T., Lippman, R., Gavini, F., Doré, J., Blaut, M. (2007). *Clostridium saccharogumia* sp. nov. and *Lactonifactor longoviformis* gen. nov., sp. nov., two novel human faecal bacteria involved in the conversion of the dietary

phytoestrogen secoisolariciresinol diglucoside. *Systematic and Applied* Microbiology*, 30(1), 16-26.

- CONABIO (2020). Desert Indianbush. *Psacalium decompositum*. <http://enciclovida.mx/especies/180418> (acceso 04.03.2020).
- Conterno, L., Fava, F., Viola, R., Tuohy, K. M. (2011). Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease?. *Genes & nutrition*, 6(3), 241.
- Corrêa, O. R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*, 5(4), e73.

D

- Dahiya, D. K., Puniya, M., Shandilya, U. K., Dhewa, T., Kumar, N., Kumar, S., Puniya, A., Shukla, P. (2017). Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. *Frontiers in microbiology*, 8, 563.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Bäckhed, F., Cani, P. D. (2011). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(11), 639.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340.
- Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R. D., Cotter, P., Dinan, T., Cryan, J. F. (2015). Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: implications for brain and behaviour. *Brain, behavior, and immunity*, 48, 165-173.
- Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., Relman, D. A. (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in ecology & evolution*, 21(9), 517-523.

-
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology*, 6(11).

E

- Eisenberg, E., Bogokowsky, B., Altmann, G. (1981). Bacterial growth on Mueller Hinton medium sterilized by γ -radiation. *The International journal of applied radiation and isotopes*, 32(12), 891-893.
- Evans, C. C., LePard, K. J., Kwak, J. W., Stancukas, M. C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y., Leone, V., Antonopoulos, D. A., Smith, D., Chang, E. B., Ciancio, M. J. (2014). Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PloS One*, 9(3).
- Ewing, B., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. *Genome research*, 8(3), 186-194.

F

- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- Fraher, M.H., O'toole, P.W., Quigley, E.M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(6), 312-322.
- Fuentes, Z. E., Sánchez, Z. E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández, L. J., Pérez, A. J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch-Stärke*, 63(7), 406-415.
- Fukuda, S., Ohno, H. (2014). Gut microbiome and metabolic diseases. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 36, No. 1, pp. 103-114). Springer Berlin Heidelberg.

G

- Garavito, A., González, M. A., Mosquera, R. J., Álvarez, Y. A., López, A. D., Cristancho, A. M. A. (2017). Biodiversidad latinoamericana y sus perspectivas de estudio con tecnologías 'ómicas'. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(2), 98-129.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Gil, C. K., Ginés, I., Pinent, M., Ardévol, A., Blay, M., Terra, X. (2016). Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity. *Nutrition Research Reviews*, 29(2), 234-248.
- Gimeno, C.E. (2004). Alimentos prebióticos y probióticos: la polémica científica sobre sus beneficios. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(5), 90-98.
- Gomes, A. M., Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157.
- González, C.R., Ruiseco, S.G. (2017). La microbiota del humano. *Revista Ciencia*, 68(2), 60-66.
- González, S. A., Watson, R., Preedy, V. (2008). The use of herbal medicines by Mexican Americans in the USA: risk/benefits?. In *Botanical Medicine in Clinical Practice* (pp. 130-137). CAB International Cambridge MA.
- Graf, D., Di Cagno, R., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., Watzl, B. (2015). Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microbial ecology in health and disease*, 26(1), 26164.
- Greiner, T., Bäckhed, F. (2011). Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(4), 117-123.
- Grigorescu, I., Dumitrascu, D. L. (2016). Implication of gut microbiota in diabetes mellitus and obesity. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 12(2), 206.

-
- Guerrero, T.G., Álvarez, B.C. (2017). Efectos de la microbiota intestinal y sistema inmune en el trasplante. *Diálisis y Transplante*, 38, 25-33.
 - Guida, S., Venema, K. (2015). Gut microbiota and obesity: involvement of the adipose tissue. *Journal of Functional Foods*, 14, 407-423.
 - Guinane, C., Cotter, P. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(4), 295-308.

H

- Harwani, D. (2013). The great plate count anomaly and the unculturable bacteria. *Microbiology*, 2(9), 350-351.
- Hernández, L. I. O., Huber, D., Luévanos, E. M., Hernández, T. F., Sáenz, M. J., Balagurusamy, N. (2014). Metagenómica: Concepto y Aplicaciones en el mundo microbiano. *Fronteras en Microbiología Aplicada*, 185-207.
- Hernández, U. M. A., Alvarado, N. A. (2001). Interleucinas e inmunidad innata. *Revista biomédica*, 12(4), 272-280.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., Tashiro, Y. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria and microflora*, 5(1), 37-50.
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., Nakatsu, C. H. (2017). Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and environments*, ME17017.

I

- Ignacio, A., Morales, C. I., Saraiva, C. N. O., Ribeiro, A. R. (2016). Innate sensing of the gut microbiota: modulation of inflammatory and autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 7, 54.

J

- Jabari, L., Gannoun, H., Cayol, J. L., Hamdi, M., Fauque, G., Ollivier, B., Fardeau, M.L. (2012a). Characterization of *Defluviitalea saccharophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, and proposal of Defluviitaleaceae fam.

nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 550-555.

- Jabari, L., Gannoun, H., Cayol, J.L., Hedi, A., Sakamoto, M., Falsen, E., Ohkuma, M., Hamdi, M., Fauque, G., Ollivier, B., Fardeau, M. L. (2012b). *Macelibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(10), 2522-2527.
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome biology*, 17(1), 239.
- Janssen, P.H., O'Farrell, K.A. (1999). *Succinispira mobilis* gen. nov., sp. nov., a succinate-decarboxylating anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1009-1013.
- Jiménez, E. M., Reyes, C. R., Ramírez, A. T., Lledias, F., Hansberg, W., Arrieta, D., Alarcón, A. F. J. (2006). Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1-2), 34-38.
- Jiménez, E. M., Merino, A. H., López, F. A., Rojano, V. N., Román, R. R., Alarcón, A. F. J. (2011). Chemical characterization and evaluation of the hypoglycemic effect of fructooligosaccharides from *Psacalium decompositum*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 8, 12.

K

- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 321-335.
- Kato, K.A., Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi, H.H., Suda, K., Ishikawa, H., Gondo, Y., Shimizu, K., Matsuki, T., Kushiro, A., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Kuwano, Y., Rokutan, K. (2016). Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota preserves the

diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(12), 3649-3658.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones, H. S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kennedy, K., Hall, M. W., Lynch, M. D., Moreno, H. G., Neufeld, J. D. (2014). Evaluating bias of Illumina-based bacterial 16S rRNA gene profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5717-5722.
- Kleessen, B., Hartmann, L., Blaut, M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*, 86(2), 291-300.
- Kolida, S., Gibson, G. (2007). Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition*, 137(11 Suppl), 2503S-2506S.
- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., Vaiserman, A. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiology*, 17(1), 120.
- Kotzampassi, K., Giamarellos, B. E., Stavrou, G. (2014). Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. *ISRN obesity*, 2014.
- Krause, D. O., Dalrymple, B.P., Smith, W.J., Mackie, R.I., McSweeney, C.S. (1999). 16S rDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiology*, 145(7), 1797-1807.
- Krajmalnik, B. R., Zehra, E. I., Dae, W. K., DiBaise, J. K. (2012). Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutrition in Clinical Practice*, 27(2), 201-214.

-
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., Knight, R. (2012). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current protocols in microbiology*, 27(1), 1E-5.
 - Kumar, B., Balgir, P. P., Kaur, B., Garg, N. (2011). Cloning and expression of bacteriocins of *Pediococcus* spp.: A review. *Archives of Clinical Microbiology*, 2(3), 4.
 - Kumari, M., Kozyrskyj, A. L. (2017). Gut microbial metabolism defines host metabolism: an emerging perspective in obesity and allergic inflammation. *Obesity Reviews*, 18(1), 18-31.

L

- Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B., Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 237-264.
- Lakhtin, M., Alyoshkin, V., Lakhtin, V., Afanasyev, S., Pozhalostina, L., Pospelova, V. (2010). Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* clinical strains: new class of the pathogen biofilm destructors. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 2(3), 186-196.
- Lambert, J. E., Myslicki, J. P., Bomhof, M. R., Belke, D. D., Shearer, J., Reimer, R. A. (2015). Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40(7), 749-752.
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepille, D. E., Thurber, V. R., Beiko, R. G., Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, 31(9), 814.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., Van Den Berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Abu Al-Soud, W. M., Sørensen, S. J., Hansen, L. H.,

-
- Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one*, 5(2).
- Lecomte, V., Kaakoush, N. O., Maloney, C. A., Raipuria, M., Huinao, K. D., Mitchell, H. M., Morris, M. J. (2015). Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PloS one*, 10(5).
 - Li, H., Li, T., Beasley, D. E., Heděnc, P., Xiao, Z., Zhang, S., Li, J., Lin, Q., Li, X. (2016). Diet diversity is associated with beta but not alpha diversity of pika gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1169.
 - Li, M., van Esch, B. C., Wagenaar, G. T., Garssen, J., Folkerts, G., Henricks, P. A. (2018). Pro-and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 831, 52-59.
 - Lotz, M. J., Tamplin, M. L., Rodrick, G. E. (1983). Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine vibrio organisms. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 13(1), 45-48.
 - Lozupone, C., Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228-8235.
 - Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*, 5(2), 169-172.

M

- Madura, L.J. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151(4), 363-374.
- Mao, B., Li, D., Zhao, J., Liu, X., Gu, Z., Chen, Y. Q., Zhang, H., Chen, W. (2015). *In vitro* fermentation of fructooligosaccharides with human gut bacteria. *Food & Function*, 6(3), 947-954.

-
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V. D., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., Furet, J. P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 9(1), 123.
 - Menne, E., Guggenbuhl, N., Roberfroid, M. (2000). Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1197-1199.
 - Merino, A. H., Arrieta, B. D., Jiménez, E. M., Magos, G. G., Hernández, B. R., Susunaga, N. C., Almanza, P. J., Blancas, F. G., Román, R. R., Alarcón, A. F. (2014). Effect of fructooligosaccharides fraction from *Psacalium decompositum* on inflammation and dyslipidemia in rats with fructose-induced obesity. *Journal of Nutrients*, 6, 591-604.
 - Merriman, B., Ion Torrent R&D Team, Rothberg, J. M. (2012). Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, 33, 3397-3417.
 - Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R.A. (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9, 386.
 - Mora, R.B. (2016). Actividad anti-inflamatoria de compuestos sesquiterpénicos aislados de *Psacalium decompositum* (Gray) Rob. & Brett. en modelo de TPA y en la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana.
 - Moreno, A. M. J., Martínez, J. A. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 25, pp. 29-39).
 - Moreno, M. J. A., Hernández, L. J. C., Urcuqui, I. S. (2014). La estimulación de TLR, receptores tipo NOD y dectina-1 en neutrófilos humanos induce la producción de citocinas proinflamatorias. *Iatreia*, 27(2), 135-146.

-
- Morrison, D. J., Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189-200.
 - Mossel, D. A., Mengerink, W. H., Scholts, H. H. (1962). Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, 84(2), 381.
 - Mueller, M., Reiner, J., Fleischhacker, L., Viernstein, H., Loeppert, R., Praznik, W. (2016). Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. *Journal of Functional Foods*, 24, 264-275.

N

- Navas, M. J. A., Peralta, S. J. M., González, A., McMurdie, P. J., Vázquez, B. Y., Xu, Z., Ursell, L., Lauber, C., Zhou, H., Song, S. J., Huntley, J., Ackermann, G., Berg, L., D., Holmes, S., Caporaso, G., Knight, R. (2013). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods in enzymology* (Vol. 531, pp. 371-444). Academic Press.
- Netea, M. G., van der Meer, J. W. (2011). Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *New England Journal of Medicine*, 364(1), 60-70.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they?. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1402S-1406S.

O

- Ochoa, C. (2013). La biota intestinal, el metabolismo energético, y la Diabetes mellitus. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 23(1), 113-129.
- Olsen, C., Qaadri, K. (2014). Geneious R7: a bioinformatics platform for biologists. In *International Plant and Animal Genome Conference Xxii*.

P

- Palau, R. M., Tulipani, S., Queipo, O.I., Urpi, S. M., Tinahones, F. J., Andres, L. C. (2015). Metabolomic insights into the intricate gut microbial–host

interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Frontiers in microbiology*, 6, 1151.

- Parada, V. D., de la Fuente, M., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H., Nico, F. K., Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in immunology*, 10.
- Pei, Z., Bini, E. J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., Blaser, M. J. (2004). Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4250-4255.
- Peshev, D., Van den Ende, W. (2014). Fructans: prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods*, 8, 348-357.
- Pusceddu, M. M., El Aidy, S., Crispie, F., O'Sullivan, O., Cotter, P., Stanton, C., Kelly, P., Cryan, J. F., Dinan, T. G. (2015). N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) reverse the impact of early-life stress on the gut microbiota. *PLoS one*, 10(10).

Q

- Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T. P., Davenport, R. J., Hall, N., Head, I. M., Read, L. F., Sloan, W. T. (2009). accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *nature methods*, 6(9), 639.

R

- Ramos, L. V., Rivero, B. R., Piqueras, R. J. A., García, L. L. J., Oblitas, G. L. A. (2008). Psiconeuroinmunología: Conexiones entre sistema nervioso y sistema inmune. *Suma Psicológica*, 15(1), 115-142.
- Ravimannan, N., Arulanantham, R., Pathmanathan, S., Niranjana, K. (2014). Alternative culture media for fungal growth using different formulation of protein sources. *Annals of Biological Research*, 5(1), 36-39.
- Rhoads, A. Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13, 278-289.
- Ribera, C. J. M. (2017). Centenario de Elie Metchnikoff (1845-1916). *Educación Médica*, 18(2), 136-143.

-
- Rivero, S. I. O. (2011). Actividad hipoglucemiante y caracterización química de fracciones del extracto metanólico de *Psacalium decompositum*. Tesis de Maestría, Universidad de Sonora.
 - Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A., Gibson, G. R. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of Nutrition*, 128(1), 11-19.
 - Rodicio, M. R., Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
 - Rojo, L. V., Aguilar, C. D., Prado, G. H., Carlos, R. A., López, G. J. S. (2012). Participación de los patrones moleculares asociados al daño en el tratamiento convencional del cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 64(3), 275-283.
 - Ruiz, M. V., Garrote, S. H., Díaz, A. C., Fernández, M. L., Amor, V. A. M. (2017). Electroforesis capilar para el análisis de marcadores oncohematológicos en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 33(3), 114-116.

S

- Sánchez, Z. N. A., Giono, C. S., & Maldonado, B. C. (2010). Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. *Salud Pública de México*, 52(5), 447-454.
- Scott, K. P., Martin, J. C., Campbell, G., Mayer, C. D., Flint, H. J. (2006). Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium "*Roseburia inulinivorans*". *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4340-4349.
- Sebastián, D. J. J., Sánchez, S. C. (2018). De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51-56.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435.

-
- Smuckler, S. A., Appleman, M. D. (1964). Improved *Staphylococcus* medium no. 110. *Applied and Environmental Microbiology*, 12(4), 355-359.
 - Stanley, D., Geier, M. S., Denman, S. E., Haring, V. R., Crowley, T. M., Hughes, R. J., Moore, R. J. (2013). Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Veterinary Microbiology*, 164(1-2), 85-92.
 - Streitenberger, E. R., Chavez, C. M., Rizzo, M. S., Suarez, A.I. (2015). Bacteriemia por *Anaerobiospirillum thomasii* con desenlace fatal. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 328-330.
 - Suárez, R. G., Perera, C. A., Clapés, H. S., Fernández, R. T., Egaña, M. E. (2013). Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. *MediSur*, 11(5), 569-573.

T

- Tagliabue, A., Elli, M. (2013). The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(3), 160-168.
- Tamanai, S. Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Bing, F. S., Bonnaure, M. M., Jolivet, G. A. (2017). *Roseburia* spp.: a marker of health?. *Future Microbiology*, 12(2), 157-170.
- Tappenden, K. A., Mcburney, M. I. (1998). Systemic short-chain fatty acids rapidly alter gastrointestinal structure, function, and expression of early response genes. *Digestive diseases and sciences*, 43(7), 1526-1536.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444(7122), 1027.

V

- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., Verstraete, W. (2004). Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(1), 143-153.

-
- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., Verstraete, W. (2007). Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 452-460.
 - Verdelho, M. M., Cortez, P. H. (2016). Diet, microbiota, obesity, and NAFLD: a dangerous quartet. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 481.

W

- Wang, F. (2015). Temporal modulation of gut microbiome and metabolome by morphine. Tesis de Doctorado. University of Minnesota.
- Wang, J. J., Wang, J., Pang, X. Y., Zhao, L. P., Tian, L., Wang, X. P. (2016). Sex differences in colonization of gut microbiota from a man with short-term vegetarian and inulin-supplemented diet in germ-free mice. *Scientific Reports*, 6, 36137.
- Wang, Y., Leong, L. E., Keating, R. L., Kanno, T., Abell, G. C., Mobegi, F. M., Choo, J. M., Wesselingh, S. L., Mason, A. J., Burr, L. D., Rogers, G. B. (2019). Opportunistic bacteria confer the ability to ferment prebiotic starch in the adult cystic fibrosis gut. *Gut Microbes*, 10(3), 367-381.
- Wei, X., Tao, J., Xiao, S., Jiang, S., Shang, E., Zhu, Z., Qian, D., Duan, J. (2018). Xiexin Tang improves the symptom of type 2 diabetic rats by modulation of the gut microbiota. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.
- Weinstock, G. M. (2012). Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, 489(7415), 250-256.
- Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L., Segars, W. I. (2002). Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *Journal of environmental quality*, 31(4), 1286-1293.
- Wong, J. M., De Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(3), 235-243.

-
- Wynne, E. S., Rode, L. J., Hayward, A. E. (1942). Mechanism of the selective action of eosin-methylene-blue agar on the enteric group. *Stain Technology*, 17(1), 11-20.

Y

- Yang, W. Y., Lee, Y., Lu, H., Chou, C. H., Wang, C. (2019). Analysis of gut microbiota and the effect of lauric acid against necrotic enteritis in *Clostridium perfringens* and *Eimeria* side-by-side challenge model. *PloS One*, 14(5), e0205784.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Priesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló, M. R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.
- Yiu, J. H., Dorweiler, B., Woo, C. W. (2017). Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism. *Journal of Molecular Medicine*, 95(1), 13-20.

Z

- Zaldívar, O. M. (2002). El sistema inmunológico de las mucosas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(5), 352-354.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Ansorge, W. (1988). Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS letters*, 233(2), 432-436.
- Artículo periodístico “Agonía y resurrección del doctor Moreno”, de El País, disponible en:
https://elpais.com/elpais/2020/06/03/eps/1591176610_393962.html?fbclid=IwAR0U5cVG9oIKGPCWNRfZiQXRum77zxHdai0QogGxsQL3sMNMbKB0xXo2ktw

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS DE DIVULGACIÓN.



CERTIFICATE

of Appreciation

Awarded to

Guadalupe Juárez

Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

for presenting a poster on

**Prebiotic Effect of a Fraction Rich in Fructooligosaccharides
of *Psacalium decompositum***

for participating at

2nd International Conference on

Traditional Medicine, Phytochemistry and Medicinal Plants (TMedPM-2019)

Sept 30, 2019 - Oct 02, 2019 • Berlin, Germany



Sudhakar Yakkanti, PhD
Associate Vice President

USG-United Scientific Group
(A Non-profit Scientific Organization)



La División de Ciencias Biológicas y de la Salud y el Posgrado en Biotecnología

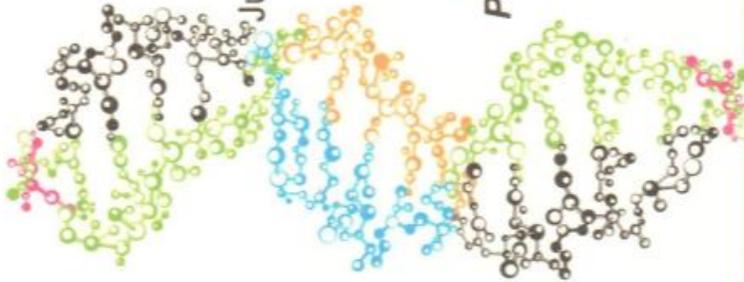
otorgan la constancia de participación en el

8° Simposio: Perspectivas en Biotecnología

a

Juárez M. G, Fernández F.J., Canales M, Campos J., Jasso I., Fortis A.,
Almanza J., Alarcón F.J.

por el cartel



UNA FRACCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS OBTENIDA DE PSACALIUM DECOMPOSITUM MEJORA LA BIOTA INTESTINAL EN RATAS SANAS

Ciudad de México, a 6 de septiembre de 2019

Sara L. Camargo Ricaide
Directora de la División de CBS

Luis Enrique Gómez Quiroz
Coordinadora Divisional de Posgrado

Gabriela M. Rodríguez Serrano
Coordinadora del Posgrado en Biotecnología



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00273

Matricula: 2173801924

Efecto sobre la microbiota bacteriana intestinal de una fracción de fructooligosacáridos de la raíz de *Psacalius decempositus*



MARIA GUADALUPE JUAREZ PEREZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

VOCAL

MTRA. EDUARDO ZURIGA LEON

SECRETARIO

DRA. MARIA MARGARITA CANALES MARTINEZ

Con base en la legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 1 del mes de julio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
MTRA. EDUARDO ZURIGA LEON
DRA. MARIA MARGARITA CANALES MARTINEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIA GUADALUPE JUAREZ PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.