



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Centro de Investigación y Asistencia en  
Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.



***CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVIDUOS EN DIFERENTES  
ETAPAS DE VIDA Y SU RELACION CON EFECTOS CLINICO Y NUTRICIONALES  
OBSERVADOS CON DEL CONSUMO DE STEVIA***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica**

**PRESENTA:**

**LN. Blanca Elizabeth Ruíz Álvarez.**

**Directora:**

**Dra. Marisela González Avila**

**Co-director:**

**Dr. Jorge Bravo Madrigal**

**Asesores:**

**Dr. Abel Ortega Gutiérrez**

**Dra. Monserrat Álvarez Zavala**

**Guadalajara, Jalisco a 08 de Enero del 2017.**



## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

A mis padres, Remberto Ruiz Machuca y Olivia Álvarez González, por formarme desde el día que nací, por todo su amor, apoyo incondicional y exigencia.

A mi padre, por enseñarme el valor de la palabra y la necesidad de perfeccionarnos a diario.

A mi madre, por su calidez, su consuelo y su fe.

A mis directores y asesores, por apoyarme durante este trayecto, compartiéndome sus conocimientos, experiencias y ayudarme a ser mejor persona.

A Marisela González Ávila, por su exigencia, su perseverancia, su alegría y sobre todo su amistad. Gracias por dirigir este trabajo, gracias por trabajar en mi formación que ha ido desde lo profesional, cultural, personal y hasta espiritual.

A mi novio, José Cisneros Aguilar, por su apoyo incondicional y por mostrarme que en verdad no hay fuerza más grande que el amor.

A mis hermanos, Juan, Rosa y Claudia, por enseñarme tanto de la vida, por la dicha de compartir la misma familia, por nuestra amistad. Los adoro.

A Elena Pulido y Ana Sofía, por su gran apoyo y calidez durante mi estancia de investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Rudy, Nadxeli, Ricardo, Jorge y Melissa, por su apoyo, por las risas, por compartir su conocimiento y trabajo en equipo, gracias por hacer el trabajo tan ameno.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ) por el financiamiento de este proyecto por medio del Programa de Posgrados de Calidad.

## I. ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. Resumen</b>	<b>6</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>7</b>
<b>3. Antecedentes</b>	<b>11</b>
<b>4. Planteamiento del problema</b>	<b>15</b>
<b>5. Justificación</b>	<b>16</b>
<b>6. Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>7. Objetivos</b>	<b>19</b>
<b>8. Metodología</b>	<b>20</b>
<b>9. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>10. Discusión de los resultados</b>	<b>41</b>
<b>11. Conclusiones</b>	<b>45</b>
<b>12. Perspectivas</b>	<b>45</b>
<b>13. Referencias</b>	<b>46</b>
<b>14. Anexos</b>	<b>56</b>

## II. ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS Y/ O FIGURAS

Tabla 1. Concentraciones de esteviósidos.	24
Tabla 2. Poblaciones y parámetros a evaluar.	25
Tabla 3. Volúmenes de reacción recomendados y concentraciones finales de GoTaq PCR Core.	28
Tabla 4. Guías de ciclos térmicos para la amplificación de PCR.	28
Tabla 5. Cepas de referencias y sus condiciones de crecimiento.	38
Tabla 6. Resultados de la evaluación antropométrica	39
Figura 1. Perfil de microbiota de población Lactante menor	31
Figura 2. Perfil de microbiota de población Primera infancia	31
Figura 3. Perfil de microbiota de población Preescolar	32
Figura 4. Perfil de microbiota de población Adulto joven	33
Figura 5. Evaluación <i>ex vivo</i> del consumo de <i>stevia</i> en Primera infancia	34
Figura 6. Evaluación <i>ex vivo</i> del consumo de <i>stevia</i> en Preescolares	35
Figura 7. Evaluación <i>ex vivo</i> del consumo de <i>stevia</i> en Adulto Joven	36
Figura 8. Cinética de crecimiento de Bifidobacterias con medio modificado	37
Figura 9. Cinética de crecimiento de Lactobacilos con medio modificado	37

### III. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

OMS	Organización Mundial de la Salud
TLR-4	Receptor tipo Toll 4
LPS	Lipopolisacárido
LITAF	Factor de Necrosis Tumoral inducido por LPS
ADA	American Dietetic Association
RET	Requerimiento Energético Total
JECFA	Comité Conjunto de Expertos de la FAO y OMS
GRAS	Generally Recognized as Safe
IMC	Índice de Masa Corporal
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
TSC	Tryptose Sulfite Cycloserine
BSM	Bifidus Selective Medium
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ATCC	American Type Culture Collection
CA	Colon ascendente
CT	Colon transversal
CD	Colon descendente
D. O.	Densidad óptica
ECBA	Enfermedad Crónica Basada en Adiposidad

## 1. RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar la microbiota intestinal de poblaciones mexicanas en las diferentes etapas de vida y determinar los cambios en la microbiota intestinal autóctona en poblaciones estudiadas.

Se estudió la microbiota intestinal de individuos en las siguientes etapas de vida: lactantes mayores (6 a 12 meses de edad); primera infancia (13 mes a 3 años); preescolares (3 años 1 mes a 6 años) y adulto joven (20 años 1 mes a 35 años).

Los participantes fueron evaluados nutricionalmente, obteniéndose parámetros para adaptar el sistema de digestión *ex vivo* ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System) con el fin de evaluar la digestibilidad de *stevia* sobre el perfil de microbiota de cada población.

Los resultados de los perfiles de microbiota coinciden en su mayoría con los reportes de otros países, sin embargo, el género *Bifidobacterium* se encuentra presente en mayor abundancia en adultos mexicanos. La evaluación *ex vivo* del consumo de *stevia* mostró una disminución significativa del género *Bifidobacterium* en las tres poblaciones estudiadas (primera infancia, preescolar, y adulto joven).

Se desconoce la vía de acción por la cual disminuye este género de microorganismos, sin embargo se continuará estudiando.

## 2. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016, la población mexicana presentó una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en mujeres y hombres adultos de 70.5% y 72.1% respectivamente.. Disminuyendo un 1.3% del 2012 al 2016. De 1988 a 2012, el sobrepeso en adultos se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2%<sup>1</sup>. Por esta razón, se considera importante identificar nuevos factores relacionados con el desarrollo de la obesidad para llevar a cabo las estrategias integrales de intervención que hagan más efectivo el combate a este problema.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que la causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas<sup>2</sup>, sin embargo se considera una enfermedad multifactorial, en la cual influyen aspectos genéticos, ambientales, hormonales, dietéticos y psicológicos entre otros.

En el 2014, la American Association of Clinical Endocrinologists, y el American College of Endocrinology determinaron que el término más adecuado para describir la obesidad como enfermedad crónica es “Enfermedad Crónica Basada en Adiposidad” (ECBA), ya que el diagnóstico tradicional no es suficientemente adecuado para determinar todos los procesos fisiopatológicos asociados y que no debe basarse en el índice de masa corporal (IMC)<sup>3</sup>.

Por otro lado, en los últimos años se ha encontrado que la microbiota intestinal tiene una influencia determinante en procesos fisiológicos, metabólicos e inmunitarios del cuerpo humano, y que sus características determinarán el estado de salud de un individuo<sup>4,5,6,7,8,9</sup>.

La microbiota intestinal se define como la comunidad de microorganismos vivos, residentes en el tracto gastrointestinal, la cual se encuentra en diferente variedad y concentración siendo menor en la boca, hasta la parte más distal del colon donde existe mayor concentración y variedad de microorganismos<sup>5</sup>.

Estudios recientes sobre el proyecto del microbioma humano en pacientes obesos han detectado una disminución de *Bacteroidetes* y un incremento proporcional de



Firmicutes<sup>5,6</sup>. Otros reportes han documentado la disminución del género *Bifidobacterium* y de *Akkermansia muciniphila*, los cuales aportan un efecto protector y anti-inflamatorio a partir de la producción de butirato y de mucina intestinal, importantes para el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal<sup>7</sup>.

El género *Bifidobacterium* se ha considerado muy importante por sus funciones en el huésped, entre las cuales se encuentran la producción y liberación de vitaminas del complejo B, antioxidantes, polifenoles, entre otros compuestos; la maduración del sistema inmune y su homeostasis durante las primeras etapas de la vida; en la conservación de la barrera intestinal respecto a su función, por ejemplo, *B. infantis* produce factores solubles que incrementan la expresión de ocludina (proteína que participa en la formación de complejos “tight junctions”)<sup>10</sup>; protección contra patógenos, por medio de la producción de bacteriocinas, la acidificación del pH luminal por su producción de ácidos grasos, inhibición de la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal<sup>11, 12</sup>.

Otros reportes, relacionan microorganismos patógenos como *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli*, y *Staphylococcus aureus* con la inflamación en la patogénesis de la obesidad<sup>8</sup>.

Por otro lado, diversos reportes sobre el estudio del microbioma humano en diferentes países y en grupos de edad específicos. Han registrado cambios en la microbiota intestinal asociados a la edad del individuo. Dihn y colaboradores, realizaron un análisis longitudinal de la microbiota intestinal de 10 niños con desnutrición y 10 niños eutróficos de 3 a 24 meses en el Sur de la India, en el cual reportan un incremento significativo de Bacteroidetes entre los 12 y los 24 meses de edad. Sin embargo, en general se encontró que los géneros más abundantes fueron *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Veillonellas*, *Akkermansia*, *Megasphaera*, *Eubacterium* y *Haemophilus*.<sup>13</sup>

Otro estudio, en Noruega, investigó la ecología microbiana del tracto gastrointestinal de cuatro individuos.<sup>14</sup>

Existe una asociación entre los cambios en la composición de la microbiota intestinal y la pérdida de la barrera intestinal; el incremento en la permeabilidad del epitelio intestinal conlleva a un aumento de la translocación bacteriana, el reflejo de dicho

evento patogénico se asocia a un aumento en las concentraciones plasmáticas de lipopolisacárido, al ser el lipopolisacárido un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) e inducir la activación del sistema inmune, promueve un aumento de la inflamación sistémica y local. La inflamación a su vez ha sido correlacionada con el desarrollo de enfermedades metabólicas como obesidad y síndrome metabólico<sup>9</sup>.

Se ha reportado que la presencia de algunos patrones microbianos, que actúan como endotoxinas intestinales pueden promover el inicio de la cascada de señalización del receptor TLR-4 se encuentra involucrado en el desarrollo y progresión de enfermedades crónicas<sup>15</sup>. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  inducido por LPS, también conocido como LITAF, es una pequeña membrana proteica integral de lisosoma y endosoma tardío; es expresada principalmente en monocitos/ macrófagos y bazo, la deficiencia de esta proteína tiene un efecto dramático sobre la respuesta inflamatoria crónica sistémica y local. Esta proteína tiene un papel muy importante conectando el estado inflamatorio con obesidad y otros desórdenes asociados. Se ha reportado que su expresión en monocitos periféricos humanos se correlaciona con obesidad, resistencia a la insulina y niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias<sup>16</sup>.

Por otro lado, el uso de edulcorantes no calóricos ha sido una estrategia utilizada para disminuir el consumo de calorías. Éstos han ganado popularidad ya que al ser reducidos en calorías representan una “ventaja” metabólica sobre los edulcorantes calóricos, tomando en cuenta que su uso implica reducciones en el costo, en la ingestión calórica y en la percepción de beneficios a la salud respecto al control de peso y a la normalización de glucosa sanguínea<sup>17</sup>.

Por otro lado, los edulcorantes se han definido como aditivos alimentarios capaces de mimetizar el efecto dulce del azúcar y que, habitualmente, aportan menor energía. La sacarina fue el primer edulcorante descubierto hace más de 120 años. A partir de este descubrimiento, han surgido gran cantidad de aditivos, enfocados a proveer el sabor dulce de los alimentos. El empleo de edulcorantes no calóricos como sustitutos de todo o parte del contenido en azúcares de comidas y bebidas, ha tenido su máxima expansión en los últimos 35 años<sup>18</sup>.

Según los lineamientos de la American Dietetic Association (ADA), los consumidores pueden disfrutar de manera segura un rango de edulcorantes naturales y artificiales en una dieta guiada por las recomendaciones federales de nutrición actuales<sup>190</sup>; misma postura que presenta la Academy of Nutrition and Dietetics con respecto al uso de estos aditivos<sup>20</sup>. Por otro lado, la OMS recomienda que el consumo diario de azúcares añadidos sea  $\leq 10\%$  del Requerimiento Energético Total (RET)<sup>21</sup>.

Uno de los edulcorantes que ha ganado popularidad en los últimos años es la *Stevia*, la cual es obtenida de las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, originaria de Paraguay. A partir de este edulcorante se han aislado gran cantidad de glucósidos, sin embargo, los más comunes son los esteviosidos y el rebaudiósido A. El poder edulcorante de *stevia* es 200 veces mayor que la sacarosa<sup>22</sup> por lo que se considera un edulcorante bajo en calorías (0.2kcal/g).

De acuerdo al el Comité Conjunto de Expertos de la FAO y OMS (JECFA), los glucósidos de *stevia* son seguros para el consumo humano como ingrediente no farmacológico en una dosis de hasta 4mg/ Kg/ día<sup>23</sup>; además, en el 2011 fueron aprobados por la Comisión Europea para su consumo en alimentos y bebidas<sup>24</sup>. En Estados Unidos de América, los glucósidos de *stevia* altamente purificados han sido clasificados como GRAS por sus siglas en inglés (Generally Recognized as Safe)<sup>25</sup>.

Estudios sobre los efectos de otros edulcorantes muestran efectos importantes sobre el metabolismo del consumidor. En un estudio *in vivo*, en el cual se dio seguimiento a ratones a los que se les administró agua con diferentes fuentes de edulcorantes no calóricos comerciales como sacarina, sucralosa y aspartame, se demostró que el consumo crónico de estos aditivos exacerbaba la intolerancia a la glucosa significativamente, con respecto del grupo control<sup>26</sup>.

Otro estudio demostró que el consumo de *stevia* reducía significativamente los niveles de glucosa e insulina en sangre, con respecto del consumo de sacarosa y aspartame en humanos<sup>27</sup>.

El consumo de estos aditivos ha incrementado considerablemente en los últimos años, ya sea como medida de prevención o control de enfermedades crónicas degenerativas como la ECBA y diabetes, o como estrategia para mantener un peso adecuado. Dicha estrategia se ha basado en que debido a que estos edulcorantes

suelen ser reducidos en calorías o a que su poder edulcorante es mayor al de la sacarosa y se requiere utilizar menor cantidad.

Sin embargo, existen estudios donde demuestran que algunos edulcorantes no calóricos son reconocidos por los mismos receptores de los edulcorantes calóricos y que pueden tener un efecto sobre la adipogénesis y la supresión de la lipólisis<sup>28</sup>. Así como otros estudios han mostrado efectos sobre la modificación de la microbiota intestinal<sup>26</sup>.

### 3. ANTECEDENTES

El consumo de edulcorantes no calóricos data desde tiempos remotos, por ejemplo, la sacarina fue el primer edulcorante artificial no calórico descubierto, hace más de 120 años, el cual es utilizado actualmente<sup>18</sup>.

De acuerdo a estudios realizados por la ADA, desde el 2004 se determinó que el consumo de edulcorantes no calóricos puede ofrecer a los consumidores el placer de disfrutar el sabor dulce con un menor o casi nulo aporte energético, por lo que estos aditivos podían ser utilizados como estrategia para el control de peso, control de la glicemia y la prevención de caries dentales<sup>19</sup>.

Por otro lado, se evaluaron *in vitro*, glucósidos de *stevia* como fuente de carbono de microorganismos, concluyendo que éstos pueden ser utilizados de manera limitada como fuente de carbono por *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*, y que su uso como prebiótico no ha sido confirmado tanto para rebaudiósido A como para una mezcla de glucósidos de esteviol<sup>29</sup>.

Diferentes estudios han registrado la toxicidad de algunos edulcorantes no calóricos. Entre los efectos tóxicos registrados se encontraron enzimas hepáticas elevadas, cefalea, náuseas, vómito, diarrea, sequedad en la boca, entre otros, en una etapa aguda; mientras que en un consumo crónico manifestó relación con linfomas, leucemias, genotoxicidad, bajo peso al nacer, hepatotoxicidad, entre otros<sup>30</sup>.

En el 2009, Figlewicz y colaboradores reportaron un estudio donde evaluaron el consumo de fructosa de diferentes fuentes: agave y maíz, comparándolo con *stevia* en un modelo murino, y encontraron que las concentraciones de colesterol sérico fueron más altas en el grupo de jarabe de maíz de alta fructosa, mientras que las

concentraciones de triglicéridos se presentaron en el grupo de agave. El análisis histopatológico hepático no presentó anomalías para ninguno de los grupos, sin embargo, la alanina aminotransferasa sérica fue más alta en el grupo de jarabe de maíz de alta fructosa. No hubo diferencias significativas en el peso corporal entre grupos, por lo que concluyen que el consumo crónico de fructosa se relaciona con la aparición de cambios desfavorables en el perfil lipídico, sin tener efectos sobre el peso corporal<sup>31</sup>.

Otro estudio mostró en un modelo murino que la ingesta de alimentos y líquidos que contenían edulcorantes no calóricos se acompañaba de una mayor ingesta de alimentos, por consecuencia un aumento de peso corporal, acumulación de grasa y una compensación calórica más débil, comparado con el grupo control que consumía alimentos y líquidos con glucosa. Concluyendo que los efectos del consumo de edulcorantes como la sacarina pueden asociarse con la disminución en la capacidad de evocar respuestas térmicas a través del sabor dulce, reflejos fisiológicos entre otros aspectos que ayudan a mantener el equilibrio energético<sup>32</sup>.

Tomando en cuenta que el consumo excesivo de azúcares en bebidas endulzadas, es un factor importante en el desarrollo de la obesidad, se evaluó el efecto de las precargas de diferentes edulcorantes (*stevia*, aspartame y sacarosa) sobre la ingesta de alimentos, la saciedad y los niveles de glucosa e insulina posprandial, en 19 individuos adultos sanos (IMC entre 20.0 y 24.9 kg/m<sup>2</sup>) e individuos obesos (IMC entre 30.0 y 39.9 kg/m<sup>2</sup>) a quienes se les administraron precargas de *stevia* y aspartame (290 kcal) o sacarosa (493 kcal) antes del almuerzo y la cena, registrando el consumo calórico y los niveles de hambre y saciedad después de cada comida. Encontrando que ningún grupo compensó las kcal consumiendo más en sus almuerzos y cenas, y que los niveles de hambre y saciedad no difirieron entre los grupos. Sin embargo, la glicemia posprandial en el grupo de *stevia* fue significativamente menor comparada con el grupo de sacarosa, así como la insulinemia posprandial fue significativamente menor en el grupo con *stevia* versus aspartame y sacarosa<sup>33</sup>.

En el 2010, una revisión sobre la funcionalidad de algunos edulcorantes reporta que son pocos los ensayos aleatorizados y pequeños, realizados en población pediátrica,

y que en éstos no se encontraron asociaciones entre el consumo de edulcorantes no calóricos y cambios de peso. Sustentan que esos estudios no fueron diseñados con ese objetivo, y que por ello, no tienen el suficiente valor estadístico. Determinan también que no existe evidencia suficiente para determinar un uso benéfico o neutral de estos aditivos en la obesidad y diabetes, particularmente, la mayor parte de la evidencia se presenta en modelos animales por lo que propusieron impulsar la investigación en humanos<sup>34</sup>.

En el 2011, se realizó un estudio en humanos, doble ciego con placebo, con 12 participantes sanos a quienes se les administró una infusión intragástrica de glucosa y fructosa u otro edulcorante (aspartame, acesulfame k y sucralosa) o agua. Posteriormente, otros 4 participantes recibieron una infusión intragástrica del análogo de azúcar no dulce ni metabolizable (2-desoxi-D-glucosa). Se encontró que la glucosa estimuló la secreción de GLP-1 y PYY y redujo la ghrelina, la cual es una hormona metabólica que promueve la conservación de la energía regulando el apetito y el gasto de energía<sup>35</sup> en plasma en ayuno, mientras que la fructosa fue menos efectiva, a pesar de que ambos azúcares aumentaron la saciedad en comparación con el agua. De manera contraria, los edulcorantes no calóricos no afectaron la secreción de ambos péptidos (GLP-1 y PYY) con efectos mínimos sobre el apetito. Mientras que 2-desoxi-D-glucosa incrementó los índices del apetito, sin efectos sobre GLP-1, PY y grelina. Por lo que la secreción de GLp-1 , PYY y grelina dependen además de la detección del dulzor, de la analogía estructural con la glucosa<sup>36</sup>.

Se han publicado algunos trabajos de revisión donde ya se toma en cuenta el papel de la microbiota intestinal reportan que efectivamente existe poca investigación sobre el impacto de la modulación dietética en la microbiota intestinal mediada por el consumo de edulcorantes. Sin embargo, se muestran evidencias que sugieren que el consumo crónico de edulcorantes, particularmente fructosa, condicionan la microbiota intestinal, lo que promueve un microbioma con capacidad metabólica alterada, causando una disbiosis con pérdida de genética microbiana y diversidad filogenética y, a su vez, promoviendo un metabolismo adaptativo que genera fuentes

de energía adicionales para el huésped, tiempos de tránsito intestinal modificados, facilitando una mayor extracción de energía proveniente de la dieta<sup>37</sup>.

En el 2014, Suez y colaboradores, demuestran en un modelo murino, que el consumo crónico de edulcorantes como sacarina, sucralosa y aspartame, comparados con agua, glucosa y sacarosa, impulsa el desarrollo de la intolerancia a la glucosa mediante alteraciones en la microbiota intestinal en su función y composición y que las vías metabólicas microbiana alteradas por los edulcorantes están relacionadas con la susceptibilidad del huésped a enfermedades metabólicas, sin embargo, concluyen que sus resultados exigen una reevaluación a mayor escala y en humanos<sup>3</sup>.

Este mismo grupo de trabajo, en el 2015 habla acerca de la asociación entre consumo a corto plazo de *stevia* en ratas y la ganancia de peso, a pesar de que aún se desconocen los mecanismos. Así como de otros edulcorantes alcoholes del azúcar que interactúan con a microbiota intestinal<sup>38</sup>.

En el 2015 se publica el primer reporte sobre microbiota intestinal en población mexicana, donde se evaluaron 1042 niños de 6 a 14 años, encontrando un perfil de abundancia relativa alta en Firmicutes y baja en Bacteroidetes relacionando estos parámetros con el consumo de dietas altas en carbohidratos y grasas saturadas<sup>39</sup>.

De manera general, diferentes grupos de investigación han propuesto que el consumo de azúcares en la dieta está relacionado con el desarrollo de obesidad y enfermedades crónicas, y que la composición cualitativa de los carbohidratos ingeridos es importante por el efecto sobre el metabolismo de la fructosa y la glucosa en el organismo. Y que de acuerdo a las encuestas dietéticas aplicadas, la mayoría de la población consume una mayor cantidad de azúcares a la recomendada, por lo que la estrategia utilizada ha sido reemplazar esos azúcares por los edulcorantes<sup>40</sup>.

Debido a los diferentes estudios, los cuales aún no son del todo concluyentes, y a las diferentes posturas respecto al uso seguro de estos aditivos existe controversia sobre su consumo en la salud humana.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existe una gran cantidad de estudios que aseveran la influencia de la microbiota intestinal sobre el metabolismo, el sistema inmune y el adecuado funcionamiento del organismo. Y que el desbalance en la microbiota intestinal conlleva a situaciones patológicas en el ser humano, tanto agudas infecciosas como crónicas degenerativas.

Por otro lado, un porcentaje elevado de la población (cercano al 100%) consume diariamente aditivos en sus alimentos, focalizándonos en edulcorantes. En este sentido se considera que los criterios para la evaluación de estos aditivos son insuficientes para garantizar la seguridad sanitaria de su consumo.

También se ha mostrado evidencia en la que ciertos aditivos, hablando de edulcorantes, tienen un efecto sobre la microbiota intestinal y ésta a su vez influye en la salud del individuo. Por lo que se considera importante la evaluación del efecto de la *stevia* sobre la microbiota intestinal humana.



## 5. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo al Consejo Latinoamericano de Información Alimentaria, los edulcorantes no calóricos aprobados en México han sido sometidos a extensos programas de prueba de inocuidad, lo cual ha sido respaldado en materia de seguridad en alimentos, por el JECFA sobre aditivos para alimentos; sin embargo, las pruebas realizadas para determinar la seguridad de estos aditivos se limitaba a evaluar toxicidad y carcinogénesis, las cuales consisten en evaluaciones químicas y técnicas que reflejan y enfatizan el rol de la caracterización química de los aditivos alimentarios<sup>2,23</sup>.

En México existen dos problemas de salud pública que conducen a millones de mexicanos a limitar su consumo de azúcar: la obesidad y la diabetes. Incluyendo el sobrepeso y la obesidad infantil, los cuales presentaran una prevalencia combinada de 34.4% en escolares en el 2012<sup>1</sup>. Esto significa que más de 50 millones de mexicanos deben cuidar sus niveles de glucosa en la sangre y/o de ingesta de calorías<sup>41</sup>.

Los edulcorantes no calóricos se encuentran entre los aditivos más utilizados de alimentos en todo el mundo, siendo consumidos regularmente por individuos delgados y obesos por igual<sup>19</sup>. Hasta ahora, su consumo había sido considerado seguro y beneficioso debido a su bajo contenido calórico, pero el apoyo a los datos científicos, estos argumentos siguen siendo escasos y controvertidos, ya que en el 2014, Suez y colaboradores determinaron que el consumo de estos ingredientes puede provocar intolerancia a la glucosa y modificaciones en la microbiota intestinal<sup>26</sup>.

Existen pocos estudios sobre la caracterización del microbioma humano, y que se han realizado con una población reducida. En la actualidad sólo existe un reporte del microbioma humano en niños obesos mexicanos<sup>38</sup>, sin embargo se requiere de referencias para establecer criterios de intervención.

Debido a los pocos estudios, no se ha realizado un seguimiento diferencial integrando parámetros dietéticos, antropométricos, bioquímicos, de homeostasis energética, endotoxemia y de microbiota intestinal, tampoco se ha diferenciado la

seguridad en su consumo por grupos de edad, es decir si es seguro el consumo incluso para población infantil, por lo cual se desconocen los efectos clínico-nutricionales, relacionados con el consumo de edulcorantes, particularmente de *stevia*.

## **6. HIPÓTESIS**

El consumo de *stevia* está relacionado con alteraciones en la microbiota intestinal nativa de individuos en diferentes etapas de vida.

## **7. OBJETIVOS**

### **a. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los cambios en la microbiota intestinal nativa de poblaciones en diferentes etapas de vida, relacionados con el consumo de *stevia* en un modelo *ex vivo*, utilizando como parámetro un panel de seguimiento diferencial del microbioma intestinal.

### **b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Evaluar microbiota intestinal nativa de individuos en diferentes etapas de vida.
- Adaptar un sistema de digestión *ex vivo* para cada grupo de estudio (de acuerdo a los parámetros dietéticos, digestivos y de microbiota intestinal)
- Evaluar los cambios de microbiota intestinal relacionados con el consumo de *stevia* vs dieta habitual, para cada grupo estudiado, en un sistema de digestión *ex vivo*.

## 8. METODOLOGÍA

### a. Diseño experimental

#### i. Tipo de estudio:

El presente estudio constituyó un estudio *ex vivo* comparativo de tipo experimental. Para llevar a cabo el presente estudio, se sometió un protocolo a los comités de ética e investigación del Hospital Regional Dr. Valentín Gómez Farías del sistema de salud ISSSTE.

Universo de estudio

Población abierta, mexicanos sin morbilidades.

#### ii. Criterios de selección:

Criterios de inclusión

- Sujetos aparentemente sanos.
- Examen de embarazo negativo en mujeres en edad fértil
- Sujetos que de manera voluntaria aceptaron participar en el estudio al otorgar la firma del consentimiento informado y comprendieron los procedimientos que se llevarán a cabo durante el estudio, conocen las alternativas de tratamiento disponibles y los riesgos que involucra ingresar al protocolo.
- Sujetos ambulatorios
- Que acepten las valoraciones nutricionales, médicas y la donación de muestras sanguíneas y fecales.

Criterios de no inclusión:

- Mujeres embarazadas y en periodo de lactancia
- Mujeres en edad fértil que no cuenten con un método anticonceptivo eficaz
- Sujetos con obesidad mórbida Índice de Masa Corporal (IMC)  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>.
- Sujetos en tratamiento farmacológico o nutricional para el manejo de sobrepeso
- Sujetos con diagnóstico de *Diabetes Mellitus* tipo 2
- Sujetos con hipertensión arterial sistémica no controlada

- Sujetos que estén en tratamiento con cualquiera de los siguientes medicamentos: inhibidores de la proteasa, esteroides, calcio antagonistas, insulina, sulfonilureas, tiazolidinedionas, risperidona, olanzapina, clozapina, antidepresivos tricíclicos, valproato y gabapentina
- Sujetos con creatinina sérica  $\geq 1.5$  mg/dL y si se considera que presenta insuficiencia renal severa calculada mediante el aclaramiento de creatinina  $\leq 29$  ml / min (Guías de la Fundación Nacional de Riñón)<sup>31</sup> (National Kidney Foundation, 2015)
- Sujetos con daño renal o hepático
- Sujetos con historia de abuso de alcohol o drogas
- Otras enfermedades orgánicas que en la opinión del investigador puedan interferir con el estudio
- Pacientes que se nieguen a seguir las evaluaciones nutricionales, médicas, así como la donación de tomas de muestras sanguíneas y fecales.

#### Criterios de exclusión:

- Voluntad del sujeto (retiro del consentimiento)
- Falta de apego al tratamiento por más del 20%
- Presencia de eventos adversos serios
- Decisión del investigador (ej. cuando se presente un evento adverso o comportamiento prohibido)
- Embarazo.
- Pacientes que no entreguen muestras sanguíneas y /o fecales.

#### iii. Grupos de estudio:

- Lactantes aparentemente sanos (dos grupos: lactante menor y lactante mayor), con un diagnóstico “Normal” de acuerdo a los estándares de crecimiento de la OMS<sup>42</sup>, nacidos por vía vaginal, y alimentados con leche materna por lo menos hasta las 8 semanas de edad.
- Primera infancia con un diagnóstico “Normal” de acuerdo a los estándares de crecimiento de la OMS.<sup>41</sup>

- Preescolares con un diagnóstico “Normal” de acuerdo a los estándares de crecimiento de la OMS<sup>42</sup>.
- Adultos jóvenes, con un IMC normal, de acuerdo a los parámetros de la OMS y de la NOM-008-SSA3-2010<sup>43</sup>, aparentemente sanos.

#### iv. Tamaño de muestra

Al menos 10 individuos por grupo para el estudio diagnóstico y al menos 45 pacientes para el estudio de intervención nutricional.

#### v. Aspectos éticos

Conforme a lo establecido en el reglamento de la Ley General de Salud<sup>30</sup> en materia de investigación para la salud, se incluyeron varios grupos aleatorios, se protegió la privacidad de los sujetos de investigación (artículos 14, 15 y 16) y de acuerdo al artículo 17, el estudio se considera en la categoría III. Investigación con riesgo mayor que el mínimo.

De acuerdo al Código de bioética Capítulo VII. Bioética en la investigación en salud, se recabó el consentimiento informado de los participantes, obteniendo previamente una clara descripción del estudio, de sus riesgos, y el planteamiento del derecho del paciente a retirarse de la investigación cuando así lo desee, sin que ello afecte en modo alguno su ulterior atención médica<sup>44</sup>.

El consentimiento informado se realizó por escrito, indicando los nombres y direcciones de dos testigos, su relación con el sujeto; siendo firmado por ambos testigos y por el sujeto de investigación.

#### b. Materiales

El equipo y material fueron proporcionados por el Laboratorio de Digestión *ex vivo* de la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

### c. Métodos

Para llevar a cabo este estudio, se realizó la estandarización de los sistemas de digestión *ex vivo* para cada población de estudio de acuerdo a la patente MX/2012/005418.

Así mismo, el procesamiento microbiológico de las muestras obtenidas de ARIS fue basado en las Normas Oficiales Mexicanas NOM-092-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994<sup>45,46</sup>.

Las muestras entregadas por los donantes, en hielera con gel refrigerantes, justo después de haber sido colectadas. Éstas fueron procesadas antes de cumplir 8 horas después de haber sido colectadas (vida máxima de la muestra).

El procesamiento de la muestra consistió en mezclar en esterilidad, el contenido de ambos frascos de muestras de cada paciente (aerobio y anaerobio) en un tubo cónico de 50ml, homogenizado y centrifugado a 5000rpm/10min a 4°C. Posteriormente, se colectó el sobrenadante para hacer siembra por muestra en medios de cultivo selectivos (agar MRS para *Lactobacillus spp* y agar XLD para *Salmoneloides*) incubados en aerobiosis a 37±2°C por 24 horas, (agar TSC para *Clostridium spp* y agar BSM para *Bifidobacterium spp*) incubados en cámara de anaerobiosis a 37±2°C por 48 horas).

La validación de los medios de cultivo se realizó con controles positivos y negativos utilizando las cepas de referencia: *L. casei* **ATCC® 393™** para agar MRS; *S. typhimurium* **ATCC® 14028™** para agar XLD, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* **ATCC® 15697™** para agar BSM y *Clostridium perfringens* **ATCC® 13124™**

Del sobrenadante de cada muestra fecal se tomó 1ml para obtener una muestra representativa por grupo de edad (lactante menor, primera infancia, preescolar y adulto joven), con el cual se inoculó un sistema de digestión *ex vivo* para cada población, con el fin de estabilizar la microbiota y promover una autoselección para las tres secciones del colon (colon ascendente, colon transversal y colon descendente). El proceso de aislamiento, estabilización y adaptación de microbiota intestinal se llevó a cabo de acuerdo a la patente MX/2012/005418.



De acuerdo a los resultados obtenidos de las encuestas dietéticas, se estandarizó una dieta para formular una “dieta estándar” para cada población y con ésta realizar el proceso de digestión *ex vivo* en cada Sistema de Digestión, con el fin de mantener la microbiota nativa de los donadores.

Se realizaron evaluaciones de digestión *ex vivo* del consumo de *stevia* para las poblaciones “Primera Infancia”, “Preescolar” y “Adulto Joven” con el fin de determinar si se presentaban cambios en el perfil de microbiota de cada población. Para ello se determinó administrar una dosis diaria de 0.4mg/kg de peso diario que es una media de la dosis recomendada, escalado al 10% por ser una evaluación en ARIS.

La caracterización de los esteviósidos utilizados para este estudio se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Concentraciones de esteviósidos.**

<b>Esteviósido mg/g</b>	<b>Rabaudiósido A mg/g</b>	<b>Rebaudiósido C mg/g</b>	<b>Esteviósidos totales mg/g</b>
36.77 ± 0.64	129.65 ± 0.55	10.63 ± 0.25	177.05

Las muestras del ARIS fueron tomadas en los tiempos 0 (control), 1 (1 administración) y 3 (administración continua) de cada sección del colon. Se realizó análisis microbiológico en medios de cultivo selectivos para determinar los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y Salmoneloides utilizando el método para la cuenta de microorganismos coliformes, definido en la NOM-113-SSA1-1994 con modificación<sup>46</sup>.

Se calculó las unidades formadoras de colonias (UFC) de acuerdo a la dilución de la muestra. El análisis estadístico consideró estadística inferencial. Donde se utilizó análisis de varianza multifactorial para las evaluaciones *ex vivo*, tomando en cuenta como factores: género de microorganismos, sección del colon (ascendente, transversal y descendente) y tiempo de administración (inicio, 1er administración y administración continua), con un 95% de confianza estadística y un valor de  $\alpha=0.05$ . El análisis se realizó en el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.II, mientras que las figuras se realizaron en el programa GraphPad Prism 6.

La activación de las cepas de referencia mostradas en la tabla 2, se realizó de acuerdo a las guías del proveedor ATCC: añadiendo el medio específico para cada una al vial recibido con el liofilizado, se resuspendió suavemente el liofilizado con una micropipeta, evitando la formación de burbujas de aire. Se utilizó toda la suspensión para inocular medio sólido (5-6 cajas Petri) con estriado y medio líquido en tubos de 2-3 mL. Posteriormente se subcultivó más de una vez de la recuperación identificando el número de pase.

El presente estudio se realizó de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 2. Poblaciones y parámetros a evaluar.**

Población	Evaluación con <i>stevia</i>	Parámetros a evaluar
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lactante</li> <li>• Primera infancia</li> <li>• Preescolar</li> <li>• Adulto oven</li> </ul>	Evaluaciones de digestión <i>ex vivo</i> con muestras al inicio, con una administración y con tres administraciones	UFC en heces: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus spp</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium spp</i></li> <li>• <i>Salmonella spp</i></li> <li>• <i>Clostridium spp</i></li> </ul> Identificación por PCR en tiempo real: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. acidophilus</i></li> <li>• <i>L. casei</i></li> <li>• <i>L. paracasei</i></li> <li>• <i>L. rhamnosus</i></li> <li>• <i>L. reuteri</i></li> <li>• <i>L. plantarum</i></li> <li>• <i>L. gasseri</i></li> <li>• <i>L. sakei</i></li> <li>• <i>L. fermentum</i></li> <li>• <i>Lactobacillus spp</i></li> <li>• <i>B. animalis</i></li> <li>• <i>B. fragilis</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium spp</i></li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. muciniphila</i></li> <li>• <i>E. cloacae</i>.</li> <li>• Enterococcus</li> <li>• Bacteroides</li> </ul>
--	--	--

A cada donador se le evaluó nutricionalmente. Se realizó una anamnesis en la cual se registra su peso, talla, circunferencias de cintura y cadera y pliegues cutáneos. Se solicitó a cada participante la donación de una muestra de heces fecales para la obtención de la microbiota intestinal.

Las muestras de microbiota intestinal fueron preservadas e inoculadas en sistemas de digestión *ex vivo*, adaptados a condiciones fisiológicas de cada grupo de estudio. Cada sistema de digestión *ex vivo* fue alimentado con una dieta estándar (formulada de acuerdo a los hábitos alimenticios de los donadores), evaluando los cambios en la microbiota intestinal relacionados con el consumo de *stevia* como aditivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se procedería a ejecutar un estudio de intervención nutricional con el grupo de pacientes más factible, es decir aquel que resulte más favorecido de acuerdo a los ensayos *ex vivo*, sin embargo, de acuerdo a los resultados observados, no se consideró ético realizar un estudio en humanos.

De cada muestra se conservaron 2 viales de 1ml a -20°C para la extracción y purificación de ADN para el análisis molecular, para el cual se diseñó un procedimiento normalizado de operación (ANEXO 3) cuya metodología se presenta a continuación:

**Extracción y purificación de DNA de las muestras de digestión utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2013-2016) con protocolo modificado:**

1. Descongelar las muestras en hielo.
2. Centrifugar la muestra a 8000rpm por 5 min a TA. Eliminar el sobrenadante y repetir el proceso hasta empastillar las células.
3. Añadir a la pastilla 400 µL de buffer AP1 y 4 µL de RNasa A (100mg/mL) y agitar vigorosamente en vórtex durante 30s.

4. Incubar la mezcla durante 10 min a 65°C, mezclando cada 2 min (5 veces) en vórtex durante la incubación.
5. Añadir 130 µL de buffer AP2 al lisado. Mezclar e incubar durante 5 min en hielo.
6. Centrifugar el lisado a 14000 rpm por 5 min.
7. Pipetear el lisado dentro de la columna de QIAshredder Mini spin (columna color lila) puesta dentro de un tubo de colección de 2 mL, y centrifugar durante 2 min a 14000 rpm. Tener cuidado de no deshacer la pastilla formada en la parte inferior del tubo cuando continúe con el paso 7.
8. Quitar la columna y desecharla. Transferir la fracción líquida en un tubo nuevo, teniendo cuidado de no pipetear el sólido blanco de la parte inferior del tubo. Durante el traslado medir el volumen (necesario para el siguiente paso).
9. Añadir 1.5 volúmenes de buffer AP3/E al lisado aclarado y mezclar con la pipeta por inmersión. (el buffer AP3 contiene etanol, que ayuda a precipitar el DNA de manera que podamos aislarlo de los otros compuestos que se encuentran aún en solución).
10. Pipetear 650 µL de la mezcla del paso anterior a la columna de centrifugación DNeasy Mini Spin (columna blanca), colocada en un tubo de colección de 2 mL y centrifugar durante 1 min a 8000 rpm. Descartar el filtrado (decantar).
  - Esta columna contiene pequeñas perlas de sílice (vidrio) a las que se adhiere el DNA. De esta manera, el DNA se pegará en el filtro y cualquier residuo restante se lava a través de ésta. Nuestro ADN se encuentra ahora en el filtro de la columna.
11. Repetir el paso 10 y decantar el filtrado.
12. Colocar la columna DNeasy Mini Spin (blanca) en un nuevo tubo de recolección de 2mL, añadir 500 µL de buffer AW a la columna, y centrifugar durante 2 min a 14000 rpm hasta que la membrana esté seca. Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de recolección.
13. Añadir nuevamente 500 µL de buffer AW y centrifugar durante 2 minutos a 14000 rpm para secar la membrana. Eliminar el flujo. Volver a centrifugar por 1 minuto más para eliminar cualquier residuo líquido que aún posea.
14. Transferir la columna DNeasy Mini Spin a un tubo nuevo de 1.5 mL y pipetear 50 µL de buffer AE directamente sobre la membrana de la columna blanca. Incubar durante 10 min a TA, y centrifugar durante 1 min a 8000 rpm para eluir. Guardar el filtrado contenido en hielo y transferir nuevamente a la columna DNeasy Mini

Spin a otro tubo nuevo. Repetir el paso anterior y desechar la columna al final. En este paso se disuelve el DNA en la solución AE y es lavado de las perlas. Al final de este paso, se tendrá el DNA en la solución del tubo colector, no en el filtro.

15. Cuantificar el DNA en Nanodrop, introduciendo primeramente 2  $\mu\text{L}$  de agua destilada como blanco y posteriormente colocando 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra para obtener la concentración de DNA ng/  $\mu\text{L}$  y la pureza de acuerdo a la relación 260/280nm, la cual debe encontrarse dentro del rango 1.8-2.0.

## 2. Identificación y cuantificación de microorganismos específicos por qPCR.

1. De acuerdo a los resultados de la cuantificación del DNA, realizar el cálculo de cada componente a agregar en la reacción de acuerdo al protocolo de la GoTaq PCR Core System I, como se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Volúmenes de reacción recomendados y concentraciones finales de GoTaq PCR Core System Components.		
Componente	Volumen	Concentración final
Solución $\text{MgCl}_2$ 25mM	2.0 – 8.0 $\mu\text{l}$	1.0-4.0mM
Colorless GoTaq 5X Flexi Buffer o Green GoTaq Flexi Buffer	10 $\mu\text{l}$	1.0X
Mezcla de nucleótidos PCR 10mM de cada uno.	1 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{M}$ de cada uno
iniciador 3'-5'	5-50pmol	0.1-1.0 $\mu\text{M}$
iniciador 5'-3'	5-50pmol	0.1-1.0 $\mu\text{M}$
GoTaq Polimerasa de ADN 5u/ $\mu\text{l}$	0.25 $\mu\text{l}$	1.5u/50 $\mu\text{l}$
Plantilla de ADN	Variable	<0.5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$
Agua libre de nucleasa, ajustar a un volumen final de	<b>50 <math>\mu\text{l}</math></b>	

Descongele completamente las soluciones  $\text{MgCl}_2$  25mM y la solución GoTaq Flexi buffer y mezcle con vórtex antes de su uso. Le sugerimos encarecidamente optimizar la concentración de  $\text{MgCl}_2$

2. Realizar curvas de concentración del DNA de las cepas puras.
3. Realizar las mezclas manteniéndolas en hielo.
4. Colocar las mezclas en la placa para el termociclador Thermo.
5. De acuerdo a las especificaciones de la Taq polimerasa determinar el número de ciclos y las temperaturas, como se muestra en la tabla 4:

Tabla 4. Guías de ciclos térmicos para la aplicación de PCR			
Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Inicio de desnaturalización	95°C	2 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	0.5-1 minuto	

Anileación Extensión	42-65°C* 72°C	0.5-1 minuto 1 minuto/kb	25-35 ciclos
Extensión final	72°C	5 minutos	1 ciclo
Soak	4°C	Indefinido	1 ciclo

Estas guías aplican para las secuencias objetivo entre 200 y 2000 pb y puede que requieran ser adaptadas en dependencia del termociclador.

\*La temperatura de alineamiento para una reacción de amplificación específica dependerá de las secuencias de los dos iniciadores.

6. Extraer los datos del termociclador y visualizar en el software para realizar la cuantificación de acuerdo a las curvas.

Nota: Para visualizar la amplificación, se puede realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

## 9. RESULTADOS

Se contactó con donadores de diferentes grupos de edad, a quienes se les solicitó una muestra de heces fecales tomada de acuerdo al ANEXO 1.

A cada donador se le realizó una evaluación nutricional tomando en cuenta valores antropométricas, clínicos, dietéticos para determinar su inclusión en el estudio. Asimismo, se les indicó evitar el consumo de productos que propiciaran modificaciones a la microbiota intestinal nativa durante dos semanas antes a la donación (lácteos fermentados, quesos madurados, suplementos con fibra, probióticos, prebióticos o simbióticos).

La evaluación antropométrica de los donantes se muestra en la tabla 6. La población estudiada de primera infancia tuvo una edad promedio de  $2.4 \pm 0.54$  años, el 50% fueron varones y el 50% niñas. La población preescolar tenía una edad promedio de  $4.37 \pm 0.91$  años, el 60% fueron varones y el 40% niñas.

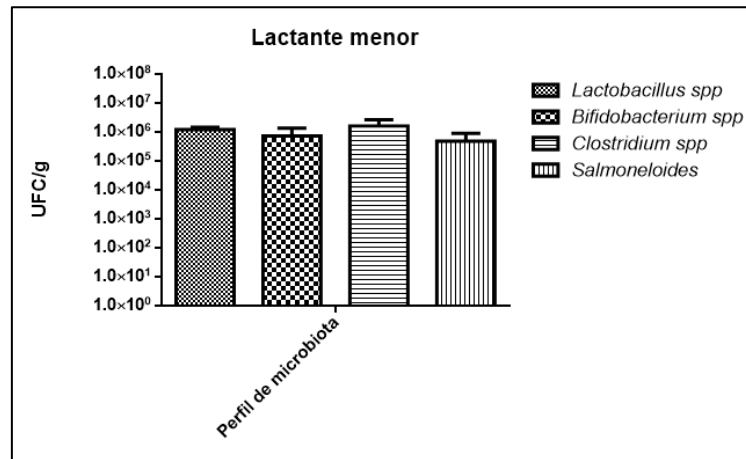
Se obtuvieron muestras fecales de 10 niños de 1 año a 2 años 11 meses (etapa correspondiente a la Primera infancia), 10 niños de 3 a 4 años 11 meses (correspondiente a la etapa de Preescolar), 10 adultos de 20 a 34 años 11 meses (correspondiente a la etapa de Adulto Joven).

Los resultados en UFC/g de las muestras de cada donador se presentan en las figuras 1, 2, 3 y 4 de acuerdo a los cuatro géneros cuantificados (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Clostridium spp* y *Salmonella spp*), así como los resultados de la dieta habitual de cada población de estudio.

De la misma manera, las figuras 1, 2, 3 y 4 muestran la evaluación de hábitos dietéticos de cada población, en las cuales se analizaron las encuestas alimentarias realizadas a los donadores (Recordatorio de 24 y 48 horas) se obtuvo una relación de kcal consumidas diariamente por los donadores, así como la cantidad (gramos) de azúcares simples, carbohidratos, lípidos y proteínas consumidos por día.

La figura 1 muestra la concentración de bacterias de los cuatro géneros de interés en lactantes de 0 a 6 meses de edad en la cual se observa una ligera tendencia por una mayor proporción del género *Clostridium*.

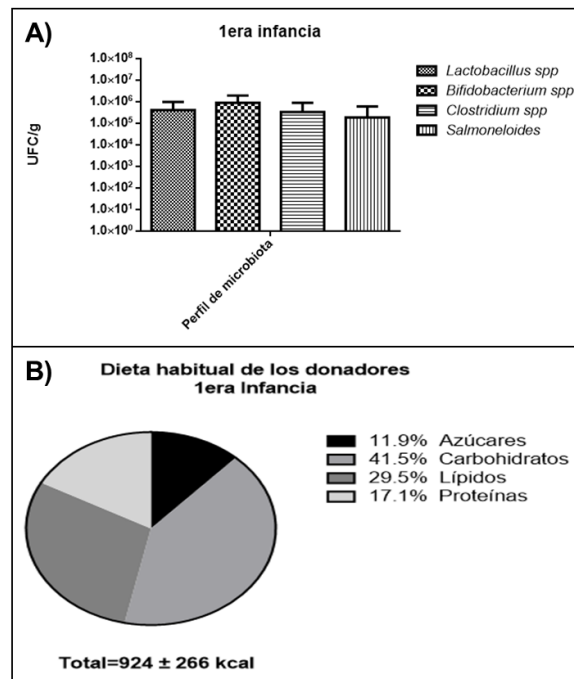
**Figura 1.**



**Figura 1. Perfil de microbiota en la población Lactante menor.** Carga bacteriana perteneciente a la microbiota de lactantes de 0 a 6 meses n=8, cada barra muestra la cantidad de bacterias encontradas por gramo de materia fecal, las barras de desviación representan la desviación estándar.

En la figura 2 se observa que el grupo predominante de microorganismos es *Bifidobacterium spp*.

**Figura 2.**



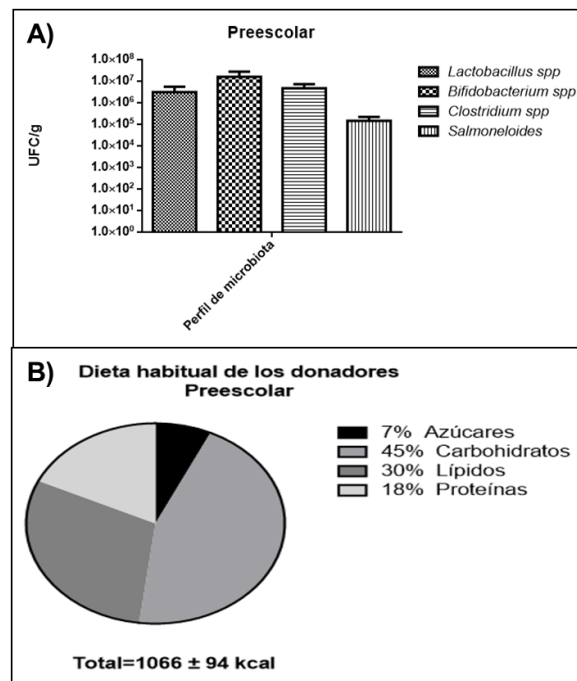


Perfil de microbiota intestinal en la población en Primera infancia. Carga bacteriana perteneciente a la microbiota de niños de 1 año 1 mes a 3 años n=10, cada barra muestra la cantidad de bacterias encontradas por gramo de materia fecal, las barras de desviación representan la desviación estándar..

- A) Proporción de macronutrientes de acuerdo a la dieta habitual de los donadores en etapa de Primera infancia, cada color muestra el porcentaje de macronutrientes en su dieta habitual.

La figura 3 muestra que el perfil de microbiota de los niños en edad preescolar sigue siendo predominando en el género *Bifidobacterium*, como se muestra en la figura 2 de población en Primera infancia.

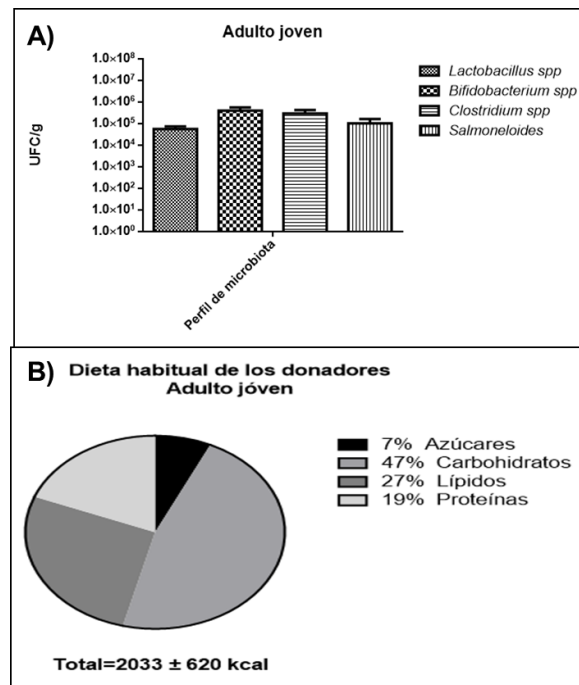
**Figura 3.**



- A) Perfil de microbiota intestinal en la población Preescolar. Carga bacteriana perteneciente a la microbiota de niños de 3 años 1 mes a 5 años n=10, cada barra muestra la cantidad de bacterias encontradas por gramo de materia fecal, las barras de desviación representan la desviación estándar..
- B) Proporción de macronutrientes de acuerdo a la dieta habitual de los donadores en edad Preescolar. Cada color muestra el porcentaje de macronutrientes en su dieta habitual.

En la figura 4 se observa que en el perfil de microbiota intestinal predominan los géneros *Bifidobacterium* y *Clostridium*.

**Figura 4.**



A) Perfil de microbiota intestinal en la población Adulto Joven. Carga bacteriana perteneciente a la microbiota de adultos de 20 a 35 años n=10, cada barra muestra la cantidad de bacterias encontradas por gramo de materia fecal, las barras de desviación representan la desviación estándar.

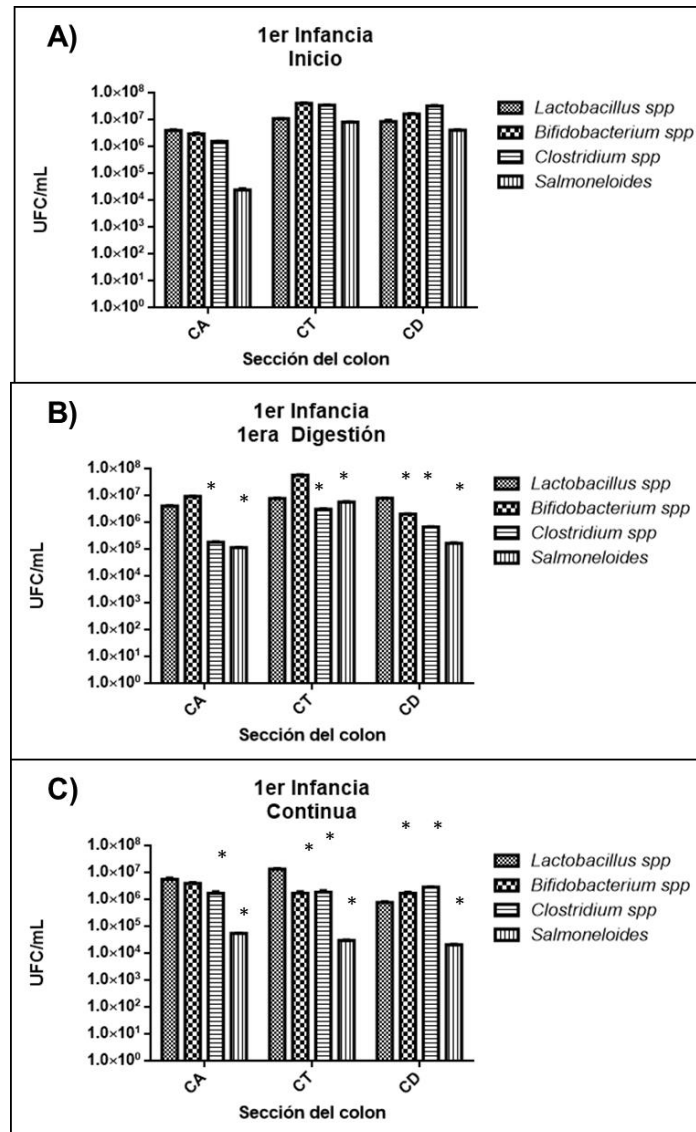
B) Proporción de macronutrientes de acuerdo a la dieta habitual de los donadores Adultos Jóvenes. Cada color muestra el porcentaje de macronutrientes en su dieta habitual.

Respecto a la evaluación *ex vivo*, ésta se llevó a cabo mediante la adaptación de un ARIS para cada población.

Los resultados de las evaluaciones *ex vivo* se muestran en las figuras 5, 6 y 7.

La figura 5 muestra un decremento significativo de los géneros *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Salmonella* de acuerdo al análisis de varianza multifactorial con un  $\alpha=0.05$ .

**Figura 5. Evaluación ex vivo del consumo de stevia en Primera infancia**



Carga bacteriana perteneciente a la evaluación ex vivo en ARIS adaptado a niños de 1 año 1 mes a 3 años, cada barra muestra la cantidad de bacterias encontradas por mililitro de contenido intestinal tras la evaluación de la administración de *stevia*, las barras de desviación representan la desviación estándar..

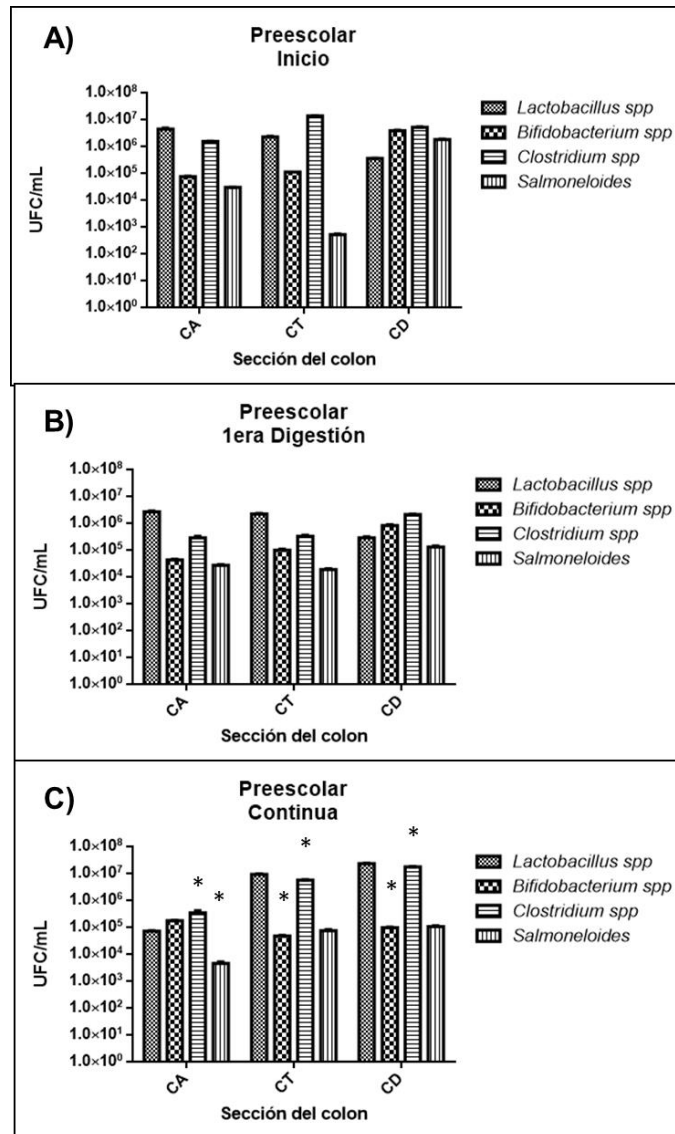
A) Inicio de la evaluación. B) Primera administración de *stevia*. C) Administración continua de *stevia*. Donde CA: Colon ascendente, CT: Colon transversal, y CD: Colon descendente.

ANOVA multifactorial  $p < 0.05$ , con un nivel de confianza del 95%.

La figura 6 muestra un decremento significativo ( $p < 0.05$ ) en población preescolar, del género *Bifidobacterium* particularmente, y modificaciones en las UFC/ ml de muestra en el género *Lactobacillus* en diferentes secciones del colon con respecto del tiempo

de administración de *stevia*. También se observan cambios en el género *Clostridium* al presentarse incrementado tras la administración continua de *stevia*.

**Figura 6. Evaluación *ex vivo* del consumo de *stevia* en Preescolares**



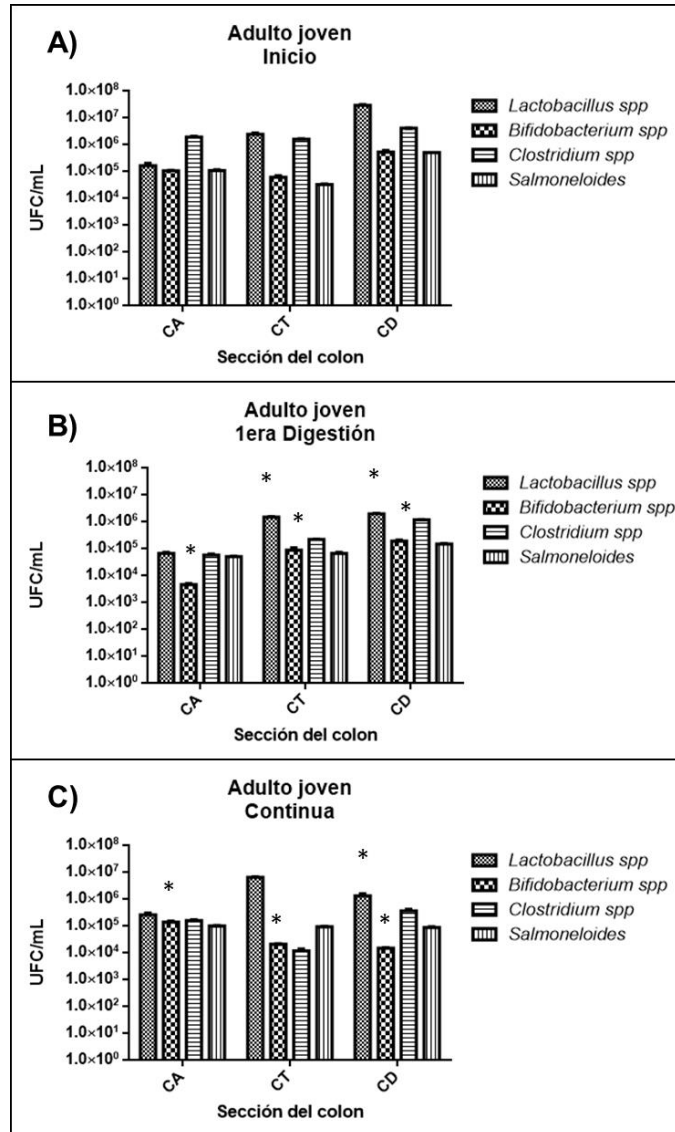
Carga bacteriana perteneciente a la evaluación *ex vivo* en ARIS adaptado a niños de 3 año 1 mes a 5 años, cada barra muestra la cantidad de bacterias encontradas por mililitro de contenido intestinal tras la evaluación de la administración de *stevia*, las barras de desviación representan la desviación estándar..

A) Inicio de la evaluación. B) Primera administración de *stevia*. C) Administración continua de *stevia*. Donde CA: Colon ascendente, CT: Colon transversal, y CD: Colon descendente.

ANOVA multifactorial  $p < 0.05$ , con un nivel de confianza del 95%.

En la figura 7 se observa una relación entre el consumo de *stevia* y una disminución estadísticamente significativa de los géneros *Lactobacillus* y sobretodo *Bifidobacterium*.

**Figura 7. Evaluación ex vivo del consumo de *stevia* en Adulto Joven**



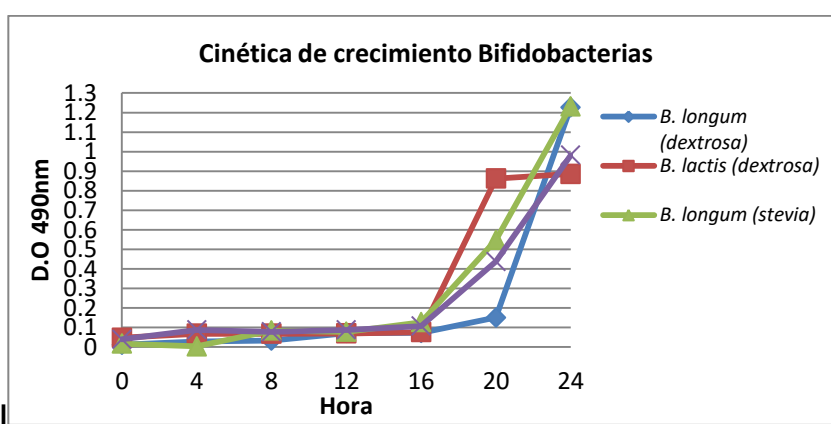
Carga bacteriana perteneciente a la evaluación ex vivo en ARIS adaptado a adultos de 20 a 35 años, cada barra muestra la cantidad de bacterias encontradas por mililitro de contenido intestinal tras la evaluación de la administración de *stevia*, las barras de desviación representan la la desviación estándar..

A) Inicio de la evaluación. B) Primera administración de *stevia*. C) Administración continua de *stevia*. Donde CA: Colon ascendente, CT: Colon transversal, y CD: Colon descendente.

ANOVA multifactorial  $p < 0.05$ , con un nivel de confianza del 95%.

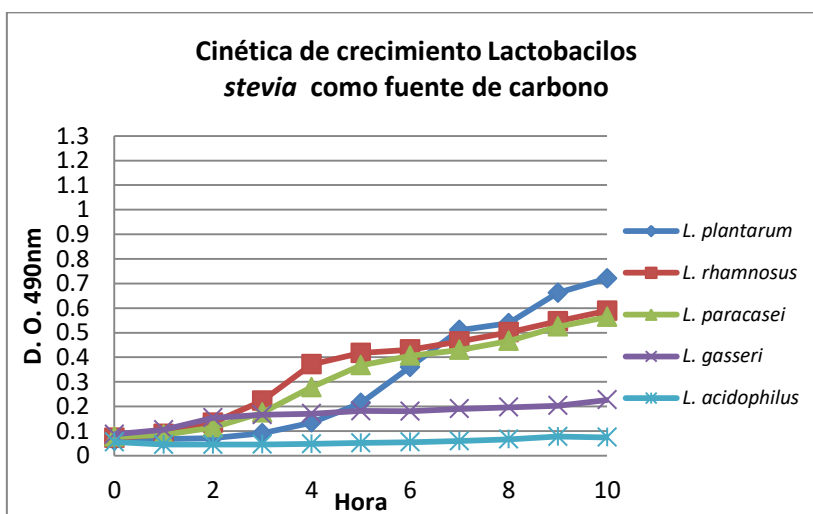
Debido a que se observaron cambios en el género *Bifidobacterium*, se tomó la decisión de realizar pruebas de crecimiento bacteriano *in vitro* con *stevia* como fuente de carbono. Se evaluaron dos cepas de *Bifidobacterias* (*B. lactis* y *B. longum*) y cinco cepas de *Lactobacilos* (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. gasseri* y *L. acidophilus*). Los resultados de absorbancia se muestran en las figuras 8 y 9, donde se observó la curva de crecimiento bacteriano de diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con dos fuentes de carbono diferentes (dextrosa como control y *stevia*), sin embargo no se encontró diferencia significativa.

**Figura 8. Cinética de crecimiento de Bifidobacterias con medio modificado**



Cinética de crecimiento bacteriano *in vitro* de dos cepas de Bifidobacterias, cada línea muestra la densidad óptica, relacionada con el crecimiento bacteriano con dos fuentes de carbono, dextrosa como control y *stevia*, de la hora 0 hasta la hora 24.

**Figura 9. Cinética de crecimiento de Lactobacilos con medio modificado**



Cinética de crecimiento bacteriano *in vitro* de cinco cepas de Lactobacilos, cada línea muestra la densidad óptica, relacionada con el crecimiento bacteriano con *stevia* como fuente de carbono, de la hora 0 hasta la hora 24.

Respecto a la identificación molecular, se han recibido 11 cepas ATCC, de las 16 contempladas como referencia para el kit. Las cuales fueron activadas bajo las especificaciones de ATTC para el posterior aislamiento del DNA de cada cepa. La siguiente tabla muestra las cepas que se han recibido y la metodología aplicada para su activación y expansión.

**Tabla 5. Cepas de referencias y sus condiciones de crecimiento.**

Cepa	Condiciones	Observaciones
<i>Prevotella tannerae</i> (51259)	Medio 1490 modificado incubación a 37°C en anaerobiosis en presencia de N <sub>2</sub> 80%, CO <sub>2</sub> 10% y H <sub>2</sub> 10% (ATCC, 2016) <sup>47</sup>	No se han obtenido las condiciones
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subesp. <i>Desulfuricans</i> (29577)	Medio Trypticase soy broth with defibrinated sheep blood a 30°C en anaerobiosis en presencia de N <sub>2</sub> 80%, CO <sub>2</sub> 10% y H <sub>2</sub> 10% (ATCC, ATCC, 2016) <sup>48</sup>	No se han obtenido las condiciones
Bacteroides (49058)	Medio 1490 modificado, a 37° C en anaerobiosis. (ATCC, ATCC, 2016) <sup>49</sup>	No se han obtenido las condiciones
<i>Enterococcus</i> sp (BAA-782)	Medio Trypticase soy broth with defibrinated sheep blood, 37°C en aerobiosis. (ATCC, ATCC, 2016) <sup>50</sup>	Activada
<i>Bacteroides fragilis</i> (25285)	Medio Trypticase soy broth with defibrinated sheep blood, 37°C en anaerobiosis en presencia de N <sub>2</sub> 80%, CO <sub>2</sub> 10% y H <sub>2</sub> 10% (ATCC, ATCC, 2016) <sup>51</sup>	Activada
<i>Enterobacter cloacae</i> (13047)	Medio caldo nutritivo a 30°C en condiciones aerobias. (ATCC, ATCC, 2016) <sup>52</sup>	Activada
<i>Lactobacillus sakei</i> (15521)	30°C con 5% de CO <sub>2</sub> (ATCC, ATCC, 2016) <sup>53</sup>	Activada
<i>Lactobacillus fermentum</i> (14932)	Medio MRS broth a 37°C en aerobiosis (ATCC, ATCC, 2016) <sup>54</sup>	Activada
<i>Lactobacillus casei</i> (393)	Medio MRS broth a 37°C en aerobiosis (ATCC, ATCC, 2016) <sup>55</sup>	Activada
<i>Lactobacillus reuteri</i> (23272)	Medio MRS broth a 37°C en aerobiosis (ATCC, ATCC, 2016) <sup>56</sup>	Activada
<i>Akkermansia muciniphila</i> (BAA-835)	Medio Trypticase soy broth with defibrinated blood sheep a 37°C en anaerobiosis. (ATCC, ATCC, 2016) <sup>57</sup> O Medio Brain Heart Infusion con 5% de Cisteína a 37°C en anaerobiosis. (ATCC, ATCC, 2016) <sup>58</sup>	Activada

**Tabla 6. Resultados de la evaluación antropométrica**

<b>Población</b>	<b>Peso</b>	<b>Talla</b>	<b>Perímetro cefálico</b>	<b>Circunferencia de cintura</b>	<b>Circunferencia de cadera</b>	<b>Circunferencia media de brazo</b>
Primera infancia	11.25 ± 0.92 kg	87.7± 3.05 cm	46.81± 0.99 cm	51.63± 0.83 cm	59.07 ± 0.9 cm	14.31± 0.85 cm
Preescolar	21.63±0.7 kg	115±1.4 cm	50.75±1.06 cm	55.25±1.06 cm	63.25±1.77cm	18±0.86 cm
Adulto joven	72.08±12.63 kg	171 ±9.29 cm	No aplica	78.25± 12.6 cm	97.5± 6.45 cm	32.25 ±3.86 cm



## 10. DISCUSIÓN

Como se muestra en las figuras 1, 2, 3 y 4, existe una gran variabilidad propia de la microbiota intestinal debido a que ésta se realizó de manera individual. Reportes indican que la microbiota intestinal es propia de cada individuo y tiene una alta variabilidad, ya que su composición dependerá de factores genéticos, estilo de vida, alimentación, vía de nacimiento, entre otros.<sup>4</sup>

Los resultados de la evaluación antropométrica de los donadores (tabla 2) indica que de acuerdo a las guías de la OMS, la población de primera infancia tuvo un peso para la edad por encima del rango de normalidad (+1 a +2 SD en puntuación Z), una talla para la edad en esta misma puntuación, sin embargo, este dato se comprobó con el índice de peso para la talla, el cual se encontró dentro del rango de normalidad (0 a +1 SD en puntuación Z) con un diagnóstico de peso normal. El perímetro cefálico se encontró adecuado para la edad (0 a +1 SD en puntuación Z), así como la circunferencia media de brazo en el mismo rango. Lo que indica que el índice de crecimiento de estos niños eran adecuados, aptos para ser incluidos en este estudio<sup>42</sup>.

La población preescolar mostró un perímetro cefálico dentro del rango de normalidad (0 a +1 SD en puntuación Z); mientras que el peso para la edad y la talla para la edad se encontraron en el rango de normalidad y sobrepeso (0 a +2SD en puntuación Z), sin embargo éste parámetro se comprobó con el peso para la talla, el cual se encontró dentro del rango de normalidad (-1 a +1SD en puntuación Z); la circunferencia media de brazo (CMB) se encontró también dentro de un rango de normalidad (Median a +1 SD en puntuación Z), resultados que indican que esta población se encontraba antropométricamente en un rango saludable, aptos para este estudio<sup>42</sup>.

Respecto a la población de adulto joven, el IMC ( $22.77 \pm 3.02 \text{ kg/m}^2$ ) tuvo un diagnóstico de peso normal, el índice cintura-talla, el cual se ha convertido en una herramienta importante para el diagnóstico de síndrome metabólico y otras

enfermedades crónicas, se encontró adecuado ( $0.45 \pm 0.04$ ), lo cual indica que esta población fue apta para este estudio.

El perfil de microbiota de individuos lactantes (figura 1), donde la tendencia es mayor en el género *Clostridium* coincide con lo reportado por Dinh y colaboradores, quienes encontraron que el grupo más abundante fue Firmicutes, en este grupo de edad<sup>14</sup>.

Por otro lado, el perfil de microbiota intestinal de individuos en primera infancia (figura 2) tiende a ser predominante en *Bifidobacterium spp*, coinciden con lo ya reportado por Jost y colaboradores<sup>59</sup>. Así como muestra el grupo de trabajo de Dinh en el 2016, la misma población va teniendo cambios en su microbiota intestinal conforme se sufren cambios en crecimiento y desarrollo, por lo que se consideró importante el estudio de poblaciones en diferentes etapas de la vida<sup>14</sup>.

Respecto a la dieta habitual, de la población de primera infancia (figura 2, B), se observa que de acuerdo a los requerimientos energéticos determinados por la FAO/WHO/UNU<sup>60</sup>, el consumo de calorías se encuentra dentro de lo recomendado. Sin embargo, respecto al requerimiento proteico también establecido por estas organizaciones, se encuentra excedido casi al doble, ya que se recomiendan alrededor de 0.7g/kg de peso/ día y el consumo habitual de esta población fue de 1.9g/ kg de peso/ día.

La dieta de la población preescolar (figura 3, B) muestra un descenso en el consumo de azúcares simples con respecto del grupo de primera infancia y se observa que el consumo energético va acorde a lo recomendado por la FAO/WHO/UNU<sup>60</sup>, sin embargo la cantidad de proteínas consumidas de manera regular por esta población es de 2.38g/ kg de peso por día, siendo el consumo recomendado de 0.7g/kg de peso/ día.

Es importante mencionar que existen reportes de otros países, donde el género *Bifidobacterium* se ve disminuido o casi nulo en adultos<sup>61,62</sup>. El hecho de que la proporción de este género se mantenga podría ser a causa de la dieta y el estilo de

vida, ya que un estudio describió que los oligosacáridos del maíz promovían la proliferación de algunas cepas de bifidobacterias<sup>63</sup>. Siendo el maíz, un alimento esencial en la población mexicana. Sin embargo, escasa evidencia sobre este hecho no permite concluir en una causa específica.

El decremento significativo de los géneros *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Salmoneloides* en la población primera infancia (figura 5), siendo los últimos dos géneros potencialmente patógenos puede ser benéfico, sin embargo el decremento de *Bifidobacterium* spp, el cual también se presenta en la figura 6, no se considera adecuado, sobretodo en estas dos poblaciones (primera infancia y preescolar) (figura 6), donde *Bifidobacterium* spp juega un papel importante en la salud intestinal y el desarrollo de sistema inmune. Ya que de acuerdo a la literatura, la presencia este género parece ser protector contra el desarrollo de la obesidad<sup>5</sup>.

De la misma manera, el decremento en el género *Bifidobacterium* en población adulta (figura 7), aunado al decremento de *Lactobacillus* spp, los cuales son microorganismos probióticos que tienen funciones muy importantes en el huésped tanto en el metabolismo, en mantener la mucosa intestinal íntegra, en el correcto funcionamiento del sistema inmune y en continuar el proceso de digestión<sup>64,65</sup>, pudieran comprometer la salud del individuo.

De manera general, se observó que las tres poblaciones presentaron un decremento del género *Bifidobacterium*. Un estudio *in vivo* demostró la importancia en el sistema inmune de este género, ya que diferentes cepas de bifidobacterias amortiguaban la activación y expresión de NF- $\kappa$ B y la secreción de citocinas proinflamatorias por las células inmunes en respuesta a la exposición a LPS, TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ <sup>64,65</sup>.

Reportes relacionan el decremento de la abundancia relativa del género *Bifidobacterium* con algunos padecimientos como diarrea asociada a antibióticos, enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad, alergias, entre otros<sup>66</sup>. Dando la importancia a este género, tomando en cuenta que son de las primeras bacterias en

colonizar el tracto gastrointestinal humano y que alcanzan su mayor proporción durante los primeros 12 meses de vida del individuo<sup>67</sup>.

Los resultados de las figuras 8 y 9 coinciden con los reportados por Kunová y colaboradores donde determinan que los tanto algunas cepas de *Lactobacillus* como de *Bifidobacterium* son capaces de utilizar steviósidos como fuente de carbono, sin embargo este efecto no llega a ser considerado prebiótico, es decir, que no promueven su crecimiento<sup>29</sup>.

Algunos estudios indican que el consumo de algunos aditivos puede alterar la microbiota intestinal, causando disbiosis, la cual, a su vez traerá otros efectos, como un decremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta<sup>26</sup>, importantes en la regulación metabólica del huésped (como la inhibición de la gluconeogénesis hepática por el ácido propiónico y por ende el incremento en la lipólisis; la producción de ácido butírico, el cual es el principal sustrato de los colonocitos y que por lo tanto promueven el mantenimiento de la mucosa intestinal, el ácido acético que mantiene un pH ácido y que inhibe la proliferación de microorganismos patógenos oportunistas, entre otros efectos)<sup>68,69</sup>.

Como ya se han presentado anteriormente, diferentes cepas de microorganismos tienen efectos determinantes en la microbiota intestinal y están relacionadas con síntomas y patologías, por lo cual, algunas de ellas, como las mostradas en la tabla 5 son consideradas en este trabajo como cepas biomarcadoras, ya que su presencia o ausencia se relaciona con el estado de salud y nutrición de los individuos en diferentes estudios<sup>70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86</sup>.

El incremento en el consumo de los edulcorantes no calóricos coincide con el incremento en la incidencia y prevalencia mundial de la obesidad y otras enfermedades crónico-degenerativas. Por lo que tanto los hallazgos de Suez y colaboradores<sup>26</sup>, como los de este estudio, consideran que es importante desarrollar estrategias nutricionales para cada individuo, las cuales integren en composición y funcionalidad de la microbiota intestinal.

## **11. CONCLUSIONES**

La población mexicana estudiada conserva una proporción del género *Bifidobacterium*, lo cual no coincide con reportes de otros países.

Conforme a lo ya reportado, la microbiota intestinal es diferente en las etapas de vida de un individuo.

La adaptación de ARIS a poblaciones en diferentes etapas de vida permitió observar que el consumo de edulcorantes como *stevia* tiene un efecto sobre la microbiota intestinal, específicamente sobre la disminución del género *Bifidobacterium* en humanos en diferentes etapas de la vida.

Se desconoce el mecanismo por el cual *stevia* disminuye este género de interés, por lo que se requieren más estudios para identificarlo.

## **12. PERSPECTIVAS**

Los resultados presentados en este trabajo dan pauta a continuar con la investigación sobre los efectos de diferentes aditivos alimentarios en la microbiota intestinal, el metabolismo y el sistema inmune.

A partir de lo presentado se podrían llevar a cabo estrategias para combatir procesos patológicos e inflamatorios causados por el desequilibrio en la microbiota intestinal, como identificar los metabolitos producidos, microorganismos biomarcadores, entre otros.

Es importante evaluar los efectos del consumo de los aditivos sobre la microbiota intestinal, ya que éste se considera como un factor determinante de la salud humana por sus implicaciones en el metabolismo y la inmunidad.

Así mismo, se considera importante estudiar el factor determinante por el cual la población mexicana adulta tiene una proporción considerable de bifidobacterias.

### 13. REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Salud Pública, (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales 2012*. México.
2. World Health Organization. (2013). *World Health Organization*. Recuperado el 21 de Abril de 2014, de 10 datos sobre la obesidad: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/index1.html>
3. Garvey, W., Mechanick, J., & Einhorn, D. (2014). The American Association of Clinical Endocrinologists and the American College of Endocrinology: 2014 Advanced framework for a new diagnosis of obesity as a chronic disease. *Endocr Pract.*, 977–989.
4. Ruiz Alvarez, V., Puig Peña, Y., & Rodríguez Acosta, M. (2010). Intestinal microbiota, immune system and obesity. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 364-397.
5. Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006; **444**: 1022-1023.
6. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight. R., Gordon, J.I. The Human Microbioma Proyect. *Nature*. 2007; **449**: 804-810.
7. Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., *et al*. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013; **500**: 541-546.
8. Kalliomaki, M., Collado, M.C., Salminen, S., Isolauri, E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008; **87**: 534-538.
9. Cani, P. D. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia induced inflammation in high-fat diet- induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 1470–1481.
10. Chichlowski, M., De Lartigue, G., German, B., Raybould, H., & Mills, D. (2012). Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk

- oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 321–327.
11. Leahy, S. C. (2005). Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 1303–1315.
  12. Rivièrè, A., Selak, M., Lantin, D., & Ler, F. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, 1-21.
  13. Soares, J., Pimentel-Nunes, P., Roncon-Albuquerque, R., & Leite-Moreira, A. (2010). The role lipopolysaccharide/toll like receptor 4 signalling in chronic liver diseases. *Hepato Int.*, 4:659-672.
  14. Dinh, D., Ramadass, B., Kattula, D., Sarkar, R., Braunstein, P., Tai, A., y otros. (2016). Longitudinal Analysis of the Intestinal Microbiota in Persistently Stunted Young Children in South India. *PLOS ONE*, 1-17.
  15. Trosvik, P., & de Muinck, E. (2015). Ecology of bacteria in the human gastrointestinal tract—identification of keystone and foundation taxa. *Microbiome*, 3:44.
  16. Ji , Z., Dai, Z., & Xu, Y. (2011). A new tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  regulator, lipopolysaccharides induced TNF- $\alpha$  factor, is associated with obesity and insulin resistance . *Chin Med J*, 124:177-182.
  17. Gardner, C., Wylie-Rosett, J., Gidding, S. S., Steffen, L.M., Johnson, R. K., et al. (2012). Nonnutritive sweeteners: current use and health perspectives. *Journal of the American Heart Association*, 126: 509-519.
  18. García-Almeida, J. M., Gracia, M., Casado-Fdez, & García-Alemán, J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*, 28:17-31.
  19. Duffy, V., & Sigman-Grant, M. (2004). *Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. Journal of the American Dietetic Association*. 14: 255-275.

20. Fitch, C., & Keim, K. (2012). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, **112**: 739-758.
21. World Health Organization. (2013). *World Health Organization*. Recuperado el 21 de Abril de 2014, de 10 datos sobre la obesidad: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/index1.html>
22. Gasmalla, M., Yang, R., & Hua, X. (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni: an alternative sugar replacer and its application in food industry. *Food Engineering Reviews*, **6**:150-162.
23. Joint Expert Committee on Food Additives. (2010). *Steviol glycosides*. Recuperado el 02 de Enero de 2016, de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph10/additive-442-m10.pdf>
24. COMMISSION REGULATION (EU) No 1131/2011. (11 de Noviembre de 2011). *Food Additives Legislation*. Recuperado el 02 de Enero de 2016, de [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1131\\_2011.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1131_2011.pdf)
25. Urban, J., Carakostas, M., & Taylor, S. (2015). Steviol **glycoside** safety: are highly purified glycoside sweeteners food allergens? *Food and Chemical Toxicology*, **75**: 71-78.
26. Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., y otros. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, **514**: 181-198.
27. Anton, S., Martin, C., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W., Geiselman, P., y otros. (2010). Effects of *stevia*, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. **55**: 37 - 43.
28. Simon, B., Parlee, S., Learman, B., Mori, H., Scheller, E., Cawthorn, W., et al. (2013). Artificial Sweeteners Stimulate Adipogenesis and Suppress Lipolysis Independently of Sweet Taste Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 32475–32489.



29. Kunová, G., Rada, V., Vidailiac, A. y Lisova, I. (2013). Utilisation of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) by lactobacilli and bifidobacteria in *in vitro* conditions. *Folia Microbiologica*, 59: 251-255.
30. Whitehouse, C., Boullata, J., & McCauley, L. (2008). The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *AAOHN Journal*, 251-259.
31. Figlewicz, D., Ioannouc, G., & Jaya, J. (2009). Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav*, 618–624.
32. Swithers, S., Martin, A., & Davidson, T. (2010). High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology & Behavior*, 55–62.
33. Anton, S., Martin, C., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W., Geiselman, P., y otros. (2010). Effects of *stevia*, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. **55**: 37 - 43.
34. Brown, R., De Banate, M., & Rother, K. (2010). Artificial Sweeteners: A systematic review of metabolic effects in youth. *International Journal of Pediatric Obesity*, 305–312.
35. Zigman, J., Bouret, S., & Andrews, Z. (2016). Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. *Trends Endocrinol Metab*, 54–63.
36. Steinert, R., Frey, F., Töpfer, A., Drewe, J., & Beglinger, C. (2011). Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *British Journal of Nutrition*, 1320–1328.
37. Payne, A., Chassard, C., & Lacroix, C. (2012). Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host–microbe interactions contributing to obesity. *Obesity reviews*, 799–809.
38. Suez, J., Korem, T., Zilberman-Schapira, G., Segal, E., & Elinav, E. (2015). Non-caloric artificial sweeteners and the microbiome: findings and challenges. *Gut Microbes*, 149--155.

39. Estrada-Velasco, B., Cruz, M., García-Mena, J., Valladares Salgado, A., Peralta Romero, J., Guna Serrano, M., y otros. (2015). La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutrición Hospitalaria*, 1074-1081.
40. Grembecka, M. (2015). Natural sweeteners in a human diet. *National Institute of Public Health*, 195-202.
41. Aguilar, J.A. (1999). *¿Dulce alternativa? Edulcorantes artificiales*. Procuraduría Federal del Consumidor. Consumidor, 58-61.
42. World Health Organization. (2006). *World Health Organization*. Recuperado el 07 de Enero de 2016, de WHO Child growth standards: [http://www.who.int/childgrowth/standards/Technical\\_report.pdf?ua=1](http://www.who.int/childgrowth/standards/Technical_report.pdf?ua=1)
43. "Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad". Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010. Diario Oficial de la Federación, 04 de Agosto de 2010.
44. Secretaría de Salud. (2013). *Ley General de Salud*. México: Diario Oficial de la Federación.
45. Salud, S. d., Secretaría de medio ambiente, r. n., Industrias Vinícolas Pedro DOMEQ, S. D., C.V, J. d., LICONSA, L. i., C.V., S. A., y otros. (12 de Diciembre de 1995). *Secretaría de Salud*. Recuperado el 25 de 08 de 2016, de Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
46. Salud, S. d., Secretaría de Agricultura, G. y., Secretaría de Medio Ambiente, R. N., Nacional, I. P., C.V., I. V., & C.V, J. d. (1995). *Salud.gob*. Recuperado el 26 de 08 de 2016, de Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placalSMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>

47. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Prevotella tanneriae* Moore et al. (ATCC® 51259™) :  
<https://www.atcc.org/~media/85260BB7A69A4640A5BB1042498807E4.ashx>
48. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* (Beijerinck) Kluyver and van Niel (ATCC® 29577™) :  
<https://www.atcc.org/~media/F63FE3883EBD485389C1F71EE27D3D31.ashx>
49. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Bacteroides* sp. (ATCC® 49058™) :  
<https://www.atcc.org/~media/85260BB7A69A4640A5BB1042498807E4.ashx>
50. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Enterococcus* sp. (ATCC® BAA-782™):  
<https://www.atcc.org/~media/F63FE3883EBD485389C1F71EE27D3D31.ashx>
51. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers (ATCC® 25285™):  
<https://www.atcc.org/~media/F63FE3883EBD485389C1F71EE27D3D31.ashx>
52. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 3017, de *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (Jordan) Hormaeche and Edwards, subsp. nov. (ATCC® 13047™) :  
<https://www.atcc.org/~media/E6FA2163B72E4DCD880719A2612F2C92.ashx>
53. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* Katagiri et al. (ATCC® 15521™) :  
<https://www.atcc.org/~media/39839AC0CB884212A57DBF6936371D91.ashx>
54. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Lactobacillus fermentum* Beijerinck (ATCC® 14932™) :  
<https://www.atcc.org/~media/39839AC0CB884212A57DBF6936371D91.ashx>
55. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) Hansen and Lessel (ATCC® 393™) :  
<https://www.atcc.org/~media/39839AC0CB884212A57DBF6936371D91.ashx>

56. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Lactobacillus reuteri* Kandler et al. (ATCC® 23272™): <https://www.atcc.org/~media/39839AC0CB884212A57DBF6936371D91.ashx>
57. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Akkermansia muciniphila* Derrien et al. (ATCC® BAA-835™) : <https://www.atcc.org/~media/45E208A3191F4C7EA9B7E1063EB55303.ashx>
58. ATCC. (2016). ATCC. Recuperado el 11 de 06 de 2017, de *Akkermansia muciniphila* Derrien et al. (ATCC® BAA-835™): <https://www.atcc.org/~media/F63FE3883EBD485389C1F71EE27D3D31.ashx>
59. T, J., C, L., CP, B., F, R., & C, C. (2013). Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol* , 1462-2920.
60. Moráis López, A. d., Ros Arnal, I., Herrero Álvarez, M., Rodríguez Martínez, G., & GETNI, g. (2011). Cálculo de los requerimientos energético-proteicos para el soporte nutricional en la práctica clínica. *Acta Pediátrica*, 211-216.
61. Moura, P., Barata, R., Carvalheiro, F., Loureiro-Dias, M., & Esteve, M. (2007). In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Science and Technology*, 963–972.
62. Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C., & Ross, R. (2016). Gut *Bifidobacteria* Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in Microbiology*, 1-9.
63. Hopkins MJ, S. R. (2001). Age and disease related changes in. *Gut*, 198-205.
64. J. Preising, D. P. (2010). Selection of *bifidobacteria* based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 3048–3051.
65. Grimm, V., Westermann, C., & Riedel, C. (2014). *Bifidobacteria*-Host Interactions—An Update on Colonisation Factors. *BioMed Research International*, 1-10.

66. Di Gioia, D., Aloisio, I., Mazzola, G., & Biavati, B. (2014). Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their implications as probiotics in infants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 563-577.
67. Tannock, G. W. (2010). "Analysis of bifidobacterial populations in bowel ecology studies" in *Bifidobacteria, Genomics and Molecular Aspects*, eds B. Mayo and D. van Sinderen (Norwich: Caister Academic Press), 1–15.
68. Besten, G., Eunen, K., Groen, A., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 2325–2340.
69. Byrne, C., Chambers, E., Morrison, D., & Frost, G. (2015). The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, 1331–1338.
70. Golińska E, Tomusiak A, Gosiewski T, Więcek G, Machul A, Mikołajczyk D, Bulanda M, Heczko PB, Strus M. Virulence factors of Enterococcus strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2013; 19(23): 3562-3572
71. Bang C, Weidenbach K, Gutschmann T, Heine H, Schmitz RA (2014) The Intestinal Archaea *Methanosphaera stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* Activate Human Dendritic Cells. *PLoS ONE* 9(6): e99411.
72. Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, Ottman N, Belzer C, Huhtinen H, de Vos WM, Satokari R. 2015. *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. *Appl Environ Microbiol* 81:3655–3662.
73. Ganesh BP, Klopffleisch R, Loh G, Blaut M (2013) Commensal *Akkermansia muciniphila* Exacerbates Gut Inflammation in *Salmonella typhimurium*-Infected Gnotobiotic Mice. *PLoS ONE* 8(9): e74963.
74. Anderson, R., Young, W., Clerens, S., Cookson, A., McCann, M., Armstrong, K., y otros. (2013). Human Oral Isolate *Lactobacillus fermentum* AGR1487 Reduces Intestinal Barrier Integrity by Increasing the Turnover of Microtubules in Caco-2 Cells. *PLOS ONE*, e7877- e7877.

75. Belfiore, C., Raya, R., & Vignolo, G. (2017). Identification, technological and safety characterization of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from Argentinean anchovies (*Engraulis anchoita*). SpringerPlus, 257-265.
76. Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J., Druart, C., Bindels, L., y otros. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. PNAS, 9067- 9071.
77. Ghoshal, U., Shukla, R., Srivastava, D., & Ghoshal, U. (2016). Irritable Bowel Syndrome, Particularly the Constipation-Predominant Form, Involves an Increase in *Methanobrevibacter smithii*, Which Is Associated with Higher Methane Production. Gut and Liver, 932-938.
78. Gorvitovskaia, A., Holmes, S., & Huse, S. (2016). Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. Microbiome, 1-12.
79. Lee, B., Yin, X., Griffey, S., & Marco, M. (2015). Attenuation of Colitis by *Lactobacillus casei* BL23 Is Dependent on the Dairy Delivery Matrix. Appl Environ Microbiol. , 6425–6435.
80. Liu, Y., Fatheree, N., Mangalat, N., & Rhoads, J. (2010). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. , G1087–G1096.
81. Mikelsaar, M., & Zilmer, M. (2009). *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. Microb Ecol Health Dis., 1–27.
82. Moran, J., Walter, J., Tannock, G., Tonkonogy, S., & Sartor, R. (2009). *Bifidobacterium animalis* Causes Extensive Duodenitis and Mild Colonic Inflammation in Monoassociated Interleukin-10 Deficient Mice. National Institute Health, 1022–1031.
83. Murphy, E., Mörgelin, M., Cooney, J., & Frick, I.-M. (2011). Interaction of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* with the kallikrein–kinin system. Microbiology, 2094-2105.
84. Poutahidis, T., Kleinewietfeld, M., Smillie, C., Levkovich, T., Perrotta, A., Bhela, S., y otros. (2013). Microbial Reprogramming Inhibits Western Diet-Associated Obesity. PLOS ONE, e68596- e68596.

85. Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulo, K., Santarmak, V., Aindeli, G., Tompoulido, E., Lampranido, E., y otros. (2016). Lactobacillus casei Exerts Anti-Proliferative Effects Accompanied by Apoptotic Cell Death and Up-Regulation of TRAIL in Colon Carcinoma Cells. PLOS ONE, 1-20.
86. Woting, A., & Blaut, M. (2016). The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. Nutrients, 202-221.

## 14. ANEXOS

### ANEXO 1

#### Instrucciones para la toma de muestra de heces

1. Recepción del paquete que consta de: una hielera con una bolsita de gel, dos frascos uno sin velita y otro con velita, ambos traen una cuchara pegada.



2. Poner a congelar el gel.
3. Tomar la muestra de la parte final de la primera defecación del día.

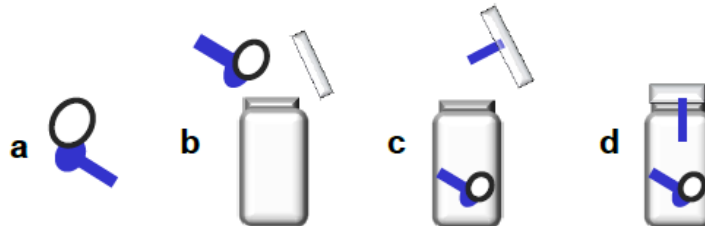
Extremo



4. Con la cuchara tomar la muestra y depositarla en el frasco (sin velita) lo más rápido posible, evitando mantener el frasco abierto.



5. Desprender la otra cuchara, tomar la segunda muestra depositarla en el frasco, encender la vela y taparlo.



6. Colocar los frascos en la hielera y agregar el gel congelado.



## ANEXO 2

### Carta de Consentimiento Informado

Por medio de la presente yo, \_\_\_\_\_, autorizo y acepto participar en la investigación titulada “*Cambios en la microbiota intestinal de individuos en diferentes etapas de vida y su relación con efectos clínico y nutricionales observados con del consumo de stevia*”

Se me ha explicado el procedimiento que se llevará a cabo en este estudio, siendo libre de retirarme del mismo si así lo deseara y acepto que los datos y los resultados de los exámenes diagnóstico (medidas antropométricas, examen físico y exámenes laboratoriales) sean analizados y discutidos. Y autorizo sean utilizados para su publicación en textos especializados.

Con el conocimiento de que nunca seré identificado y siempre se mantendrá el anonimato y confidencialidad de mi identidad personal. Los resultados se analizarán como grupo y mi nombre no aparecerá en la publicación.

Estoy enterado(a) que este estudio es confidencial y libre de costo.

ATENTAMENTE:

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma

\_\_\_\_\_  
TESTIGO 1

\_\_\_\_\_  
TESTIGO 2

**ANEXO 3. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN**  
**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA DE BACTERIAS DEL CONTENIDO INTESTINAL E**  
**IDENTIFICACIÓN DE CEPAS ESPECÍFICAS POR QPCR**

Junio, 2016

1. OBJETIVO

Identificar y cuantificar cepas consideradas como marcadores en el contenido intestinal de evaluaciones de digestión *ex vivo*.

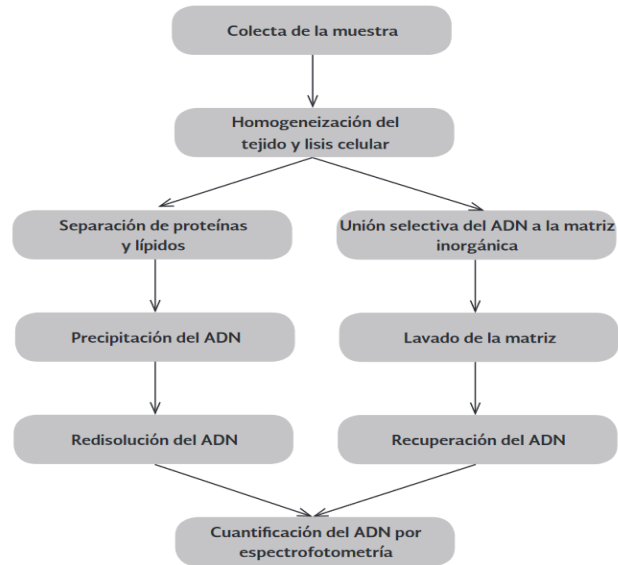
2. INTRODUCCIÓN

**Extracción y purificación de DNA**

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal.

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite. (Alejos Velázquez, Aragón Martínez, & Cornejo Romero)

El procedimiento genérico se realiza de acuerdo a la siguiente figura:



### Cuantificación de DNA

El método más utilizado para cuantificar DNA es por absorbancia a 260nm, utilizando un espectrofotómetro o un Nanodrop. Es útil para preparaciones altamente purificadas de ácidos nucleicos. Se mide en un rango de absorbancia de 260 a 280 nm, para determinar si existen contaminantes proteicos.

Las lecturas se realizan en densidad de onda de 260nm, la cual permite calcular la concentración de ácido nucleico de una muestra. Ya que una densidad óptica de 1 corresponde a ~50µg/mL de una doble cadena de DNA.

El ratio entre las lecturas de 260nm y 280nm proveen una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las muestras puras deben encontrarse entre valores de 1.8 a 2.0. Si existe una contaminación significativa con proteína o fenol, la relación 260/280 será menor a estos valores y no se puede llevar a cabo una cuantificación exacta.

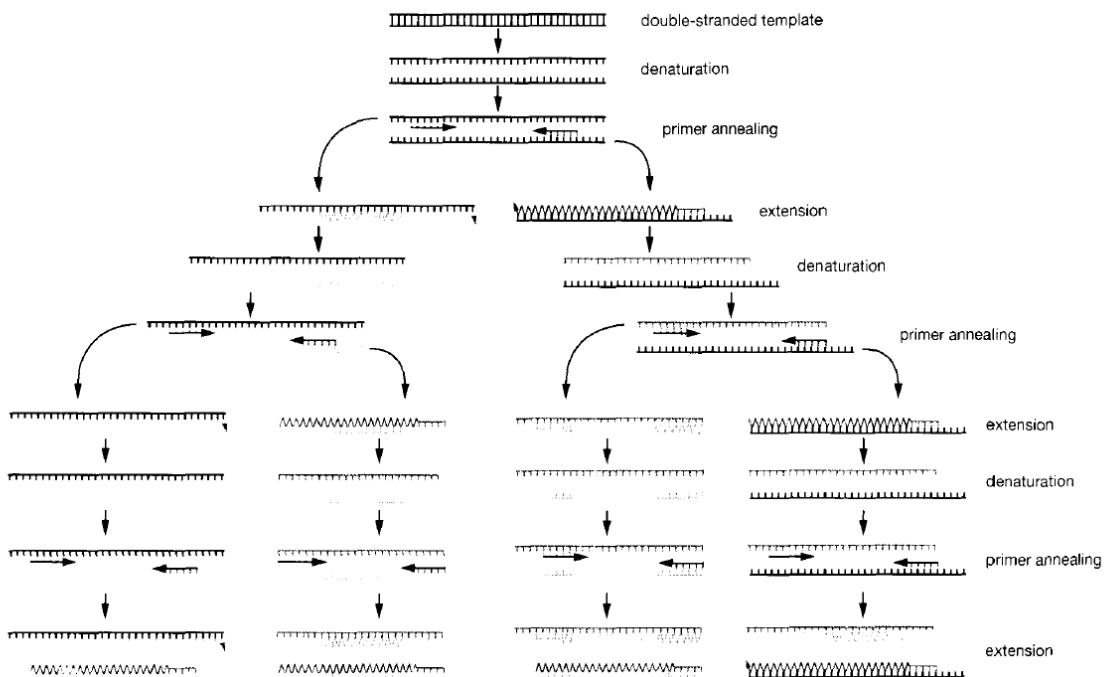
Debido a que este método es rápido, simple y no destructivo, es el método de elección para la cuantificación tanto de DNA como de RNA en soluciones puras concentradas.

Esta metodología se basa en que las purinas y pirimidinas absorben luz UV. Es decir, que la cantidad de energía absorbida a una particular longitud de onda va en función de la concentración del material que lo absorbe. (Sambrook, 2001)

### qPCR

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica capaz de producir copias de una secuencia específica de DNA por el factor  $10^6$ , facilitando una variedad de análisis subsecuentes y manipulaciones.

La PCR ha sido utilizada para examinar variaciones de secuencias de nucleótidos y reordenamientos cromosómicos para una mayor eficiencia en la clonación en las secuencias genómicas, para secuenciación directa mitocondrial y DNAs genómicos, y para la detección de patógenos virales. La siguiente figura muestra el procedimiento de amplificación de una PCR básica:



**FIGURE 8-2 Sequence of Amplification in the PCR**

The diagram shows the steps involved in the first few rounds of a PCR. The original template (*top line*) is double-stranded DNA and the leftward and rightward oligonucleotide primers are shown as ← and →, respectively. The products of the first few rounds of the amplification reaction are heterogeneous in size; however, the tract of DNA lying between the two primers is preferentially amplified and quickly becomes the dominant product of the amplification reaction.

La técnica de PCR también puede utilizarse para estimar la concentración de un DNA objetivo, a la cual se le ha denominado qPCR. Esta variación de PCR representa un reto técnicamente, ya que, la PCR, al ser un proceso exponencial, las pequeñas diferencias en eficiencia en cada ciclo de la reacción, pueden dirigir a grandes diferencias en el rendimiento del producto amplificado.

Con la qPCR existe la capacidad para detectar concentraciones picomolares de una secuencia objetivo y para ser lo suficientemente precisa como para discriminar al

doble las diferencias en la concentración de una secuencia específica en diferentes muestras.

Existen dos tipos de controles para monitorear la variabilidad tubo a tubo:

- Estándares endógenos: son secuencias control, que están presentes en la misma preparación de DNA como en las secuencias objetivo.
- Referencia externa: son moléculas de DNA o RNA añadidas en cantidades conocidas a una serie de reacciones de amplificación.

## 2. ABREVIATURAS

- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- RNA: Ácido ribonucleico
- RNase: Hidrolasa de ácido ribonucleico.
- $\mu$ L: microlitros
- min: minuto
- mL: mililitros
- qPCR: Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa.
- T0, 1 y 3: Tiempo 0, Tiempo 1 y Tiempo 3.
- Rpm: Revoluciones por minuto.

## 3. MATERIALES

- Juego de micropipetas exclusivas para biología molecular.
- Muestras almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por hasta 2 meses o a  $-80^{\circ}$  por más tiempo:
  - Colon ascendente: T0, T1 y T3.
  - Colon transverso: T0, T1 y T3.
  - Colon descendente: T0, T1 y T3.
  - Cultivos de cepas puras (*Lactobacillus rhamnosus* NH001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus gasserii* LG-36, *Lactobacillus plantarum* PL-115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA835).
- Guantes de nitrilo, libres de polvo.

- Puntas de 1000, 200 y 10  $\mu$ L estériles.
- Microtubos de 2.0, 1.5 y 0.2 mL
- Etanol 70%
- Gasa
- Microplaca thermo para PCR

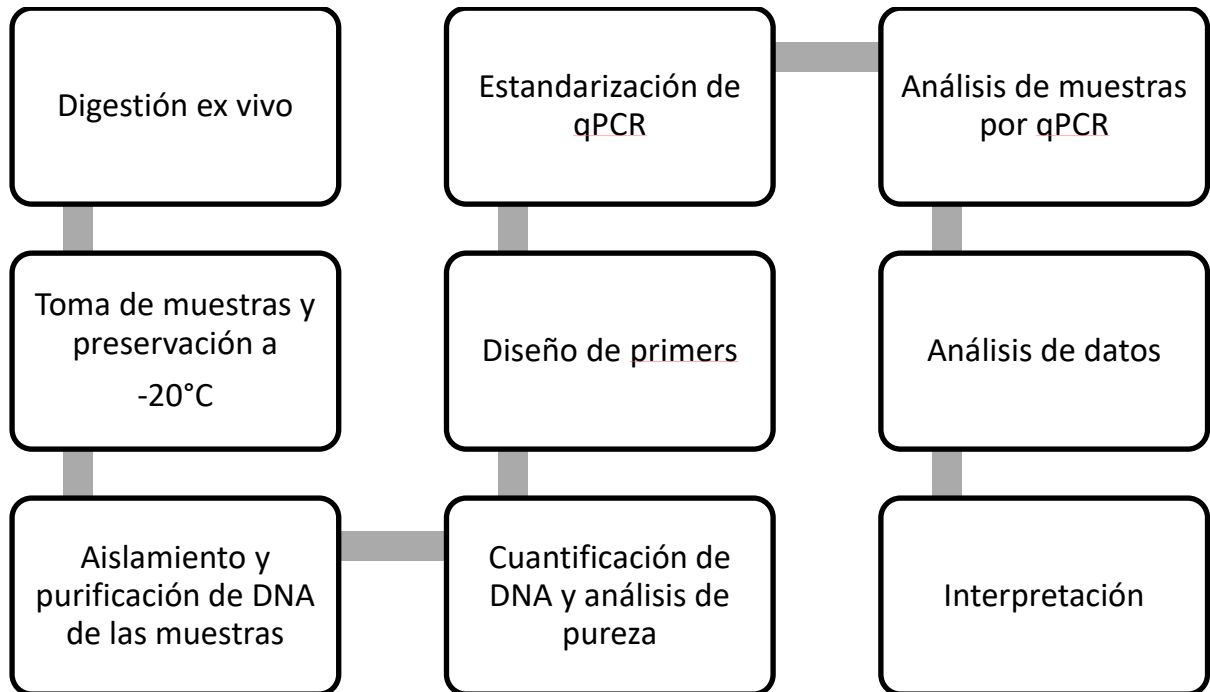
#### 4. REACTIVOS

- DNeasy Plant Mini Kit marca Qiagen, No. catálogo 69104
- RNase A Qiagen No. 19101
- GoTaq PCR Core System I
- Oligonucléotidos (forward y reverse) del proveedor T4oligo
- dNTP Mix, PCR Grade Qiagen No. 201900

#### 5. EQUIPOS

- Congelador -20°C Haier (para preservar las muestras) con No. de inventario 97790, ubicado en el laboratorio de Digestión *ex vivo*.
- Minicentrífuga marca Labogene Con No. de inventario 9369, ubicado en el laboratorio de Digestión *ex vivo*.
- Vórtex marca Corning, No. de inventario 9504.
- Termoblock marca Ika con No. de inventario 9942, ubicado en el laboratorio de Digestión *ex vivo*.
- Nanodrop o espectrofotómetro Multiskan GO marca Thermo Scientific con placa  $\mu$ Drop™ plate con No. de catálogo 11051, ubicado en el Laboratorio de Digestión *ex vivo*.
- Termociclador PikoReal™ Real-Time PCR System marca Thermo Fisher Scientific con número de catálogo 9787, ubicado en el Laboratorio de Digestión *ex vivo*.
- Cámara de electroforesis con fuente (en caso de visualizar en gel)

## 6. DIAGRAMA DE FLUJO



## 7. DESARROLLO DEL MÉTODO

El presente protocolo es aplicable para muestras intestinales y cultivos de bacterias.

### 1. Extracción y purificación de DNA de las muestras de digestión utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2013-2016) con protocolo modificado:

16. Descongelar las muestras en hielo.
17. Centrifugar la muestra a 8000rpm por 5 min a TA. Eliminar el sobrenadante y repetir el proceso hasta empastillar las células.
18. Añadir a la pastilla 400  $\mu$ L de buffer AP1 y 4  $\mu$ L de RNasa A (100mg/mL) y agitar vigorosamente en vórtex durante 30s.
19. Incubar la mezcla durante 10 min a 65°C, mezclando cada 2 min (5 veces) en vórtex durante la incubación.
20. Añadir 130  $\mu$ L de buffer AP2 al lisado. Mezclar e incubar durante 5 min en hielo.
21. Centrifugar el lisado a 14000 rpm por 5 min.
22. Pipetear el lisado dentro de la columna de QIAshredder Mini spin (columna color lila) puesta dentro de un tubo de colección de 2 mL, y centrifugar durante 2 min a 14000 rpm. Tener cuidado de no deshacer la pastilla formada en la parte inferior del tubo cuando continúe con el paso 7.

23. Quitar la columna y desecharla. Transferir la fracción líquida en un tubo nuevo, teniendo cuidado de no pipetear el sólido blanco de la parte inferior del tubo. Durante el traslado medir el volumen (necesario para el siguiente paso).
24. Añadir 1.5 volúmenes de buffer AP3/E al lisado aclarado y mezclar con la pipeta por inmersión. (el buffer AP3 contiene etanol, que ayuda a precipitar el DNA de manera que podamos aislarlo de los otros compuestos que se encuentran aún en solución).
25. Pipetear 650  $\mu$ L de la mezcla del paso anterior a la columna de centrifugación DNeasy Mini Spin (columna blanca), colocada en un tubo de colección de 2 mL y centrifugar durante 1 min a 8000 rpm. Descartar el filtrado (decantar).
  - Esta columna contiene pequeñas perlas de sílice (vidrio) a las que se adhiere el DNA. De esta manera, el DNA se pegará en el filtro y cualquier residuo restante se lava a través de ésta. Nuestro ADN se encuentra ahora en el filtro de la columna.
26. Repetir el paso 10 y decantar el filtrado.
27. Colocar la columna DNeasy Mini Spin (blanca) en un nuevo tubo de recolección de 2mL, añadir 500  $\mu$ L de buffer AW a la columna, y centrifugar durante 2 min a 14000 rpm hasta que la membrana esté seca. Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de recolección.
28. Añadir nuevamente 500  $\mu$ L de buffer AW y centrifugar durante 2 minutos a 14000 rpm para secar la membrana. Eliminar el flujo. Volver a centrifugar por 1 minuto más para eliminar cualquier residuo líquido que aún posea.
29. Transferir la columna DNeasy Mini Spin a un tubo nuevo de 1.5 mL y pipetear 50  $\mu$ L de buffer AE directamente sobre la membrana de la columna blanca. Incubar durante 10 min a TA, y centrifugar durante 1 min a 8000 rpm para eluir. Guardar el filtrado contenido en hielo y transferir nuevamente a la columna DNeasy Mini Spin a otro tubo nuevo. Repetir el paso anterior y desechar la columna al final. En este paso se disuelve el DNA en la solución AE y es lavado de las perlas. Al final de este paso, se tendrá el DNA en la solución del tubo colector, no en el filtro.
30. Cuantificar el DNA en Nanodrop, introduciendo primeramente 2  $\mu$ L de agua destilada como blanco y posteriormente colocando 2  $\mu$ L de cada muestra para obtener la concentración de DNA ng/  $\mu$ L y la pureza de acuerdo a la relación 260/280nm, la cual debe encontrarse dentro del rango 1.8-2.0.



### 3. Identificación y cuantificación de microorganismos específicos por qPCR.

- De acuerdo a los resultados de la cuantificación del DNA, realizar el cálculo de cada componente a agregar en la reacción de acuerdo al protocolo de la GoTaq PCR Core System I, como se muestra en la tabla

**Table 1. Recommended Reaction Volumes and Final Concentrations of the GoTaq® PCR Core System Components.**

Component	Component Volume	Final Concentration
MgCl <sub>2</sub> , 25mM Solution (see Section 4.B)	2.0–8.0μl	1.0–4.0mM
5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer OR 5X Green GoTaq® Flexi Buffer	10μl	1.0X
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	1μl	200μM each
upstream primer	5–50pmol	0.1–1.0μM
downstream primer	5–50pmol	0.1–1.0μM
GoTaq® DNA Polymerase, 5u/μl	0.25μl	1.25u/50μl
template DNA	variable	<0.5μg/50μl
Nuclease-Free Water to a final volume of	<b>50μl</b>	



Thaw the 25mM MgCl<sub>2</sub> solution and GoTaq® Flexi Buffer completely and vortex thoroughly before use. We strongly advise optimizing the MgCl<sub>2</sub> concentration.

- Realizar curvas de concentración del DNA de las cepas puras.
- Realizar las mezclas manteniéndolas en hielo.
- Colocar las mezclas en la placa para el termociclador Thermo.
- De acuerdo a las especificaciones de la Taq polimerasa determinar el número de ciclos y las temperaturas, como se muestra en la tabla:

**Table 2. Thermal Cycling Guidelines for PCR Amplification.**

Step	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	95°C	2 minutes	1 cycle
Denaturation	95°C	0.5–1 minute	
Annealing	42–65°C*	0.5–1 minute	25–35 cycles
Extension	72°C	1 minutes/kb	
Final Extension	72°C	5 minutes	1 cycle
Soak	4°C	indefinite	1 cycle

These guidelines apply to target sequences between 200–2,000bp and may need to be adapted for your thermal cycler.

\*The annealing temperature for a specific amplification reaction will depend upon the sequences of the two primers. See Section 4.G for discussions on how to determine optimal annealing temperatures for PCR amplification.

12. Extraer los datos del termociclador y visualizar en el software para realizar la cuantificación de acuerdo a las curvas.

Nota: Para visualizar la amplificación, se puede realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizará un Análisis de Varianza Multifactorial para determinar los cambios en la concentración de bacterias en diferentes tiempos de digestión para cada sección del colon.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alejos Velázquez, L., Aragón Martínez, M., & Cornejo Romero, A. (s.f.). *INECC*. Recuperado el 20 de 06 de 2016, de Extracción y Purificación de ADN: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extraccion.pdf>
- QIAGEN. (2013-2016). *QIAGEN*. Recuperado el 10 de 06 de 2016, de <https://www.qiagen.com/mx/shop/sample-technologies/dna/dna-preparation/dneasy-plant-mini-kit/#productdetails>
- Promega. (03/2009). *Promega*. Recuperado el 23 de 06 de 2016, de <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/gotaq%20pcr%20core%20systems%20protocol.pdf>
- Sambrook, J. & Rusell, D. W. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Tercera edición. Volumen 1. 2001: Estados Unidos de América.