

**BÚSQUEDA DE UNA COMBINACIÓN SIMBIÓTICA CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA CONTRA LEVADURAS ENCONTRADAS EN LA MICROBIOTA
INTESTINAL EN INDIVIDUOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
EN LA OPCIÓN TERMINAL DE BIOTECNOLOGÍA MÉDICA Y
FARMACÉUTICA**

PRESENTA

M.C. RICARDO GARCÍA GAMBOA

DIRECTOR: DRA. MARISELA GONZÁLEZ AVILA

CO-DIRECTOR: ANDRÉS MOYA

ASESOR: DR. JORGE BRAVO MADRIGAL

ASESOR: DRA. CAROLINA SENÉS GUERRERO

GUADALAJARA, JALISCO, MARZO, 2022



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 16 de marzo de 2022
CP/578/2022

RICARDO GARCÍA GAMBOA

ESTUDIANTE DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1802DBAS6400
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Búsqueda de una combinación simbiótica con actividad antifúngica contra levaduras encontradas en el microbiota intestinal en individuos con sobrepeso y obesidad**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Marisela González Ávila. Directora de tesis
Dr. Andrés Moya Simarro. Co-director de tesis
Dr. Jorge Bravo Madrigal. Asesor de tesis
Dra. Carolina Senés Guerrero. Asesora de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



Guadalajara, Jalisco a 1 de marzo de 2022

**CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE**

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Ricardo García Gamboa**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**BÚSQUEDA DE UNA COMBINACIÓN SIMBIÓTICA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA LEVADURAS ENCONTRADAS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN INDIVIDUOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD**” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Doctor en Ciencias en Innovación Biotecnológica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 1 del mes de marzo del año dos mil veintidós.

Dra. Marisela González Avila



Director de tesis

Dr. Andrés Moya

MOYA
SIMARRO
ANDRES -
Firmado digitalmente por
MOYA SIMARRO
ANDRES - 19829106R
Fecha: 2022.03.01

Co-director de tesis

19829106R 18:10:19 +01'00'

Dr. Jorge Bravo Madrigal



Asesor

Dra. Carolina Senés Guerrero



Asesora

Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) por el financiamiento otorgado a esta investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) le agradezco la beca recibida durante el doctorado.

Quisiera expresar mi muy agradecimiento a la Dra. Marisela González Avila, cuyo apoyo fue fundamental para este trabajo de investigación. También me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al comité evaluador, Dr. Andrés Moya, Dr. Jorge Bravo Madrigal y a la Dra. Carolina Senés Guerrero, por proporcionar valiosa retroalimentación a lo largo de este proyecto.

Índice de contenido

1. Resumen	12
2. Introducción	14
3. Marco teórico.....	15
3.1 Microbiota intestinal	15
3.2 Micobiota Intestinal	15
3.3 Hongos y levaduras.....	15
3.4 Disbiosis intestinal	15
3.5 Eubiosis intestinal	15
3.6 Prebióticos, probióticos y simbióticos	16
3.7 Obesidad	16
3.8 Antecedentes.....	17
3.8.1 Microbiota intestinal	17
3.8.2 Micobiota intestinal	17
3.8.3 Micobiota intestinal y su relación con la obesidad	18
3.8.4 Tratamiento farmacológico en infecciones fúngicas	19
3.8.5 Métodos utilizados en la identificación de la micobiota intestinal	19
3.8.6 Simbióticos contra patógenos intestinales	20
4. Planteamiento del problema	22
5. Justificación	23
6. Hipótesis	24
7. Objetivos.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos	25
8. Metodología.....	26

8.1 Diagrama general de la metodología	26
8.2 Materiales y métodos	26
8.2.1 Estudio de la microbiota intestinal cultivable	26
8.2.2 Sujetos.....	26
8.2.3 Análisis dietético.....	27
8.2.4 Evaluación antropométrica	27
8.2.5 Análisis bioquímico	27
8.2.6 Crecimiento de levaduras por cultivo en placa	28
8.2.7 Identificación de levaduras por MALDI-TOF.....	28
8.2.8 Análisis estadístico	28
8.3 Estudio del microbioma y micobioma intestinal	29
8.3.1 Sujetos.....	29
8.3.2 Extracción de material genético y amplificación.....	29
8.3.3 Preparación de librerías y secuenciación	30
8.3.4 Análisis bioinformático.....	31
8.4 Evaluación de simbióticos con efecto de inhibición de crecimiento contra <i>Candida albicans</i>	32
8.4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	32
8.4.2 Obtención de los sobrenadantes libres de células (SLC).....	32
8.4.3 Determinación de ácidos grasos de cadena corta en los SLC	32
8.4.4 Evaluación del efecto inhibitorio de los SLC contra el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	33
8.4.5 Evaluación de la inhibición de formación de biopelículas contra <i>Candida albicans</i> ...	33
8.5.6 Análisis estadístico	34
9. Resultados.....	34
9.1 Estudio de la microbiota intestinal cultivable	34

9.2 Estudio del microbioma y micobioma intestinal	45
9.3 Evaluación de simbióticos con efecto de inhibición de crecimiento contra <i>Candida albicans</i>	63
10. Discusión de los resultados	78
10.1 Estudio de la microbiota intestinal cultivable	78
10.2 Estudio del microbioma y micobioma intestinal	83
10.3 Evaluación de simbióticos con efecto de inhibición de crecimiento contra <i>Candida albicans</i>	91
11. Conclusiones.....	97
12. Perspectivas	99
13. Referencias	100
14. Anexos	122

Índice de tablas

Tabla 3.1 Clasificación del índice corporal basado en el esquema de la organización mundial de la salud (WHO).....	16
Tabla 9.1 Características sociodemográficas, antropométricas y clínicas de los participantes.	36
Tabla 9.2. Conteos en placa de levaduras y hongos filamentosos aislados de la microbiota intestinal de los participantes.....	37
Tabla 9.3. Cuantificación de las levaduras identificadas de la microbiota cultivable a partir de muestras fecales de los participantes.....	38
Tabla 9.4 Comparación del análisis discriminante lineal entre los grupos (normopeso, con sobrepeso y con obesidad.	39
Tabla 9.5. Análisis dietético de los participantes.	41
Tabla 9.6 Características sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y dietéticas de los participantes.....	50
Tabla 9.7 Clasificación taxonómica a nivel de género de las secuencias bacterianas.....	51
Tabla 9.8 Abundancia de las principales especies bacterianas en el microbioma intestinal de sujetos normopeso, con sobrepeso y obesidad	52
Tabla 9.9 Clasificación taxonómica a nivel de género de las secuencias fúngicas	53
Tabla 9.10 Abundancia de las principales especies fúngicas en la microbiota intestinal de sujetos normopeso, con sobrepeso y obesidad	55
Tabla 9.11. Descripción de los sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de las bacterias probióticas sometidas a diferentes fuentes de carbono.....	64
Tabla 9.12 Determinación de los ácidos grasos de cadena corta en los SLC obtenidos a partir de los probióticos	65
Tabla 9.13 Descripción de los sobrenadantes obtenidos de las bacterias probióticas.....	74
Tabla 9.14 Determinación de los ácidos grasos de cadena corta obtenidos de los probióticos en la metabolización de dextrosa e inulina como fuente de carbono.	76

Índice de figuras

Figura 8.1 Diagrama general de la metodología.....	26
Figura 9.1. Análisis de discriminante lineal de la micobiota cultivable a partir de las heces de sujetos normopeso, con sobrepeso y con obesidad..	40
Figura 9.2. Análisis de correlación entre la micobiota intestinal cultivable de los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad con las variables antropométricas.	42
Figura 9.3. Análisis de correlación entre la micobiota intestinal cultivable de los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad con las variables bioquímicas.	43
Figura 9.4. Análisis de correlación entre la micobiota intestinal cultivable de los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad con las variables dietéticas.....	44
Figura 9.5 Análisis de la diversidad alfa bacteriana y fúngica de la microbiota intestinal analizada en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad.....	45
Figura 9.6 Análisis beta del conjunto de datos en función de los géneros bacterianos y fúngicos encontrados en la microbiota intestinal de los participantes	46
Figura 9.7 Representación gráfica de las principales asignaciones taxonómicas bacterianas encontradas en el microbioma intestinal de los participantes a nivel de filo y género.....	47
Figura 9.8 Representación gráfica de las principales asignaciones taxonómicas fúngicas del microbioma intestinal a nivel de filo y género	49
Figura 9.9 Gráfico Volcano que muestra los géneros bacterianos y fúngicos diferenciales entre los grupos normopeso, con sobrepeso y con obesidad.	57
Figura 9.10 Comparación del Análisis de discriminante lineal de los géneros bacterianos y fúngicos encontrados en la microbiota intestinal en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad	58
Figura 9.11 Matriz de correlación de las bacterias intestinales de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad con las variables antropométricas, bioquímicas y dietéticas.....	59
Figura 9.12 Matriz de correlación de los géneros fúngicos intestinales de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad con las variables antropométricas, bioquímicas y dietéticas.....	61

Figura 9.13 Cinética de crecimiento de <i>Candida</i> spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de <i>Lactobacillus paracasei</i>	67
Figura 9.14 Cinética de crecimiento de <i>Candida</i> spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de <i>Lactobacillus plantarum</i>	68
Figura 9.15 Comparación de la prueba t pareada de los diferentes sobrenadantes al evaluar la inhibición del crecimiento contra <i>Candida albicans</i>	69
Figura 9.16 Prueba de inhibición de biopelícula contra <i>Candida</i> spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células.....	70
Figura 9.17 Cinética de crecimiento de <i>Candida</i> spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	72
Figura 9.18 Cinética de crecimiento de <i>Candida</i> spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de <i>Pediococcus acidilactici</i>	73
Figura 9.19 Prueba de inhibición de biopelícula contra <i>Candida</i> spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células.....	75

Abreviaturas

IMC: índice de masa corporal

OMS: organización mundial de la salud

FAO: organización para la agricultura y alimentación

UFC: unidades formadoras de colonias

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

ASV: variantes únicas de amplicón

PCoA: análisis de coordenadas principales

MALDI-TOF MS: espectrometría de masas (desorción / ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo)

ITS: separadores internos transcritos

SLC: sobrenadantes libres de células

DO: densidad óptica

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

CTFH: capacidad total de fijación de hierro

ALT/TGO: enzima alanina aminotransferasa

AST/TGO: enzima aspartato aminotransferasa

GGT: enzima gamma-glutamyl transferasa

LDH: enzima lactato deshidrogenasa

HDL: lipoproteínas de alta densidad

LDL: lipoproteínas de baja densidad

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

LDA: análisis discriminante lineal

MRS: medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe

YPD: medio de cultivo levadura-peptona-dextrosa

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

1. Resumen

La microbiota intestinal se refiere a la comunidad de microorganismos fúngicos que habitan en el tracto gastrointestinal (Kaźmierczak-Siedlecka et al., 2020; Strati et al., 2016). Su composición puede variar en los distintos estados fisiológicos y patológicos del cuerpo humano (Ott et al., 2008). En la práctica clínica se utilizan polienos, azoles, equinocandinas y fluoropirimidinas como tratamiento farmacológico en las infecciones por hongos. Sin embargo, existen limitaciones en la aplicación de estos fármacos debido a los efectos adversos conocidos y, en ocasiones, a su pobre actividad antifúngica. Además, pueden afectar a levaduras con actividad probiótica como *Saccharomyces boulardii* (Ishii et al., 2017).

Se ha demostrado que la obesidad puede tener relación con la comunidad bacteriana del tracto gastrointestinal, principalmente los filos bacterianos Firmicutes y Bacteroidetes (Cox et al., 2014; Ma et al., 2014). Sin embargo, no se ha encontrado suficiente información respecto a la microbiota intestinal y su relación con la obesidad. Borges et al. (2018) reportaron que en sujetos adultos con obesidad existe una menor diversidad fúngica en comparación con los adultos con peso normal. Rodríguez et al. (2015) reportaron que *Candida* spp., *Nakaseomyces* spp. y *Penicillium* spp. fueron los géneros fúngicos que presentaron mayor abundancia en sujetos con obesidad, mientras que en individuos normopeso se mostró mayor abundancia del género *Mocur* spp. y las especies *Mocur fuscus* y *Mocur racemosus*. Luan et al. (2015) reportaron que existe mayor diversidad en la microbiota intestinal de en individuos adultos con obesidad en comparación con los normopeso. Lo anterior podría indicar que existe relación e interacción entre la obesidad y la composición de la microbiota intestinal. Por otra parte, el “Kefir”, bebida fermentada con actividad probiótica contiene hasta 50 bacterias probióticas y levaduras (*Kluyveromyces marxianus*), ha demostrado tener efecto antiobesidad. Por lo tanto es posible especular que, tanto la microbiota como la micobiota pueden tener efecto modulador sobre la composición corporal y la pérdida de peso en el cuerpo humano (Bourrie et al., 2018; Dong-Hyeon et al., 2017; Rosa et al., 2017). La disbiosis intestinal se le conoce como el desequilibrio entre las bacterias protectoras y dañinas que habitan la microbiota intestinal (Kaur et al., 2011). Ocurre en trastornos prevalentes como la obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Yan et al., 2018), diabetes (Ilchmann et al., 2018), inflamación metabólica, aterosclerosis, hipertensión arterial (Kim et al., 2018) y enfermedad celiaca (Carding et al., 2015). Existen

reportes que indican que la comunidad fúngica en el tracto gastrointestinal puede participar en la disbiosis intestinal (Lemoine et al., 2020).

Varias técnicas son utilizadas para la identificación de la microbiota del tracto gastrointestinal, estas técnicas incluyen cultivo, microscopia, secuenciación, espectrometría de masas (desorción / ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) (MALDI-TOF) y metagenómica (Hamad et al., 2017). Los avances en la secuenciación masiva han permitido el estudio de la microbiota tanto de la composición (taxonomía) como de sus funciones mediante técnicas ómicas. La región ITS ha sido descrita como el marcador universal conveniente para la identificación de hongos y levaduras (Ciardo et al., 2010; Guo et al., 2010).

Por otra parte, el desarrollo de nuevos productos capaces de modular la composición de la microbiota intestinal se han enfocado principalmente en la comunidad bacteriana. Sin embargo, no se han encontrado reportes que indiquen el desarrollo de simbióticos, combinación probiótica y prebiótica, para combatir la disbiosis intestinal fúngica. Por este motivo, en este estudio se busca caracterizar la microbiota intestinal en mexicanos normopeso, con sobrepeso y obesidad para determinar su estado de disbiosis intestinal fúngica, y con ello, buscar una terapia antifúngica alternativa al uso de fármacos.

2. Introducción

El término microbiota intestinal se refiere a la comunidad de microorganismos fúngicos que habitan en el tracto gastrointestinal (Każmierczak-Siedlecka et al., 2020; Strati et al., 2016). Se ha reportado que la composición de la microbiota intestinal presenta diferentes perfiles en distintos estados fisiológicos y patológicos del ser humano (Ott et al., 2008). Los tratamientos farmacológicos utilizados en infecciones fúngicas presentan limitaciones en su aplicación debido a sus efectos adversos y, en ocasiones, a su pobre actividad antifúngica. Además, pueden afectar a levaduras benéficas consideradas probióticas como *Saccharomyces boulardii* (Ishii et al., 2017). Esta levadura es reconocida por su efecto benéfico en el tratamiento y en prevención de diarreas infecciosas (Czerucka, Piche, & Rampal, 2007).

Existe limitada información respecto al tema de la microbiota intestinal y su relación con la obesidad. Rodríguez et al. (2015) realizaron un estudio de la microbiota intestinal en población española y reportaron que *Candida* spp., *Nakaseomyces* spp. y *Penicillium* spp. fueron los géneros fúngicos que se presentaron en mayor proporción en los individuos con obesidad, mientras que en individuos normopeso se mostró mayor presencia del género *Mocur* spp. Lo anterior podría indicar que existe relación e interacción entre la obesidad y la composición de la microbiota intestinal. Por otra parte, el desarrollo de productos capaces de modular la microbiota intestinal se han enfocado principalmente en la comunidad de bacterias. Sin embargo, no se han encontrado reportes sobre el desarrollo de simbióticos para combatir la disbiosis fúngica o modular los perfiles de la comunidad fúngica intestinal. Por este motivo, en este estudio se busca caracterizar la comunidad fúngica en población mexicana con peso normal, con sobrepeso y con obesidad y poder determinar su estado de disbiosis, y con ello, buscar una terapia antifúngica alternativa al uso de fármacos.

3. Marco teórico

3.1 Microbiota intestinal

Se refiere a la comunidad de microorganismos vivos residentes de manera habitual en el tracto gastrointestinal, la mayoría de este conjunto son bacterias (procariotas) que por lo general, no son dañinas y poseen diversas funciones sobre la fisiología del huésped y que aportan un beneficio a la salud (Power et al., 2014; Tilg et al., 2020).

3.2 Micobiota Intestinal

Es el conjunto de microorganismos fúngicos que habitan en el tracto gastrointestinal, se pueden encontrar hongos filamentosos y levaduras, los cuales juegan un papel similar a la microbiota intestinal debido a que también pueden interactuar con el huésped (Hallen-Adams et al., 2015; Kaźmierczak-Siedlecka et al., 2020; Strati et al., 2016).

3.3 Hongos y levaduras

Los hongos son organismos eucariotas que pertenecen al reino Fungi (Hongos). Son heterótrofos y requieren materiales orgánicos que utilizan como fuente de energía y como esqueletos carbonatados para la síntesis celular. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en hábitats muy diversos. Se reproducen de forma sexual y asexual. Presentan dos formas principales: hongos filamentosos y hongos levaduriformes (levaduras); cuya estructura puede ser pluricelular (filamentosos) o unicelular (levaduras) (Dufossé et al., 2021).

3.4 Disbiosis intestinal

Se define como el desequilibrio entre bacterias protectoras y dañinas que habitan la microbiota intestinal (Kaur et al., 2011). Ocurre en trastornos prevalentes como la obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal (Yan et al., 2018), diabetes (Ilchmann et al., 2018), inflamación metabólica, aterosclerosis, hipertensión arterial (S. Kim et al., 2018) y enfermedad celíaca (Carding et al., 2015). La comunidad fúngica del tracto gastrointestinal puede participar en la disbiosis intestinal (Lemoinne et al., 2020).

3.5 Eubiosis intestinal

Se denomina eubiosis cuando la microbiota intestinal, teóricamente “normal” y “equilibrada”, cumple con los requisitos para que el hospedero se pueda beneficiar de sus efectos sobre la salud a nivel metabólico, inmunitario, neuronal y de barrera protectora, propios de un individuo sano (Ribaldone et al., 2019).

3.6 Prebióticos, probióticos y simbióticos

El término prebiótico fue introducido por primera vez por Gibson y Roberfroid, 1995. Se definen como ingredientes alimentarios no digeribles por las enzimas del trato gastrointestinal, que benefician al huésped de forma selectiva, estimulando el crecimiento y/o la actividad de una o una cantidad limitada de bacterias benéficas en el tracto gastrointestinal (Schrezenmeir & de Vrese, 2001). Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen efectos benéficos sobre la salud del huésped. Estos microorganismos poseen la habilidad de interactuar con el huésped (Kerry et al., 2018). El término simbiótico se usa cuando un producto, principalmente alimenticio, contiene probióticos y prebióticos. Debido a que la palabra alude al sinergismo, este término debe reservarse para productos en los que el compuesto prebiótico favorece de forma selectiva al crecimiento de microorganismos probióticos (Markowiak & Śliżewska, 2018).

3.7 Obesidad

Actualmente, la obesidad es considerada un problema de salud pública a nivel mundial. Se define como una patología causada principalmente por una alteración en la ingesta energética, que cambia hacia un balance energético positivo, puede estar influenciada por factores genéticos y ambientales. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador que identifica las diferentes clasificaciones de peso que pueden llevar a problema de salud. De acuerdo el IMC, se han clasificado al menos 5 si categorías: bajo peso, normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad mórbida (Locke et al., 2015) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Clasificación del índice corporal basado en el esquema de la organización mundial de la salud (WHO).

Índice de masa corporal (IMC)	
kg/m ²	Clasificación
<18.5	Bajo peso
18.6 - 24.9	Normopeso
25 - 29.9	Sobrepeso
30 - 34.9	Obesidad
35>	Obesidad mórbida

Kg/m²= La masa se expresa en kilogramos y el cuadrado de la estatura en metros al cuadrado.

3.8 Antecedentes

3.8.1 Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal humano alberga una extensa comunidad de microorganismos denominada microbiota intestinal. Las bacterias son los microorganismos más abundantes (Le Chatelier et al., 2013; Tilg et al., 2020). En el colon, la sección de intestino más poblada, se pueden encontrar hasta 10^{12-14} unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de contenido intestinal (Power et al., 2014). La microbiota intestinal desempeña diferentes funciones en la fisiología del huésped debido a que modula el sistema inmunológico, proporciona nutrientes y energía que para el hospedero, a través de la fermentación metabolice los diferentes compuestos dietéticos no digeribles (Ma et al., 2014), regula el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Power et al., 2014). Por otra parte, el tracto gastrointestinal no sólo alberga bacterias, también posee una comunidad fúngica que es capaz de interactuar con las bacterias intestinales y el huésped (Nieminen & Salaspuro, 2018).

3.8.2 Micobiota intestinal

La comunidad fúngica se compone de levaduras y hongos filamentosos (Hamad et al., 2017). Comprende aproximadamente del 0.03 al 2% del total de microorganismos intestinales (Huffnagle & Noverr, 2013). Una célula fúngica puede ser hasta 100 veces más grande que una célula bacteriana, por lo tanto, la micobiota intestinal representa una biomasa importante (Underhill & Iliev, 2014). Actualmente, la composición y diversidad fúngica en el intestino humano han sido poco estudiadas (Chen et al., 2011; Mukherjee et al., 2015). Algunos estudios han demostrado que el tracto gastrointestinal humano puede albergar a más de 150 géneros fúngicos, siendo los más frecuentes *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. y *Cladosporium* spp. (Hamad et al., 2016). Se ha reportado que las especies fúngicas detectadas en el intestino humano pertenecen principalmente a tres tipos diferentes de filos: Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota (Hamad et al., 2017).

Similar a la microbiota intestinal, la micobiota desempeña un papel importante en la salud y enfermedad del hospedero (Borges et al., 2018). La micobiota intestinal está relacionada con la enfermedad inflamatoria intestinal (Kühbacher et al., 2006; Ott et al., 2008), la hepatitis B, la fibrosis quística (Cui et al., 2013) y en la modulación de la respuesta inmune (Iliev et al., 2012; Moyes & Naglik, 2012). A nivel de especie, se ha reportado que *Candida albicans* y *Candida glabrata* están relacionados en procesos infecciosos, teniendo alta presencia en pacientes

hospitalizados (Gouba & Drancourt, 2015). La micobiota intestinal también posee relación con las diferentes etapas de la vida y con el género. Strati et al. (2016) reportaron que en población infantil (de 0 a 10 años) se presenta mayor número de especies fúngicas en comparación con la población adulta (mayor a 18 años) y que en mujeres adultas se presenta mayor número de microorganismos fúngicos en comparación con los hombres adultos.

3.8.3 Micobiota intestinal y su relación con la obesidad

Algunos reportes indican que la obesidad puede estar influenciada por la microbiota intestinal, principalmente por 2 filos bacterianos: Firmicutes y Bacteroidetes (Cox et al., 2014; Ma et al., 2014). Respecto con la micobiota intestinal y su relación con la obesidad, sólo se han encontrado pocos estudios. Borges et al. (2018) reportaron que los individuos adultos con obesidad presentaron menor diversidad fúngica en comparación con los adultos normopeso. La bebida probiótica “Kefir”, la cual puede tener hasta 50 bacterias probióticas y levaduras (*Kluyveromyces marxianus*), ha demostrado efecto antiobesidad. También se ha reportado que la microbiota y la micobiota pueden tener efecto sobre la composición corporal y la pérdida de peso (Bourrie et al., 2018; Dong-Hyeon et al., 2017; Rosa et al., 2017). Luan et al. (2015) reportaron que existe mayor diversidad en la micobiota intestinal en individuos adultos con obesidad en comparación con los normopeso. Rodríguez et al. (2015) asociaron que, el género *Mocur* spp. y las especies *Mocur fuscus* y *Mocur racemosus* están relacionados con la pérdida de peso en sujetos normopeso, mientras que en sujetos con obesidad mostraron relación positiva con *Candida* spp., *Nakaseomyces* spp. y *Penicillium* spp. También se ha reportado que la clase Tremellomycetes se relaciona positivamente con la ganancia de peso corporal.

Por otra parte, la disbiosis fúngica también puede estar presente en el tracto gastrointestinal, se ha reportado que puede estar presente en la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa (Iliev et al., 2012; Q. Li et al., 2014; Ott et al., 2008). Steinert et al. (2020) reportaron que los individuos con obesidad pueden presentar disbiosis intestinal fúngica. Hasta ahora, no se encontraron estudios que aborden el papel de la micobiota intestinal en la obesidad en población mexicana. Diversos parámetros dietéticos, antropométricos y bioquímicos pueden verse alterados cuando las personas presentan un incremento en el peso corporal. Hiel et al. (2020) reportaron que puede

existir una relación entre estos parámetros y la composición microbiana del microbioma intestinal.

3.8.4 Tratamiento farmacológico en infecciones fúngicas

Actualmente se usan diversos fármacos antifúngicos en el tratamiento de infecciones causadas por hongos, principalmente por especies del género *Candida* spp. (Gouba & Drancourt, 2015; Rossoni et al., 2018). En la práctica clínica hay cuatro tipos de agentes terapéuticos contra infecciones por hongos: polienos, azoles, equinocandinas y fluoropirimidinas. Sin embargo, existen ciertas limitaciones en su aplicación debido a los efectos adversos reportados y, en ocasiones, a su pobre actividad antifúngica (Ishii et al., 2017). Entre los efectos adversos destacan la fiebre, alteración en la función hepática y hemólisis (ruptura de los glóbulos rojos) (Denning, 2003). Además, los antifúngicos no son específicos y pueden actuar en contra de levaduras probióticas tales como *Saccharomyces boulardii* (Czerucka, Piche, & Rampal, 2007) y *Kluyveromyces marxianus* (Maccaferri, Klinder, Brigidi, Cavina, & Costabile, 2012; Xie et al., 2015).

Algunos microorganismos fúngicos poseen diferentes factores de virulencia que le permiten sobrevivir en el tracto gastrointestinal. *Candida* spp. es capaz de generar biopelículas, esto impide que los fármacos antifúngicos realicen su actividad. Algunas bacterias probióticas como *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus fermentum* pueden impedir la formación de estas biopelículas y son capaces de actuar en contra de ciertas cepas fúngicas patógenas (Rossoni et al., 2018). La función principal de los simbióticos es potenciar el efecto de probióticos, por esta razón en este estudio se busca una combinación simbiótica que pueda tener un efecto modulador benéfico sobre la microbiota intestinal en personas con sobrepeso y obesidad.

3.8.5 Métodos utilizados en la identificación de la microbiota intestinal

Dentro de las metodologías empleadas para el estudio y detección de la microbiota intestinal se encuentran el uso técnicas de cultivo, usadas ampliamente para el aislamiento de hongos y levaduras cultivables (Hamad et al., 2016). La espectrometría de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) es utilizada para la identificación de microorganismos mediante la creación de espectros basados en perfiles proteicos (Relloso et al., 2015). Esta técnica permite identificar a nivel de especie, diferentes microorganismos aislados y cultivados a partir de muestras fecales. Estos microorganismos

incluyen a *Candida albicans*, *C. krusei*, *Galactomyces geotrichum* y *Geotrichum silvicola* (Gouba & Drancourt, 2015; Hamad et al., 2012).

Los métodos moleculares demuestran una identificación rápida y precisa de los microorganismos fúngicos en comparación con los métodos tradicionales. Además, la microbiota se puede identificar directamente de las muestras fecales. El operón ribosómico se ha utilizado para la detección e identificación de hongos. Este operón se conserva en todos los microorganismos fúngicos, contiene regiones conservadas y variables comúnmente utilizadas para su identificación (Hamad et al., 2016). El operón ribosómico fúngico contiene el gen de la subunidad pequeña (18S rRNA) y los genes de la subunidad grande (28S rRNA y 5.8S rRNA) separados por los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2. Las regiones conservadas de los genes 18S rRNA y 28S rRNA son apropiadas para analizar los hongos a nivel de género. Las regiones ITS se ha utilizado para la identificación fúngica a nivel de especie. La región ITS ha sido descrita como un marcador universal conveniente para la identificación de hongos (Ciardo et al., 2010; Guo et al., 2010).

La secuenciación de nueva generación ha sido valiosa para caracterizar el microbioma intestinal humano (Hoffmann et al., 2013; Underhill & Iliev, 2014). Los perfiles metagenómicos de las comunidades fúngicas intestinales se han evaluado utilizando los métodos de secuenciación de próxima generación, que permiten la caracterización de todo el microbioma en base a la secuenciación de la región ITS. Rodríguez et al. (2015) caracterizaron la microbiota intestinal en individuos sanos y con sobrepeso secuenciando los amplificadores de la región ITS. Strati et al. (2016) utilizaron los amplificadores de la región ITS 1. Mientras que Heisel et al. (2015) utilizaron la región ITS 2 como discriminador taxonómico y Hamad et al. (2017) utilizaron los amplificadores de las regiones ITS 1 y 2 en el estudio del microbioma intestinal.

3.8.6 Simbióticos contra patógenos intestinales

Diversos estudios enfocan sus investigaciones en encontrar simbióticos con actividad antimicrobiana principalmente para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas que habitan en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo *Salmonella*, *Escherichia* y *Listeria* (Arrizon, 2014). Algunos patógenos fúngicos, como *Candida* spp., tienen la capacidad de producir biopelículas, lo cual, les genera ventaja para poder persistir en el tracto gastrointestinal a pesar de estar

expuestos a fármacos antifúngicos (Sherry et al., 2014). No se ha encontrado algún reporte que indique el efecto de un simbiótico que muestre actividad antimicrobiana en contra de levaduras patógenas causantes de disbiosis en la microbiota intestinal.

4. Planteamiento del problema

Existen pocos estudios que demuestren el papel de los microorganismos fúngicos en la microbiota intestinal. Algunos estudios han reportado el papel de la micobiota intestinal en diferentes estados patológicos, como la diabetes, la enfermedad inflamatoria intestinal y en enfermedades hepáticas. Sin embargo, no hay suficientes estudios que se enfoquen en la micobiota intestinal y su relación con la obesidad. Se ha reportado que los individuos con obesidad pueden presentar disbiosis intestinal fúngica.

Por otra parte, el uso de fármacos antifúngicos en el tratamiento enfermedades infecciosas causadas por hongos ha demostrado tener efectos negativos, como resistencia y mutación de patógenos fúngicos, además de eliminar especies fúngicas probióticas.

El uso de simbióticos, combinaciones con probióticos y prebióticos, ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra bacterias intestinales patógenas. Sin embargo, no se han encontrado reportes que indiquen una combinación simbiótica que tenga efecto inhibitorio en contra de patógenos fúngicos.

5. Justificación

La microbiota intestinal humana es actualmente un área de estudio relativamente joven y ha sido poco estudiada en comparación con microbiota intestinal. Recientemente se ha obtenido información acerca de la composición de la microbiota intestinal y su relación con diversos estado fisiológicos y patológicos, sin embargo, su relación con la obesidad es un tema poco explorado.

La utilización de técnicas moleculares con ayuda de la secuenciación y metagenómica han contribuido en el estudio de la microbiota intestinal. Además, con la asistencia de técnicas nutricionales, bioquímicas, clínicas y bioquímicas es posible obtener más información que permite mayor entendimiento en el estudio de la microbiota intestinal y su relación con el sobrepeso y obesidad.

El uso incorrecto de fármacos antifúngicos puede generar efectos adversos en la salud y en ocasiones han demostrado poseer poca especificidad. Por otro lado, existe mayor demanda en el consumo de alimentos funcionales que tengan efecto positivo sobre la comunidad microbiana en el tracto gastrointestinal. Por lo anterior, este estudio tiene como objetivo caracterizar la comunidad fúngica intestinal de individuos mexicanos con normopeso, sobrepeso y obesidad y buscar una combinación simbiótica como alternativa al uso de fármacos antifúngicos para determinar la actividad antifúngica contra levaduras patógenas.

6. Hipótesis

Es capaz de restaurar la disbiosis intestinal fúngica en individuos con sobrepeso y obesidad con una combinación simbiótica de probióticos en combinación con fructanos tipo inulina como prebióticos.

7. Objetivos

a. Objetivo general

Encontrar una combinación simbiótica con actividad antimicrobiana contra patógenos fúngicos encontrados en la microbiota intestinal de sujetos con sobrepeso y obesidad.

b. Objetivos específicos

1. Evaluar las características antropométricas, bioquímicas y dietéticas de individuos normopeso, con sobrepeso y obesidad.
2. Obtener la micobiota cultivable y caracterizarla utilizando técnicas de cultivo y MALDI-TOF, respectivamente.
3. Extraer material genético, secuenciar y realizar el análisis metagenómico a partir de la microbiota intestinal de los participantes.
4. Evaluar *in vitro* diferentes simbióticos con actividad antifúngica y de inhibición de biopelículas contra *Candida albicans* aislada de un individuo con obesidad.

8. Metodología

8.1 Diagrama general de la metodología

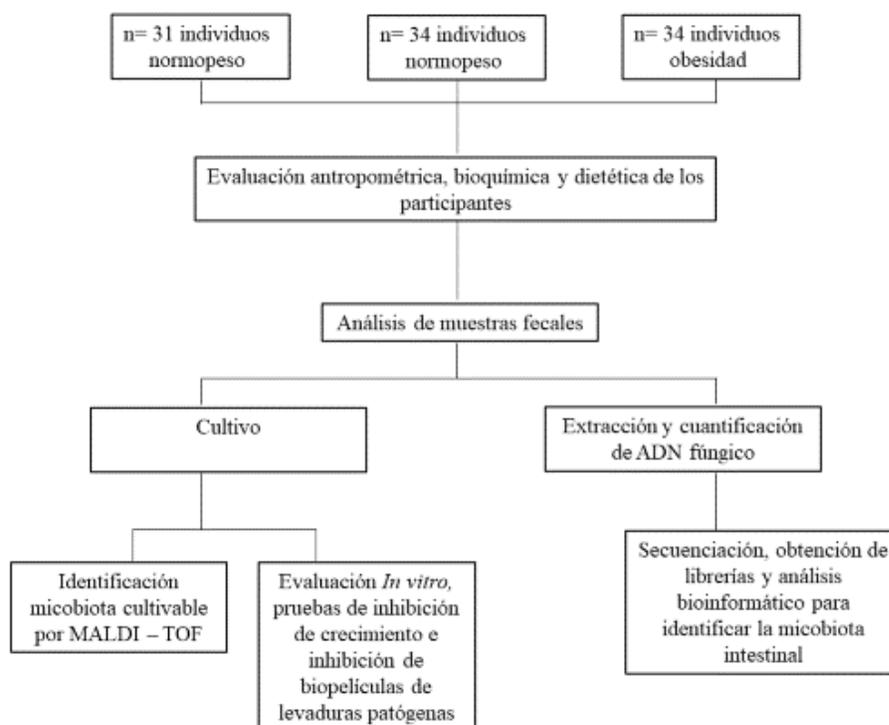


Figura 8.1 Diagrama general de la metodología.

8.2 Materiales y métodos

8.2.1 Estudio de la microbiota intestinal cultivable

8.2.2 Sujetos

Un total de 99 sujetos mexicanos (70 mujeres y 29 hombres) fueron clasificados en tres grupos según su índice de masa corporal (IMC). En el grupo 1 se incluyeron 31 sujetos normopeso (IMC 19.5-24.9), en el grupo 2 se incluyeron 34 sujetos con sobrepeso (IMC 25.0-29.9) y en el grupo 3 se incluyeron 34 sujetos con obesidad (IMC 30.0-39.9). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad entre 20 y 50 años, ausencia de alguna enfermedad intestinal, diabetes o enfermedad metabólica, y no consumir antibióticos, antifúngicos, probióticos o prebióticos durante los 3 meses previos al estudio.

8.2.3 Análisis dietético

Se utilizaron dos cuestionarios cuantitativos para determinar la ingesta dietética habitual de los participantes: a) Se utilizó el cuestionario de frecuencia alimentaria para obtener información sobre la ingesta alimentaria de los participantes de los 6 meses previos al estudio (Perez et al., 2015). En cada ítem del cuestionario, los participantes informaron la frecuencia y la cantidad específica de ingesta de cada alimento (Anexo 1). b) El recordatorio dietético de 24 horas proporciona información nutricional cuantitativa sobre la ingesta de alimentos durante las últimas 24 horas (Anexo 2) (Castell et al., 2015). En este estudio, nutricionistas realizaron todas las entrevistas dietéticas.

8.2.4 Evaluación antropométrica

Se realizó la evaluación antropométrica para determinar la composición corporal de los participantes. Para la evaluación antropométrica se utilizó el siguiente equipo: una cinta métrica flexible metálica de 0.5 cm de ancho graduada en centímetros y centímetros decimales (Cescorf), una balanza digital (TANITA UM-040) con capacidad de 150 kg y graduación de 100 g, y un adipómetro (Slim Guide) graduado en milímetros (Neves et al., 2013). Se incluyeron las siguientes medidas antropométricas: peso (kg), altura (cm), los pliegues cutáneos tricípital, bicipital, ilíaco y subescapular (mm) y las circunferencias de cadera, cintura, brazo y muñeca (cm) (Anexo 3) (Freedman et al., 2012). Todas las mediciones fueron tomadas por un antropometrista certificado por la Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría (ISAK) (Stewart et al., 2001).

8.2.5 Análisis bioquímico

Después de 8 horas de ayuno, se tomó una muestra de sangre a cada participante para evaluar el estado metabólico. Se analizaron los siguientes elementos: hierro sérico, ferritina, transferrina, capacidad total de fijación de hierro (CTFH), proteínas totales, albúmina, globulina, bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, alanina aminotransferasa (ALT/TGO), aspartato aminotransferasa (AST/TGO), gamma-glutamil transferasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH), colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), triglicéridos, glucosa, nitrógeno ureico, creatinina y ácido úrico (Anexo 4).

8.2.6 Crecimiento de levaduras por cultivo en placa

Se diluyó 1 g de muestra fecal de cada participante con 9 ml de una solución salina fosfatada (0.85%) para obtener una dilución 1/10. Se colocaron 100 µL de cada dilución en agar Sabouraud Dextrosa (Difco™), agar papa dextrosa (Difco™) y agar extracto de levadura peptona dextrosa (Sigma Aldrich®). Se añadió cloranfenicol a los medios de cultivo en una concentración de 250 mg/L. Las muestras se incubaron a 28 y 37°C durante 24, 48 y 72 h (Hamad et al., 2017). Después del periodo de incubación, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC).

8.2.7 Identificación de levaduras por MALDI-TOF

La identificación de las levaduras previamente cultivadas se llevó a cabo mediante la técnica de MALDI-TOF MS. Las levaduras se aislaron de las muestras fecales como se mencionó anteriormente, y las UFC frescas se tomaron de las placas de Petri con su respectivo medio de cultivo, las UFC se colocaron por duplicado en los pocillos de la placa de análisis del equipo y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 min. Los pocillos se cubrieron con 1.0 µL de una matriz [solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich) en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 2.5%]. Las lecturas se obtuvieron con un espectrómetro de masas Microflex LT y el software Flex (Versión 3.4, Bruker, Daltonics). El espectrómetro se calibró utilizando un extracto de proteína de *Escherichia coli* como control (Bruker Bacterial Test Standard). Los criterios de identificación fueron los siguientes: puntuación ≥ 2.0 identificación a nivel de especie; una puntuación entre 1.7 y 1.9, identificación a nivel de género; una puntuación < 1.7 , sin identificación (Relloso et al., 2015). Estos criterios se basan en los espectros obtenidos por los microorganismos que se encuentran en la base de datos.

8.2.8 Análisis estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar para las variables dietéticas, antropométricas y bioquímicas. Además, se realizó un ANOVA de un sólo factor para determinar las diferencias significativas en las entre medias de las variables sociodemográficas, antropométricas, clínicas y dietéticas, así como en el recuento medio de levaduras y hongos filamentosos aislados entre los grupos de estudio (normopeso, con sobrepeso y obesidad). El análisis de discriminante lineal (LDA) es un método para clasificar las muestras en valores dependientes categóricos (o grupos, en este caso, los tres grupos de estudio) utilizando combinaciones lineales de varios predictores

(variables) de modo que se maximice la varianza entre grupos en relación con la varianza dentro del grupo. En este estudio, las funciones de discriminación se utilizaron para analizar las variaciones en la presencia de levaduras entre sujetos normopeso, sobrepeso y obesidad. Se calculó la matriz de clasificación y las funciones discriminantes lineales. En este caso, se utilizó el LDA para permitirnos identificar una combinación lineal de las poblaciones de levaduras para identificar los grupos de estudio (normopeso, sobrepeso y obesidad) a los que pertenece cada observación. La matriz de clasificación muestra la proporción de valores asignados correctamente a cada variable. El valor absoluto de cada coeficiente de las funciones discriminantes lineales está relacionado con la importancia de la variable para clasificar una observación. El análisis se ajustó agregando coeficientes estandarizados para funciones discriminantes lineales y el diagrama de dispersión de los puntajes para estas funciones, proporcionando una interpretación de la influencia de las variables para clasificar las observaciones (Campbell, 1978; Huberty & Olejnik, 2006). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando RStudio® versión 1.2.

8.3 Estudio del microbioma y micobioma intestinal

8.3.1 Sujetos

Un total de 30 sujetos mexicanos (20 mujeres y 10 hombres) fueron clasificados en tres grupos según su índice de masa corporal (IMC). En el grupo 1 se incluyeron 10 sujetos normopeso (IMC 19.5-24.9), en el grupo 2 se incluyeron 10 sujetos con sobrepeso (IMC 25.0-29.9) y en el grupo 3 se incluyeron 10 sujetos con obesidad (IMC 30.0-39.9). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad entre 20 y 50 años, ausencia de alguna enfermedad intestinal, diabetes o enfermedad metabólica, y no consumir antibióticos, antifúngicos, probióticos o prebióticos 3 meses previos al estudio.

8.3.2 Extracción de material genético y amplificación

Las muestras de heces recolectadas se congelaron inmediatamente a -80°C . Se realizó la extracción de ADN bacteriano y fúngico a partir de 180-220 mg de muestra fecal. La extracción se realizó con el uso de un kit de extracción QIAamp® DNA Stool Mini Kit (50), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación del gen 16S rRNA, se utilizaron los siguientes cebadores 5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (Forward primer) y 5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (Reverse primer) que abarcan las regiones hipervariables V3 / V4 del gen ARN ribosomal 16S (Klindworth et al., 2013). Para

la amplificación del gen 18S ADNr, se utilizaron los siguientes cebadores 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-GATGAAGAACGYAGYRAA -3' (Forward primer) y 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-TCCTCCGCTTWTGWTGTC-3' (Reverse primer) que abarca la región ITS1 del gen 18S ADNr.

8.3.3 Preparación de librerías y secuenciación

En el caso de las bacterias, las secuencias utilizadas para la identificación taxonómica corresponden a las regiones variables V3 y V4 del gen 16S ADNr. La construcción de librerías se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation) (Cod. 15044223 Rev. B). Para iniciar el protocolo, se colocó el ADN genómico microbiano a una concentración de 5 ng/μL en Tris 10 mM con un pH 8.5. Con el objetivo de obtener esta concentración, se cuantificaron las muestras mediante fluorometría usando el fluorómetro Qubit (ThermoFisher Scientific) y posteriormente se diluyeron para obtener la concentración mencionada anteriormente. En un primer paso, el ADN se amplificó usando cebadores específicos para este gen los cuales estaban unidos a un adaptador (Amplicon et al., 2013). Este adaptador permite el paso de multiplexación al añadir índices que diferenciaron las muestras utilizando el kit de índices Nextera XT (FC-131-1096). En el anexo 5 se muestran las secuencias completas de los cebadores, según la nomenclatura de la IUPAC estándar. Antes de la secuenciación fue necesario realizar la cuantificación, este proceso se realizó como se ha explicado anteriormente. Una vez que la librería está cuantificada se procede a la secuenciación utilizando un run 2x300pb paired-end (kit de reactivo MiSeq v3 (MS-102-3001) en un secuenciador MiSeq de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina).

En el caso de los hongos y levaduras, las secuencias que se utilizaron en la asignación taxonómica corresponden a las regiones ITS (Internal Transcribed Spacers) del gen 18S ADNr. Respecto a la librería de ITS, se siguió el protocolo descrito anteriormente, pero con algunas modificaciones. En primer lugar, dado que las regiones diana son diferentes entre las bacterias y los hongos, se usaron distintos cebadores. En segundo lugar, se necesitó un paso de pre-PCR para aumentar la cantidad de ADN ya que la inicial no llegó a la concentración mínima requerida por el fabricante (Illumina).

8.3.4 Análisis bioinformático

Tras la secuenciación y con el objetivo de corregir los posibles errores de secuenciación producidos por Illumina, se usó el software DADA2 v1.11 que incluye “pipelines” para el filtrado de las secuencias según la calidad de éstas, el emparejado de las secuencias Forward y Reverse, identificación y eliminación de quimeras, y la detección y eliminación de las secuencias que alinean con las del hospedador.

Los archivos de entrada (obtenidos de la secuenciación) se demultiplexaron (archivos fastq sin cebadores, adaptadores y enlazadores). El algoritmo DADA2 utiliza un modelo para conocer las tasas de error. Para reducir el tiempo de cálculo, las lecturas redundantes se colapsaron en únicas. Después de eso, se aplicó un algoritmo de interferencia de muestra a las variantes de secuencia verdaderas y las lecturas directas e inversas se alinearon dando como resultado lecturas fusionadas, siempre que tuvieran al menos 12 bases idénticas superpuestas (Callahan et al., 2016). Se construyó una tabla de variantes únicas de amplicón – amplicon sequences variants - ASVs” usando las lecturas combinadas y se identificaron y eliminaron las secuencias quiméricas. Antes de la asignación de taxonomía, hubo un paso de eliminación de secuencias humanas usando bowtie2-2.3.4.2 contra la base de datos humana GRCh38.p13. Las lecturas no alineadas se utilizaron para asignar taxonomía implementada por el método de clasificador bayesiano ingenuo, contra la base de datos de referencia Silva (Quast et al., 2012). Se obtuvieron las variantes únicas de amplicón (ASV) a partir de los recuentos y se colapsaron hasta el nivel de especie. La tabla de abundancia de taxones se convirtió en formato Biom, utilizando la versión 1.9.2 del pipeline QIIME (Caporaso et al., 2010). Se estudió la composición de la microbiota intestinal, la abundancia absoluta y relativa y la diversidad ecológica.

Para la diversidad alfa se calculó el índice de diversidad de Shannon. Para cada grupo, el valor del índice de Shannon se comparó y se representó en una gráfica de caja. Para la diversidad beta, se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando matrices de índice de disimilitud de Bray-Curtis, implementadas por los pipelines de QIIME, la diferencia estadística de los grupos se calculó mediante el análisis de varianza no paramétrico de Adonis. También buscamos taxones bacterianos significativos entre los grupos utilizando los gráficos Volcano (Segata et al., 2011). Se realizaron análisis estadísticos adicionales como las pruebas de Wilcoxon utilizando el paquete estadístico R 3.1.0 (Team, 2013).

8.4 Evaluación de simbióticos con efecto de inhibición de crecimiento contra *Candida albicans*

8.4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Para las combinaciones simbióticas se utilizaron *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 y *L. plantarum* Lp-115, los cuales habían sido identificados previamente mediante espectrometría de masas (desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) (MALDI-TOF MS). En los ensayos de inhibición se utilizó una cepa clínica de *Candida albicans*, aislada de una muestra fecal y posteriormente identificada por MALDI-TOF. Se utilizó como control *Candida albicans* ATCC 10231. *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *L. paracasei* y *L. plantarum* se cultivaron en medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (DIFCO™, Le Pont de Claix, Francia). *C. albicans* ATCC 10231 y la *C. albicans* clínica, se cultivaron en medio YPD (levadura-peptona-dextrosa) (SIGMA-Aldrich®, St. Louis, EE. UU.). Todos los microorganismos se cultivaron a 37°C.

8.4.2 Obtención de los sobrenadantes libres de células (SLC)

Los sobrenadantes se obtuvieron siguiendo el método descrito por García-Gamboa et al. (2018). *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *L. paracasei* y *L. plantarum* se incubaron en caldo MRS y MRS modificado a 37°C durante 24 h. El medio MRS modificado se preparó cambiando la dextrosa por fructanos de tipo inulina como fuente de carbono. El caldo de cultivo obtenido del crecimiento de cada probiótico se centrifugó a 2800 × g durante 10 min, a 4°C. Los sobrenadantes se filtraron utilizando un filtro estéril con un tamaño de poro de 0.45 µm (Corning®).

8.4.3 Determinación de ácidos grasos de cadena corta en los SLC

Las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se determinaron mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC 2010, Shimatzu®) utilizando el método reportado por Femia et al. (2002) con algunas modificaciones. Se acidificó una muestra de 250 µL de cada sobrenadante con 25 µL de solución de ácido fosfórico (0.5 M). Se extrajeron los AGCC añadiendo 250 µL de éter dietílico, se centrifugó a 9400 × g durante 3 min. La fase de éter (5 µL) se inyectó directamente en una columna (HP-FFAPP 30 m × 0.250 mm × 0.25 mm, columnas GC Agilent JW) a 180°C usando N₂ como gas portador, durante 10 min. Las temperaturas de detección e inyección se fijaron a 230°C.

8.4.4 Evaluación del efecto inhibitorio de los SLC contra el crecimiento de *Candida albicans*

Se utilizó la técnica de microdilución en caldo en placas de microtitulación de 96 pocillos para examinar la actividad antifúngica de los sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. contra *Candida albicans* clínica y *C. albicans* ATCC 10231; este ensayo fue desarrollado según lo reportado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). *C. albicans* clínica y *C. albicans* ATCC 10231 se cultivaron en caldo YPD a 37°C durante 24 h, y se inocularon 1×10^5 UFC/mL (0.2 a una densidad óptica de 600 nm) en caldo YPD. Los sobrenadantes de *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei* y *L. plantarum* se diluyeron en serie a través de diluciones en caldo YPD y se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos. A continuación, se analizó por espectrofotometría el crecimiento de *Candida* spp. en presencia de diferentes concentraciones de los SLC, se midió a una densidad óptica de 600 nm. Las lecturas se tomaron cada hora durante 18 h. Otras series de sobrenadantes se ajustaron a un pH 6.5 con una solución estéril de NaOH 1 N. Para evaluar la estabilidad térmica de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes, los SLC se sometieron a un tratamiento térmico a 121°C durante 15 min (esterilizados en autoclave).

8.4.5 Evaluación de la inhibición de formación de biopelículas contra *Candida albicans*

Se colocaron cien microlitros (1×10^5 UFC / ml) de los cultivos de 16 h de *C. albicans* clínica y *C. albicans* ATCC 10231 en caldo YPD. Después del período de incubación de 24 h, se añadieron 150 µL por triplicado a una placa de microtitulación de 96 pocillos en presencia de 25 µL, 50 µL y 100 µL de los SLC obtenidos de *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *L. paracasei* y *L. plantarum* y se incubaron a 37°C durante 24 h. Los pocillos que contienen sólo *Candida* spp. fueron tomados como control. Se utilizó cloranfenicol como control negativo para evaluar la inhibición del crecimiento contra *Candida*. Después del período de incubación, se retiró el contenido de los pocillos y se lavaron cuidadosamente con una solución salina tamponada con fosfato (pH 7.0). Después de eso, se agregaron 100 µL de metanol (99% v/v) a cada pocillo y se mantuvieron durante 15 min; después de ese período, se eliminó el metanol y los pocillos se secaron bajo aire estéril durante 5 min. Se colocó una solución de cristal violeta (100 µL) a cada pocillo durante 15 min. Se eliminó el cristal violeta y los pocillos se lavaron cuidadosamente con agua. Se dejaron secar los pocillos y se leyó la absorbancia a 620 nm. La reducción de la formación de biopelículas de *Candida* spp. se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción de biopelícula} = 1 - \left(\frac{\text{Densidad óptica}_1}{\text{Densidad óptica}_2} \right) \times 100\%$$

Donde:

Densidad óptica 1 = Absorbancia de los pocillos que contienen los SLC y *Candida* spp.

Densidad óptica 2 = Absorbancia de los pocillos que contienen sólo *Candida* spp. (control).

8.5.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos del estudio se llevaron a cabo por triplicado y los datos se expresan como media \pm D.E. (media \pm desviación estándar). Los valores promedios de las mediciones de la densidad óptica y las concentraciones de AGCC se compararon entre los tratamientos experimentales utilizando ANOVA unifactorial, y los valores $P < 0.05$ se consideraron significativos. También se utilizaron pruebas t pareadas para comparar las diferencias entre las medias de los tratamientos experimentales. Se utilizó GraphPad Prism 8.4.3. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) Y el paquete rstatix versión R 4.0.3.

9. Resultados

9.1 Estudio de la microbiota intestinal cultivable

En total, se evaluaron 99 sujetos mexicanos, 70 mujeres y 29 hombres. Las características sociodemográficas de los 99 participantes se muestran en la Tabla 9.1. Todos los grupos estaban compuestos principalmente por mujeres (normopeso 64.5 %, sobrepeso 70.58 % y obesidad 73.52 %). La edad promedio fue de 32.42 ± 10.17 años. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las mediciones antropométricas entre los tres grupos. La masa grasa aumentó en concordancia con el IMC en los grupos de normopeso, sobrepeso y obesidad (15.61 ± 4.92 , 21.46 ± 4.56 , 31.97 ± 7.71 kg, respectivamente). Las mediciones de IMC, las circunferencias de cintura y cadera y la relación cintura-cadera aumentaron gradualmente de participantes normopeso a participantes con obesidad.

La tabla 9.2 muestra los resultados de los conteos en placa de la microbiota cultivable de los participantes. Se observó tanto las levaduras y hongos cultivables aumentaron conforme aumentó el IMC, Se mostró diferencia estadísticamente significativa en normopeso y grupos con sobrepeso y obesidad ($P < 0.05$) El conteo promedio de levaduras fue de 1.6, 2.16 y 2.19 log₁₀ UFC/g de heces, y el recuento promedio de hongos filamentosos fue de 1.09, 1.38 y 1.60

log₁₀ UFC/g de heces en participantes normopeso, sobrepeso y obesidad, respectivamente. De 162 colonias de levaduras aisladas, 71 fueron identificadas y clasificadas en 16 géneros o especies. En este estudio, no se pudo identificar el 56% de los aislamientos y tampoco fue posible identificar los hongos filamentosos; para este grupo de microorganismos sólo se cultivaron y se reportaron como UFC/g de heces.

En los resultados de la identificación de la microbiota cultivable se encontraron dos filos fúngicos; el filo predominante fue Ascomycota, del cual se observaron cuatro géneros diferentes (*Candida* spp., *Geotrichum* spp., *Kazachstania* spp. y *Pichia* spp.), seguido del filo Basidiomycota, del cual se observaron dos géneros (*Rhodotorula* spp. y *Cryptococcus* spp.). Sólo se observó una especie para la mayoría de los géneros. En el género *Candida* spp. se identificaron 10 especies: *Candida glabrata* (71.72%), *C. orthopsilosis* (5.05%), *C. lambica* (21.21%), *C. kefyr* (6.06%), *C. albicans* (29.29%), *C. krusei* (27.27%), *C. valida* (8.08%), *C. parapsilosis* (16.16%), *C. utilis* (1.01%) y *C. humilis* (2.02%). Se observaron dos especies diferentes dentro del género *Geotrichum* spp.: *Geotrichum silvicola* (16.6%) y *G. candidum* (7.07%) (Tabla 9.3).

función es la que discrimina los grupos, y los valores más altos se asociaron con el grupo con obesidad. *Candida krusei* también tuvo uno de los coeficientes más significativos de -0.47, y esta variable se asoció con el grupo con sobrepeso. La Figura 9.1 muestra el diagrama de dispersión para las puntuaciones de las dos funciones discriminantes lineales; se mostró un patrón con zonas superpuestas para los datos en los tres grupos, lo que significa que las funciones discriminantes pueden discriminar entre grupos tomando en cuenta las levaduras que estuvieron presentes. Las observaciones de los sujetos con obesidad tuvieron puntuaciones más altas para la primera función discriminante, seguido del grupo con sobrepeso, y el grupo normopeso tuvo puntuaciones más bajas (con una superposición para los dos últimos grupos).

Tabla 9.2. Conteos en placa de levaduras y hongos filamentosos aislados de la microbiota intestinal de los participantes.

	Normopeso (n=31)	Sobrepeso (n=34)	Obesidad (n=34)	Valor p	Grupos
Total	1.88± 0.7	2.18 ± 0.6	2.89 ± 0.729	0.01	a,b,b
Levaduras	1.6 ± 0.7	2.16 ± 0.6	2.19 ± 0.74	0.01	a,b,b
Hongos filamentosos	1.09 ± 0.1	1.38 ± 0.5	1.60 ± 0.11	0.2	a,a,a

Los valores se presentan como media ± desviación estándar.

Se calculó el Log10 de las Unidades Formadoras de Colonias (CFU) por gramo de muestra fecal para normalizar y presentar los datos.

Letras similares representan grupos homogéneos (a,b).

Los filos Ascomycota y Basidiomycota se encontraron en las tres poblaciones. Para Ascomycota, *Candida albicans*, *C. lambica* y *Geotrichum silvicola* mostraron mayor abundancia en el grupo con obesidad en comparación con los normopeso y sobrepeso. *Candida kefir*, *C. valida*, *Geotrichum candidum* y *Pichia kluyveri* se encontraron sólo en sujetos con obesidad. *Candida glabrata* presentó mayor abundancia en normopeso en comparación con sujetos con obesidad y sobrepeso. También se mostró la presencia de *Candida orthopsilosis*, *C. utilis* y *Kazachstania exigua* sólo en normopeso. En el filo Basidiomycota, *Rhodotorula mucilaginosa* fue la especie predominante en sujetos con obesidad en comparación con los normopeso y sobrepeso. Mientras tanto, *Cryptococcus liquefaciens* se encontró sólo en el grupo eutrófico (Tabla 9.3)

La Tabla 9.5 muestra la información dietética recopilada mediante dos cuestionarios dietéticos; estos cuestionarios abarcaron la información dietética durante un período largo (6 meses) y un

período corto (24 horas). Los resultados mostraron una diferencia en la ingesta para algunos grupos dietéticos; por ejemplo, kilocalorías totales (kcals), kcals de carbohidratos, kcals de proteínas, carbohidratos complejos, kcals de carne y kcals de vegetales. Estos parámetros aumentaron del grupo normopeso al grupo con obesidad. Hubo un aumento en la ingesta de lípidos, productos lácteos y carbohidratos simples sólo en sujetos con obesidad; sin embargo, no se observaron diferencias significativas.

Tabla 9.3. Cuantificación de las levaduras identificadas de la microbiota cultivable a partir de muestras fecales de los participantes.

Levaduras	Normopeso (n=31)	Sobrepeso (n=34)	Obesidad (n=34)	Total	Abundancia relativa (%)
<i>Candida glabrata</i>	21	11	19	71	51.52
<i>Candida orthopsilosis</i>	5	0	0	5	5.05
<i>Candida lambica</i>	0	8	13	21	21.21
<i>Candida kefyr</i>	0	0	6	6	6.06
<i>Candida albicans</i>	3	3	23	29	29.29
<i>Candida krusei</i>	11	16	0	27	27.27
<i>Candida valida</i>	0	0	8	8	8.08
<i>Candida parapsilosis</i>	8	8	0	16	16.16
<i>Candida utilis</i>	1	0	0	1	1.01
<i>Candida humilis</i>	0	2	0	2	2.02
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	2	14	20	20.20
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	2	0	0	2	2.02
<i>Geotrichum silvicola</i>	3	1	12	16	16.16
<i>Geotrichum candidum</i>	0	0	7	7	7.07
<i>Kazachstania exigua</i>	7	0	0	7	7.07
<i>Pichia kluyveri</i>	0	0	1	1	1.01

Los parámetros bioquímicos fueron significativamente diferentes entre los grupos de estudio (Tabla 9.1). Las enzimas ALT/TGP y GGT, LDL, triglicéridos y ácido ureico (38.38 ± 21.86 , 25.38 ± 15.44 , 104.14 ± 22.48 , 149.76 ± 94.85 y 5.76 ± 1.54 , respectivamente) fueron los parámetros con mayores concentraciones en el grupo con obesidad en comparación con el grupo conformados por sujetos normopeso, mostrando diferencia significativa ($P < 0.05$). Otros parámetros, como transferrina, AST/TGO y enzimas LDH, se incrementaron en sujetos con sobrepeso y obesidad. Sin embargo, estos parámetros no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa. HDL y BUN mostraron una alta presencia en el grupo normopeso

(54.36 \pm 12.25 y 15.0 \pm 2.90, respectivamente), y estos parámetros se redujeron en los grupos con sobrepeso y obesidad ($P < 0.05$).

Tabla 9.4 Comparación del análisis discriminante lineal entre los grupos (normopeso, con sobrepeso y con obesidad).

Levaduras	LD1	LD2
<i>Candida glabrata</i>	0.10	0.20
<i>Candida orthopsilosis</i>	-0.27	0.65
<i>Candida lambica</i>	0.33	-0.48
<i>Candida kefyr</i>	0.18	0.10
<i>Candida albicans</i>	0.63	0.22
<i>Candida krusei</i>	-0.48	-0.45
<i>Candida valida</i>	0.18	-0.02
<i>Candida parapsilosis</i>	-0.26	-0.04
<i>Candida utilis</i>	-0.16	0.26
<i>Candida humilis</i>	-0.01	-0.04
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.25	0.46
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	-0.06	0.25
<i>Geotrichum silvicola</i>	0.21	-0.01
<i>Geotrichum candidum</i>	0.48	0.13
<i>Kazachstania exigua</i>	-0.35	0.65
<i>Pichia kluyveri</i>	0.09	-0.08

Proporción de traza: LD1 0.76, LD2 0.23

Las Figuras 9.2, 9.3 y 9.4 muestran la correlación entre los parámetros antropométricos, bioquímicos y dietéticos con la microbiota cultivable de sujetos normopeso, sobrepeso y obesidad. Los datos antropométricos mostraron correlación positiva y negativa con las levaduras; El peso, el IMC, las circunferencias de cintura y cadera, la masa grasa y el índice cintura-cadera mostraron correlación positiva con Basidiomycota, *Rhodotorula* spp., *Candida albicans*, *C. lambica*, *C. kefyr* y *C. valida* ($P < 0.05$). Mientras que ALT/TGP, AST/TGO, LDL y VLDL mostraron correlación positiva con *Geotrichum candidum* ($P < 0.05$). El colesterol HDL mostró correlación positiva con *Kazachstania* spp. y *K. exigua* ($P < 0.05$). El consumo de lípidos mostró correlación positiva con *Kazachstania* spp., *K. exigua*, *Geotrichum silvicola* y *Candida parapsilosis*. Las Kilocalorías mostraron una correlación positiva con *Geotrichum candidum* y el consumo de carbohidratos simples mostró una correlación positiva con *Candida lambica* ($P < 0.05$).

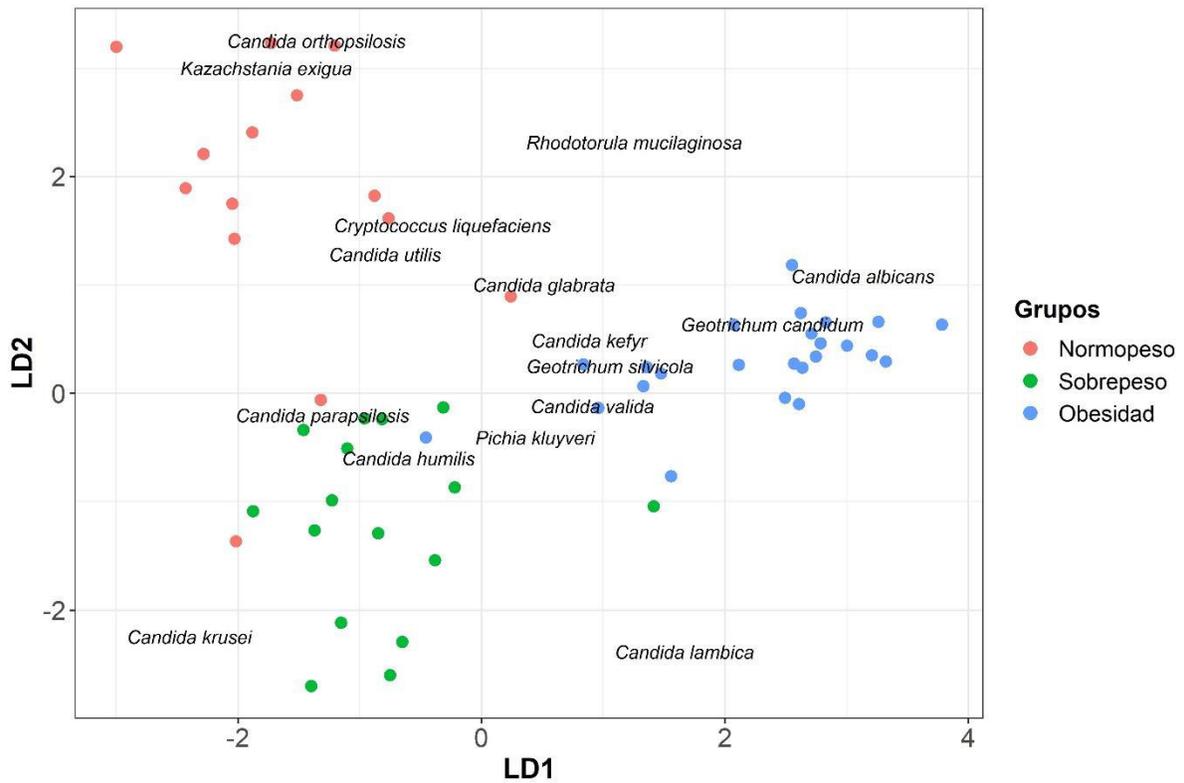


Figura 9.1. Análisis de discriminante lineal de la microbiota cultivable a partir de las heces de sujetos normopeso, con sobrepeso y con obesidad. Las levaduras identificadas se agruparon en los distintos grupos tomando en cuenta la presencia de estos microorganismos.

Tabla 9.5. Análisis dietético de los participantes.

Características	Grupos de participantes			Valor <i>P</i>	
	Normopeso (n=31)	Sobrepeso (n=34)	Obesidad (n=34)		
Kcals totales	1612.42 ± 293.08	1636.38 ± 302.15	1858.42 ± 302.52	0.0017	*
Kcals por alimento:					
Carbohidratos	787.1 ± 205.56	800.71 ± 211.50	951.53 ± 197.46	0.0020	*
Proteína	343.68 ± 86.40	337.76 ± 93.38	407.06 ± 111.06	0.0073	*
Lípidos	481.65 ± 200.06	497.91 ± 159.90	499.62 ± 140.82	0.8943	
Carbohidratos simples	38.71 ± 28.86	71.76 ± 51.73	73.53 ± 49.70	0.1506	
carbohidratos complejos	748.39 ± 201.89	728.94 ± 180.58	886.18 ± 186	0.0016	*
Productos lácteos	63.29 ± 40.75	51.88 ± 31.76	50.82 ± 30.41	0.6764	
Carne	173.42 ± 82.56	179.53 ± 77.10	218.24 ± 68.16	0.0373	*
Vegetales	106.97 ± 39.04	106.35 ± 49.98	137.41 ± 45.66	0.0075	*

Los valores representan la media ± desviación estándar

*Valores con diferencia estadísticamente significative (ANOVA, *P* < 0.05)

Kcals, kilocalorías

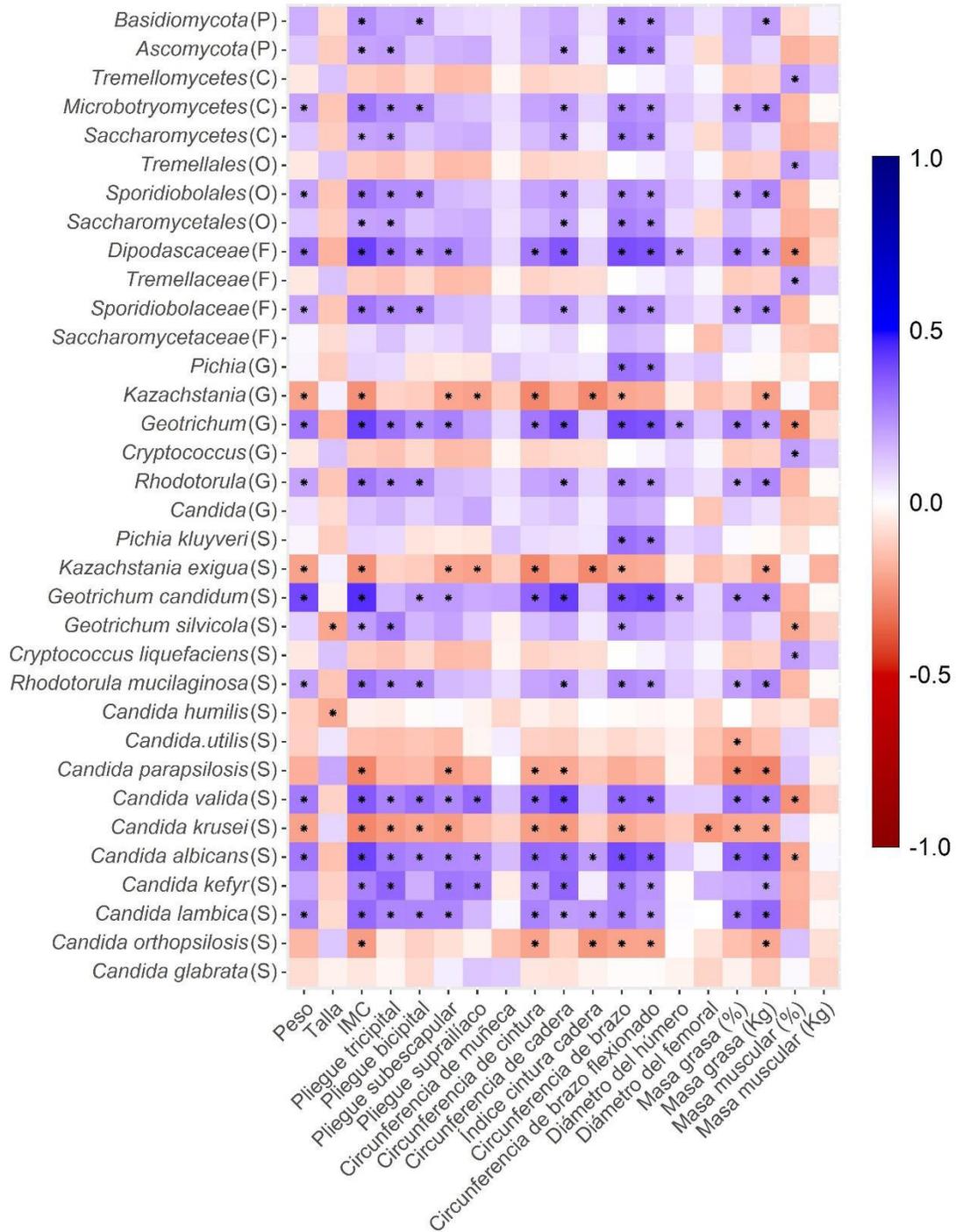


Figura 9.2. Análisis de correlación entre la micobiota intestinal cultivable de los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad con las variables antropométricas. Las letras entre paréntesis (P, C, O, F, G y S) indican filo, clase, orden, familia, género y especie, respectivamente. Los colores azul y rojo representan la correlación positiva y negativa, respectivamente.

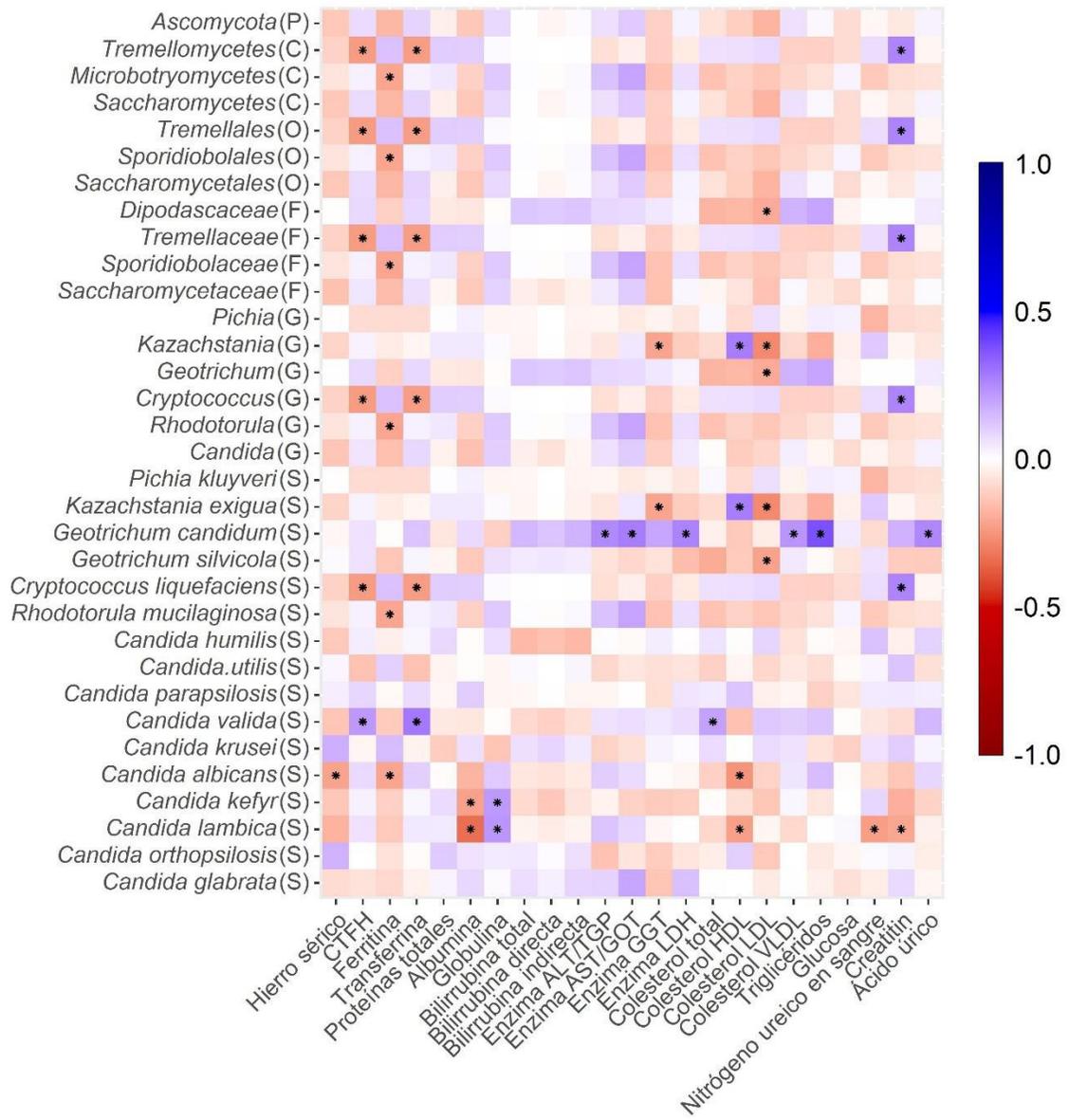


Figura 9.3. Análisis de correlación entre la microbiota intestinal cultivable de los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad con las variables bioquímicas. Las letras entre paréntesis (P, C, O, F, G y S) indican filo, clase, orden, familia, género y especie, respectivamente. Los colores azul y rojo representan la correlación positiva y negativa, respectivamente.

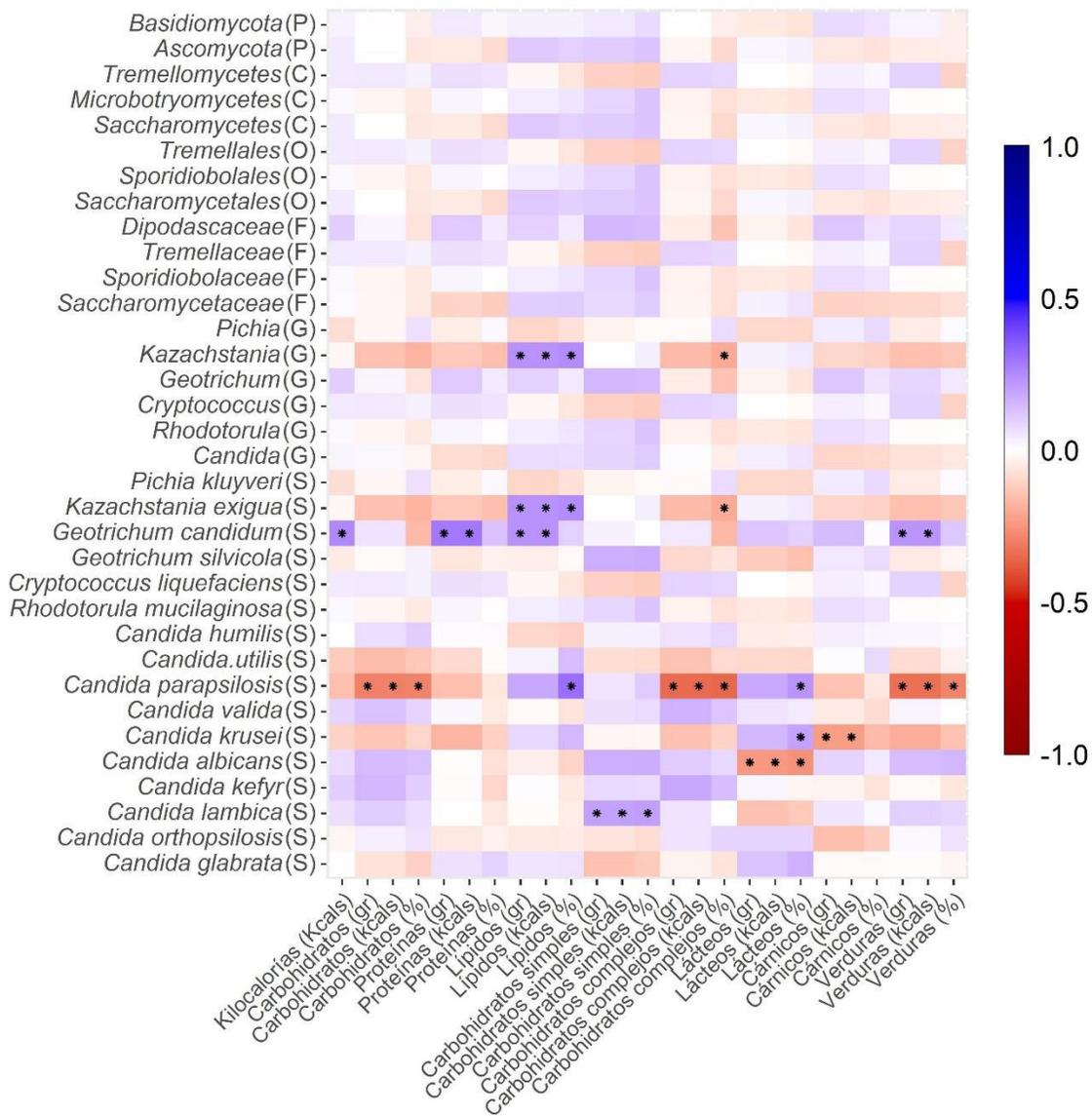


Figura 9.4. Análisis de correlación entre la microbiota intestinal cultivable de los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad con las variables dietéticas. Las letras entre paréntesis (P, C, O, F, G y S) indican filo, clase, orden, familia, género y especie, respectivamente. Los colores azul y rojo representan la correlación positiva y negativa, respectivamente.

9.2 Estudio del microbioma y micobioma intestinal

Se investigó el microbioma y micobioma intestinal de 10 sujetos normopeso, 10 con sobrepeso y 10 con obesidad, basado en la clasificación del índice de masa corporal por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Adicionalmente, se realizaron los análisis antropométricos, dietéticos y bioquímicos a cada participante.

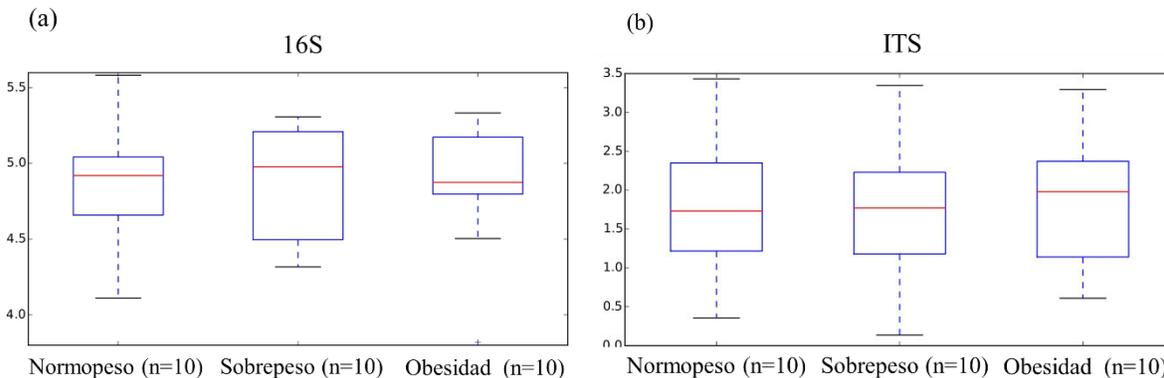


Figura 9.5 Análisis de la diversidad alfa bacteriana y fúngica de la microbiota intestinal analizada en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad. (a) valores del índice de Shannon observados en las muestras con el gen 16S, (b) valores del índice de Shannon observados en las muestras con el gen ITS.

La Tabla 9.6 muestra las características sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y dietéticas de los 30 participantes. Los tres grupos estaban compuestos principalmente por mujeres. La edad promedio fue de 29.53 ± 7.85 años. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros antropométricos entre los tres grupos; El porcentaje de masa grasa incrementó conforme aumentó el IMC en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad (26.64 ± 9.79 , 29.01 ± 4.80 y $37.40 \pm 4.69\%$ de masa grasa, respectivamente) ($P < 0.0041$). Por el contrario, el porcentaje de masa muscular disminuyó conforme aumentó el IMC en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad (30.30 ± 0.09 , 24.9 ± 3.92 y $23.52 \pm 3.39\%$, respectivamente) ($P < 0.0445$). Las circunferencias de cintura y cadera incrementaron conforme aumentó el IMC, se presentaron los siguientes valores para los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad: 77.23 ± 8.88 , 81.96 ± 4.36 101.58 ± 13.12 cm de circunferencia de cintura, respectivamente ($P < 0.0001$) y 98.24 ± 4.58 , 102.55 ± 5.26 y 117.76 ± 15.59 cm de circunferencia de cadera, respectivamente ($P < 0.0004$). los siguientes parámetros bioquímicos mostraron diferencia estadística entre los grupos; Las enzimas alanina

transaminasa y gamma-glutamyl, los triglicéridos y la glucosa, presentaron valores elevados en el grupo con obesidad, mostrando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Las lipoproteínas de alta densidad (colesterol HDL) mostraron los valores más elevados en el grupo normopeso (54.04 ± 12.05) en comparación con los grupos con sobrepeso (41.17 ± 6.33) y obesidad (38.08 ± 2.67) ($P < 0.003$). Respecto a los parámetros dietéticos, las kilocalorías, carbohidratos, proteínas, carbohidratos simples y complejos, cárnicos y vegetales mostraron los valores más elevados en el grupo con obesidad en comparación con los normopeso y sobrepeso. Sin embargo, sólo el consumo de proteínas y de cárnicos mostraron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

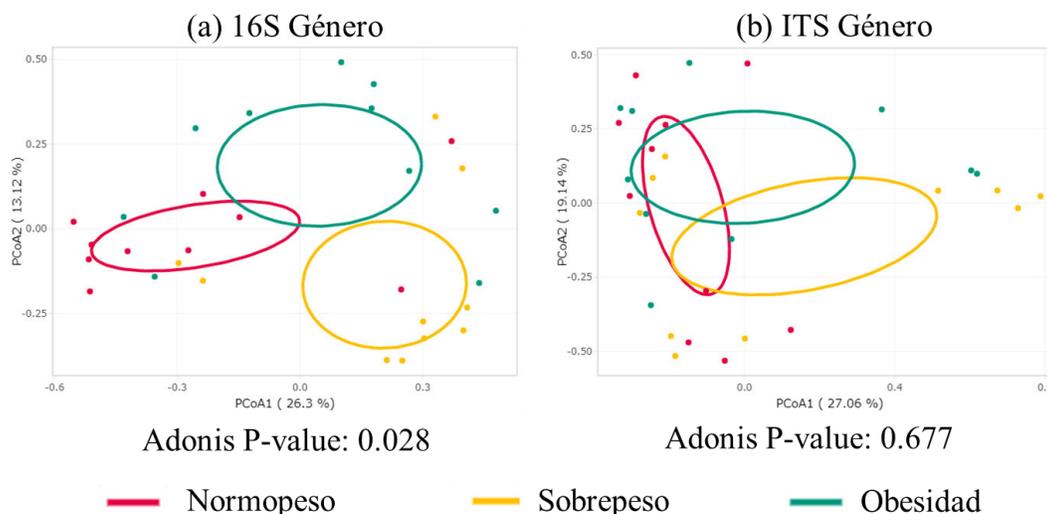


Figura 9.6 Análisis beta del conjunto de datos en función de los géneros bacterianos (a) y fúngicos (b) encontrados en la microbiota intestinal de los participantes.

En la identificación del microbioma intestinal se secuenciaron los marcadores genéticos 16S e ITS para determinar las bacterias y los microorganismos fúngicos, respectivamente. Posteriormente, se realizó la asignación taxonómica a los microorganismos presentes en las muestras. Así mismo, se analizó la diversidad de los microorganismos mediante el estudio de la diversidad alfa y beta. La Figura 9.5 muestra los resultados de la diversidad alfa, para ello se utilizó el índice de Shannon. La Figura 9.5a muestra los valores del índice de Shannon en relación con las bacterias para los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad; 4.85 ± 0.40 , 4.87 ± 0.37 y 4.85 ± 0.42 , respectivamente, no se presentó diferencia estadística significativa entre

los grupos ($P < 0.927$). La Figura 9.5b muestra la diversidad alfa de la comunidad fúngica en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad; 1.77 ± 0.84 , 1.80 ± 0.95 y 1.87 ± 0.82 , respectivamente, no se encontró diferencia estadística entre los grupos ($P < 0.932$). Las bacterias presentaron mayor diversidad que la microbiota fúngica de los tres grupos de estudio.

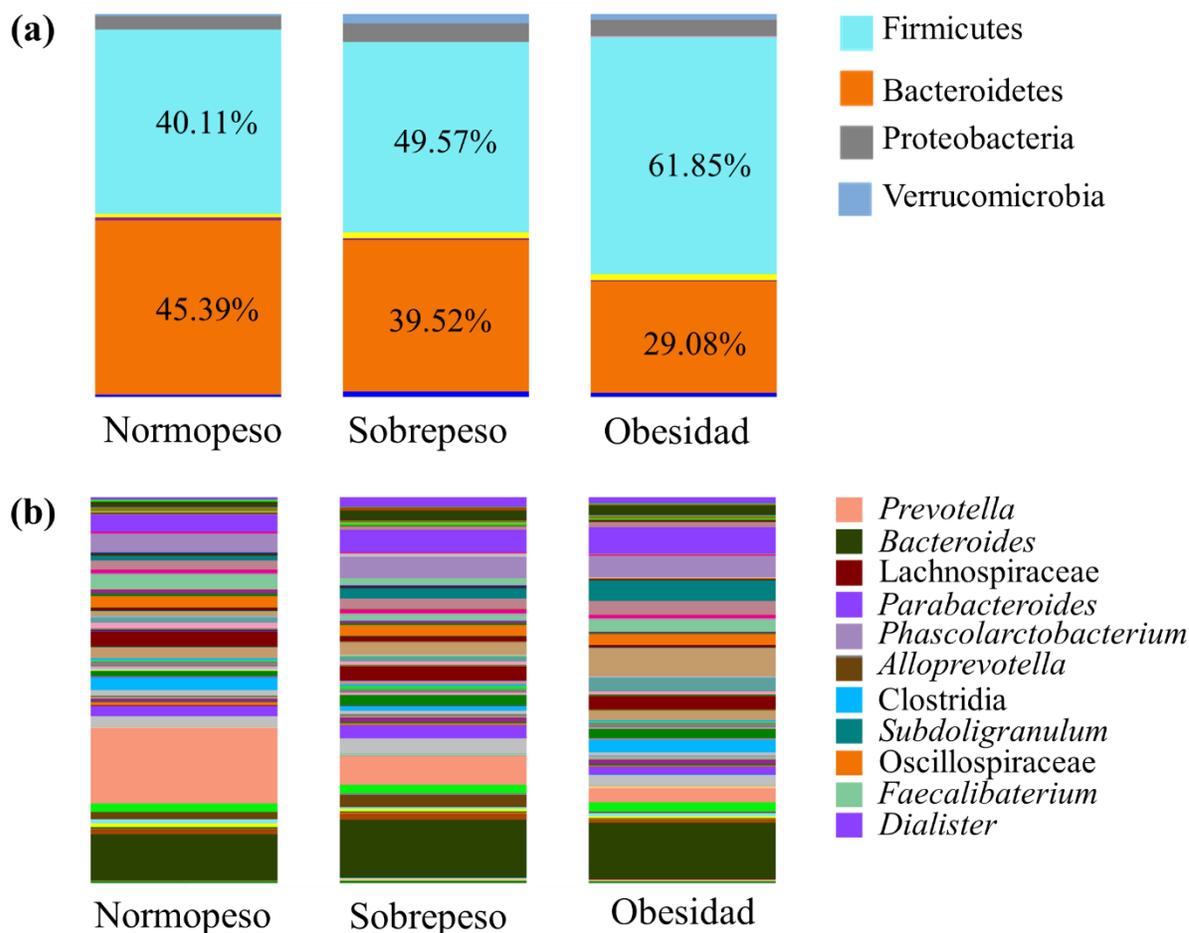


Figura 9.7 Representación gráfica de las principales asignaciones taxonómicas bacterianas encontradas en el microbioma intestinal de los participantes a nivel de filo (a) y género (b) realizadas mediante el programa Qiime 1.9.2.

La Figura 9.6 muestra el análisis de la diversidad beta utilizando la métrica de disimilitud de Bray-Curtis. Los resultados se visualizan en el análisis de coordenadas principales (PCoA) realizado en función de la microbiota bacteriana y fúngica a nivel de género. El PCoA consiste en la reducción de la dimensionalidad de los datos de manera que las múltiples variaciones

quedan agrupadas en distintos componentes de acuerdo con su importancia en la interpretación de la variable observada. En el PCoA bacteriano se aprecian tres clusters claramente diferenciados para los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad, mostrándose diferencia significativa entre los grupos ($P < 0.028$) (Figura 9.6a). En el PCoA fúngico, los agrupamientos de los grupos se traslaparon entre sí y no se mostró diferencia significativa ($P < 0.677$) (Figura 9.6b).

La figura 3.3 muestra la taxonomía bacteriana a nivel de filo y género. Los filos Firmicutes y Bacteroidetes predominaron en los tres grupos (figura 9.7a). Firmicutes incrementó conforme aumentó el IMC en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad (40.11%, 49.57%, y 61.85%, respectivamente). Mientras que Bacteroidetes disminuyó conforme aumentó el IMC en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad (45.39%, 39.52%, y 29.08%, respectivamente). Proteobacteria mostró en una abundancia de 3.43%, 4.48% y 4.21% en normopeso, sobrepeso y obesidad, respectivamente. Mientras que Verrucomicrobia presentó una abundancia de 0.66%, 2.53% y 1.59% en normopeso, sobrepeso y obesidad, respectivamente. Actinobacteria presentó baja abundancia en los tres grupos (de 0.60% a 1.14%) y Fusobacteria sólo se presentó en el grupo con obesidad (0.30%).

El género *Prevotella* presentó mayor en abundancia en sujetos normopeso (19.60%), su abundancia disminuyó en los grupos con sobrepeso y obesidad (7.50% y 3.70%, respectivamente). *Bacteroides* presentó alta abundancia en todos los grupos, se mostró una abundancia de 12.10%, 14.90% y 14.60% en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad, respectivamente (Figura 9.7b). Los géneros *Akkermansia* spp., *Dialister* spp., *Phascolarctobacterium* spp., *Subdoligranulum* spp., *Ruminococcus* spp., *Agathobacter* spp. y *Desulfovibrio* spp. mostraron mayor abundancia en los individuos con sobrepeso y obesidad en comparación los normopeso (Tabla 9.7).

La Tabla 9.8 muestra las bacterias identificadas nivel de especie en el microbioma intestinal de los tres grupos. Los grupos con sobrepeso y obesidad mostraron mayor abundancia de *Bacteroides stercoris* (1.27 - 2.91%), *Ruminococcus bromii* (2.29 - 3.12%), *Subdoligranulum variabile* (0.93 - 1.22%), *Phascolarctobacterium faecium* (3.21 - 1.43%) y *Akkermansia muciniphila* (2.52 - 1.60%) en comparación con los normopeso. Mientras que *Bacteroides vulgatus*, *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea*, *Faecalibacterium prausnitzii* mostraron mayor

abundancia en los participantes con normopeso (5.29%, 17.08%, 1.18%, 3.81%, respectivamente) en comparación con los grupos con sobrepeso y obesidad.

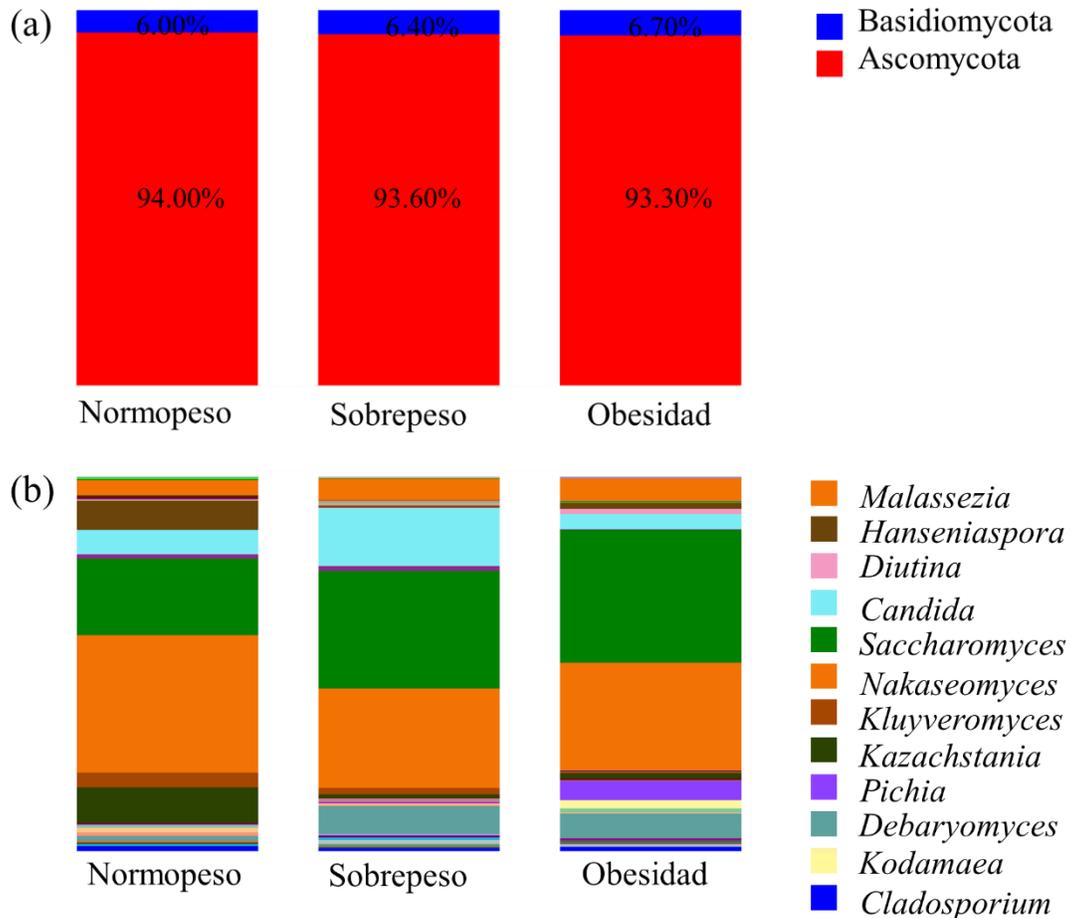


Figura 9.8 Representación gráfica de las principales asignaciones taxonómicas fúngicas del microbioma intestinal a nivel de filo (a) y género (b) realizadas mediante el programa Qiime 1.9.2.

La Figura 9.8 muestra la taxonomía fúngica nivel de filo y género del micobioma intestinal. Se observó que Ascomycota y Basidiomycota fueron los filos que dominaron en los tres grupos. Ascomycota presentó una abundancia de 94.00%, 93.60% y 93.30% para los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad, respectivamente. Mientras que Basidiomycota presentó una abundancia de 6.00%, 6.40% y 6.70% en normopeso, sobrepeso y obesidad, respectivamente (Figura 9.8a).

Tabla 9.7 Clasificación taxonómica a nivel de género de las secuencias bacterianas

	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad
<i>Bacteroides</i>	12.10%	14.90%	14.60%
<i>Barnesiella</i>	1.10%	1.50%	0.90%
<i>Alloprevotella</i>	1.90%	3.20%	0.20%
<i>Paraprevotella</i>	2.20%	2.10%	2.30%
<i>Prevotella</i>	19.60%	7.50%	3.70%
<i>Alistipes</i>	2.90%	3.80%	2.70%
<i>Parabacteroides</i>	2.60%	3.40%	2.00%
<i>Desulfovibrio</i>	0.70%	1.10%	1.10%
<i>Agathobacter</i>	1.50%	2.70%	2.40%
<i>Coprococcus</i>	1.30%	0.90%	1.20%
<i>Lachnospira</i>	2.80%	0.70%	2.50%
<i>Roseburia</i>	1.30%	1.20%	3.50%
<i>Faecalibacterium</i>	3.80%	1.40%	3.10%
<i>Ruminococcus</i>	2.20%	2.80%	3.50%
<i>Subdoligranulum</i>	1.40%	2.60%	5.40%
<i>Acidaminococcus</i>	0.00%	1.80%	0.00%
<i>Phascolarctobacterium</i>	4.90%	5.40%	5.40%
<i>Megamonas</i>	0.00%	1.00%	0.00%
<i>Dialister</i>	4.40%	5.80%	6.90%
<i>Sutterella</i>	1.00%	0.40%	0.70%
<i>Escherichia/Shigella</i>	1.20%	2.40%	2.40%
<i>Akkermansia</i>	0.60%	2.50%	1.60%

A nivel de género, *Nakaseomyces* spp. presentó mayor abundancia en comparación con los otros géneros fúngicos. El grupo normopeso presentó una abundancia de 36.62%, seguido del grupo con obesidad con un 28.74% y el grupo con sobrepeso con un 26.51%. *Saccharomyces* spp. presentó una abundancia de 20.44%, 31.38 y 35.44% en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad, respetivamente. *Candida* spp. presentó mayor abundancia en sujetos con sobrepeso (15.57%), seguido del grupo normopeso (6.44%) y obesidad (4.14%). *Debaryomyces* spp. mostró mayor abundancia en los participantes con sobrepeso y obesidad (7.48% y 6.51%, respectivamente) en comparación con los normopeso (1.51%). *Kazachstania* spp., *Kluyveromyces* spp. y *Hanseniaspora* spp. presentaron alta prevalencia en el grupo normopeso (9.47%, 4.02% y 7.80, respectivamente) en comparación con el grupo con sobrepeso (0.98%, 1.67% y 0.53%, respectivamente) y obesidad (1.39%, 0.68% y 1.49%, respectivamente). *Pichia*

spp. mostró alta abundancia en los participantes con obesidad (5.13%) en comparación con los normopeso y sobrepeso (0.07% y 0.17%, respectivamente) (Figura 9.8b).

Tabla 9.8 Abundancia de las principales especies bacterianas en el microbioma intestinal de sujetos normopeso, con sobrepeso y obesidad

Género bacteriano	Normopeso %	Sobrepeso %	Obesidad %
<i>Bacteroides stercoris</i>	0.53	1.27	2.91
<i>Bacteroides uniformis</i>	1.57	3.48	1.19
<i>Bacteroides vulgatus</i>	5.29	2.92	3.02
<i>Paraprevotella clara</i>	2.20	2.14	2.09
<i>Prevotella copri</i>	17.08	6.46	1.66
<i>Prevotella stercorea</i>	1.18	0.55	0.01
<i>Alistipes putredinis</i>	1.27	1.13	1.42
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.93	1.25	0.69
<i>Parabacteroides merdae</i>	1.56	1.74	1.17
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	3.81	1.43	3.13
<i>Ruminococcus bromii</i>	1.47	2.29	3.12
<i>Subdoligranulum variabile</i>	0.51	0.93	1.22
<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	0.00	3.21	1.43
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	4.88	2.21	3.95
<i>Dialister succinatiphilus</i>	3.02	1.44	2.58
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	0.59	0.30	0.49
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.62	2.52	1.59

La Figura 9.9 muestra los gráficos Volcano, estos gráficos se pueden utilizar para visualizar los resultados del estudio de la abundancia diferencial que se expresa en los diferentes grupos de este estudio, tomando en cuenta su significancia estadística. *Faecalibacterium* spp., *Lachnospira* spp., *Histophilus* spp., *Rikenella* spp., *Holdemanella* spp., *Hydrogenoanaerobacterium* spp. y *Haemophilus* spp. fueron los géneros bacterianos diferenciales en el grupo normopeso cuando se comparó con el grupo con sobrepeso, que presentaron a *Eggerthella* spp. y *Flavonifractor* spp. como géneros diferenciales (Figura 9.9a). *Prevotella* spp., *Blautia* spp., *Lachnospira* spp., *Rikenella* spp., *Anaerostipes* spp., *Odoribacter* spp., *Marvinbryantia* spp. e *Histophilus* spp. fueron los taxones diferenciales en sujetos normopeso cuando se comparó con el grupo con obesidad, que presentaron tres taxones

diferenciales (*Allisonella* spp., *Subdoligranulum* spp. y *Dielma* spp.) (Figura 9.9b). Mientras que, *Lachnospira* spp., *Romboutsia* spp. y *Clostridium* spp. fueron los géneros diferenciales en sujetos con obesidad cuando se comparó con el grupo con sobrepeso (*Flavonifractor* spp., *Eggerthella* spp. y *Alloprevotella* spp.) (Figura 9.9c). En relación con los géneros fúngicos, se presentaron menos taxones diferenciales. *Malassezia* spp. y *Aspergillus* spp. fueron los géneros diferenciales en sujetos con obesidad en comparación con los normopeso (Figura 9.9d).

Tabla 9.9 Clasificación taxonómica a nivel de género de las secuencias fúngicas

Género	Normopeso (%)	Sobrepeso (%)	Obesidad (%)
<i>Cladosporium</i>	1.26	0.73	1.08
<i>Debaryomyces</i>	1.51	7.48	6.51
<i>Dipodascus</i>	1.35	0.21	0.16
<i>Kodamaea</i>	0.00	0.03	2.19
<i>Pichia</i>	0.07	0.17	5.13
<i>Kazachstania</i>	9.47	0.98	1.39
<i>Kluyveromyces</i>	4.02	1.67	0.68
<i>Nakaseomyces</i>	36.62	26.51	28.74
<i>Saccharomyces</i>	20.44	31.38	35.44
<i>Torulaspora</i>	1.20	1.26	0.17
<i>Candida</i>	6.44	15.57	4.14
<i>Hanseniaspora</i>	7.80	0.53	1.49
<i>Malassezia</i>	4.08	5.69	6.08

La Figura 9.10 muestra el análisis de discriminante lineal (LDA), el cual emplea un método para clasificar muestras en valores dependientes categóricos (o grupos, en este caso, los tres grupos de este estudio) utilizando combinaciones lineales de varios predictores (variables) de modo que se maximice la varianza entre grupos. Las Figuras 9.10a y 9.10b muestran los diagramas de dispersión de acuerdo con los coeficientes de las funciones discriminantes lineales. En ambos análisis se mostró un patrón para los datos para los tres grupos, con zonas superpuestas, lo que significa que las funciones discriminantes pueden discriminar entre grupos tomando como referencia la presencia de los géneros bacterianos y fúngicos en los grupos normopeso, con sobrepeso y con obesidad.

La Figura 9.11 muestra las matrices de correlación de las variables antropométricas (Figura 9.11a), bioquímicas (Figura 9.11b) y dietéticas (Figura 9.11c) en relación con las bacterias identificadas en los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad. Los géneros bacterianos que presentaron alta abundancia en el grupo normopeso mostraron correlación positiva con variables relacionadas con buena salud y mostraron relación negativa con variables relacionadas con la ganancia de peso. Por ejemplo, *Rikenella* spp. mostró correlación positiva con la masa muscular, parámetro elevado en el grupo normopeso y también mostró correlación negativa con la masa grasa y los carbohidratos ($P < 0.05$). *Histophilus* spp. mostró correlación positiva con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y mostró correlación negativa con el peso corporal, el IMC, las circunferencias de cintura y cadera, los carbohidratos, el colesterol LDL y triglicéridos ($P < 0.05$). *Marvinbryantia* spp. mostró correlación positiva con la masa muscular, las kilocalorías relacionadas con el consumo de carne y la creatinina en sangre y presentó correlación negativa con el aumento de los pliegues cutáneos tricipital, subescapular y suprailíaco, el porcentaje de grasa y el consumo de carbohidratos ($P < 0.05$). *Faecalibacterium* spp. mostró correlación positiva con el HDL y con las kilocalorías provenientes de las proteínas y mostró correlación negativa con la masa grasa y el colesterol de baja densidad (LDL) ($P < 0.05$). *Lachnospira* spp. se correlacionó positivamente con los triglicéridos, glucosa y el colesterol VLDL ($P < 0.05$). También mostró correlación negativa con los carbohidratos simples, como el azúcar de mesa, sin embargo, no alcanzó significancia estadística. *Odoribacter* spp. mostró correlación positiva con el HDL y mostró correlación negativa con el IMC, la circunferencia de cintura, glucosa y triglicéridos, los carbohidratos, carbohidratos simples y las kilocalorías. *Prevotella* spp. presentó correlación negativa con el IMC y los carbohidratos ($P < 0.05$).

Los géneros bacterianos que presentaron alta abundancia en los grupos con sobrepeso y obesidad se correlacionaron positivamente con variables relacionadas con la obesidad. *Eggerthella* spp. mostró correlación positiva con el colesterol LDL, colesterol total y los carbohidratos simples ($P < 0.05$). *Allisonella* spp. mostró correlación positiva con el peso corporal, el IMC, los pliegues bicipital, subescapular y suprailíaco, las circunferencias de cintura y cadera, masa grasa, colesterol VLDL, triglicéridos, glucosa, el consumo de carbohidratos y las kilocalorías ($P < 0.05$). *Subdoligranulum* spp. mostró correlación positiva con el peso corporal, IMC, circunferencia de cintura, triglicéridos, las kilocalorías y consumo de carbohidratos y proteínas ($P < 0.05$). *Dielma* spp. mostró correlación positiva con el peso corporal, IMC, los pliegues

tricipitales, subescapular y suprailíaco, masa grasa, las kilocalorías y los carbohidratos. Sin embargo, no alcanzó diferencia estadística significativa. *Clostridium* spp. se correlacionó positivamente con parámetros relacionados con la obesidad, como el peso corporal, las circunferencias de cintura y cadera, el IMC, masa grasa, triglicéridos, glucosa, colesterol VLDL, las kilocalorías y los carbohidratos ($P < 0.05$). *Romboutsia* spp. se correlacionó positivamente con el peso corporal, las circunferencias de cintura y cadera, el IMC, la masa grasa, triglicéridos, glucosa, las kilocalorías, el consumo de carbohidratos y proteínas ($P < 0.05$).

Tabla 9.10 Abundancia de las principales especies fúngicas en la microbiota intestinal de sujetos normopeso, con sobrepeso y obesidad

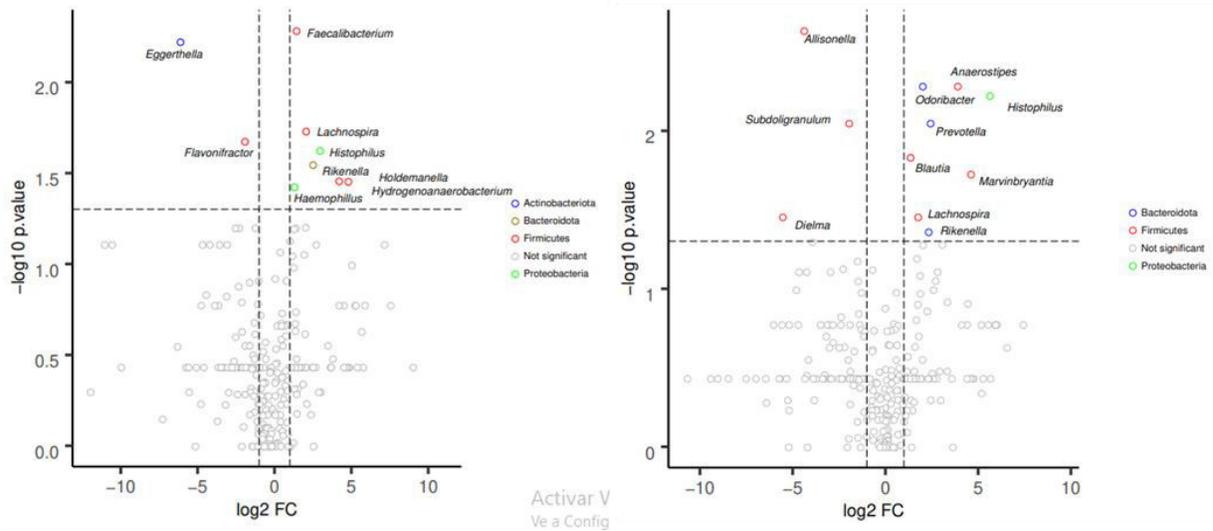
Especie	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad
	%	%	%
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1.51	7.48	6.51
<i>Dipodascus geotrichum</i>	1.35	0.21	0.16
<i>Yarrowia lipolytica</i>	0.42	0.04	1.03
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.00	0.03	2.19
<i>Pichia deserticola</i>	0.00	0.06	3.73
<i>Kazachstania exigua</i>	8.73	0.01	0.02
<i>Kazachstania servazzii</i>	0.00	0.02	0.86
<i>Kazachstania unispora</i>	0.71	0.93	0.33
<i>Kluyveromyces lactis</i>	2.65	1.47	0.52
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.34	0.20	0.16
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	10.78	0.54	9.86
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	1.15	1.23	0.13
<i>Candida albicans</i>	0.73	0.00	0.28
<i>Candida parapsilosis</i>	1.13	1.63	0.08
<i>Candida tropicalis</i>	3.56	1.86	2.69
<i>Candida zeylanoides</i>	0.27	11.05	0.39
<i>Diutina catenulata</i>	0.01	0.09	1.37
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0.00	0.08	1.07
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	7.80	0.45	0.41
<i>Malassezia globosa</i>	2.98	4.42	4.58
<i>Malassezia restricta</i>	0.69	0.77	1.23

La Figura 9.12 muestra las matrices de correlación de las variables antropométricas (Figura 9.12a), bioquímicas (Figura 9.12b) y dietéticas (Figura 9.12c) en relación con la microbiota

fúngica intestinal identificada en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad. *Aspergillus* spp. y *Malassezia* spp. se mostraron correlación positiva con variables antropométricas que están relacionadas con la obesidad, mostraron correlación positiva con el peso, el IMC, los pliegues subescapular y suprailíaco, las circunferencias de cintura, cadera y brazo. Sin embargo, no se mostró diferencia estadística significativa. *Saccharomyces* spp. mostró correlación positiva con peso, el IMC, los pliegues tricípital, bicipital y suprailíaco, las circunferencias de cintura, cadera y brazo, y el aumento de la masa grasa ($P < 0.05$). *Pichia* spp. se correlacionó positivamente con el IMC, pliegue tricípital, pliegue suprailíaco, circunferencia de brazo y masa grasa ($P < 0.05$). *Yarrowia* spp. presentó correlación positiva con el peso, el IMC, los pliegues tricípital, suprailíaco y subescapular, las circunferencias de cintura y cadera y la de masa grasa, sin embargo, no alcanzó diferencia estadística significativa. Sólo con el pliegue subescapular se presentó diferencia estadística ($P < 0.05$).

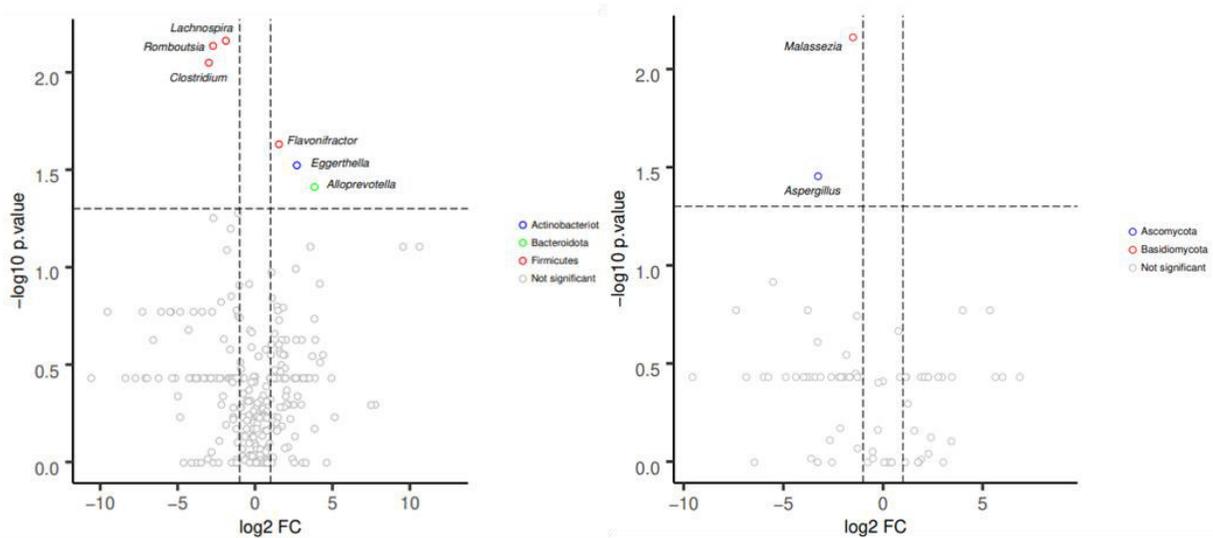
En la matriz de correlación de la microbiota y los parámetros bioquímicos se presentó menor número de correlaciones estadísticamente significativas. Los géneros *Kurtzmaniella* spp., *Devriesia* spp., *Cryptococcus* spp., *Tilletiopsis* spp., *Citeromyces* spp., *Peltaster* spp. y *Issatchenkia* spp. mostraron relación positiva con moléculas relacionadas con el metabolismo del hierro ($P < 0.05$). *Aspergillus* spp. presentó relación positiva con la bilirrubina total y bilirrubina directa. Mientras que *Pichia* spp., mostró correlación positiva con el colesterol total ($P < 0.05$). *Saccharomyces* spp. mostró correlación positiva con el colesterol VLDL, triglicéridos y glucosa. También presentó correlación negativa con el colesterol total, colesterol HDL y el colesterol LDL, sin embargo, no se presentó diferencia estadística significativa (Figura 9.12b).

Candida spp., *Yarrowia* spp., *Aspergillus* spp., *Saturnispora* spp. y *Dekkera* spp., presentaron correlación positiva con el consumo de carbohidratos simples ($P < 0.05$). *Peroneutypa* spp. se correlacionó positivamente con el consumo de lácteos y mostró correlación negativa con el consumo de cárnicos ($P < 0.05$). *Hanseniaspora* spp. presentó correlación positiva con el consumo de carne ($P < 0.05$). *Malassezia* spp. y *Pichia* spp. presentaron correlación positiva con las kilocalorías y el consumo de carbohidratos, sin embargo, no se presentó diferencia estadística significativa (Figura 9.12c).



(a) Sobrepeso vs. Normopeso

(b) Obesidad vs. Normopeso



(c) Obesidad vs. Sobrepeso

(d) Obesidad vs. Normopeso

Figura 9.9 Gráfico Volcano que muestra los géneros bacterianos y fúngicos diferenciales entre los grupos normopeso, con sobrepeso y con obesidad. En el eje de las x se muestra el log₂ del fold change y en el eje de las y se muestran -log del p-value. (a) géneros bacterianos entre los grupos sobrepeso y normopeso, (b) géneros bacterianos entre los grupos con obesidad y normopeso, (c) géneros bacterianos entre los grupos con obesidad y sobrepeso, y (d) géneros fúngicos entre los grupos con obesidad y normopeso.

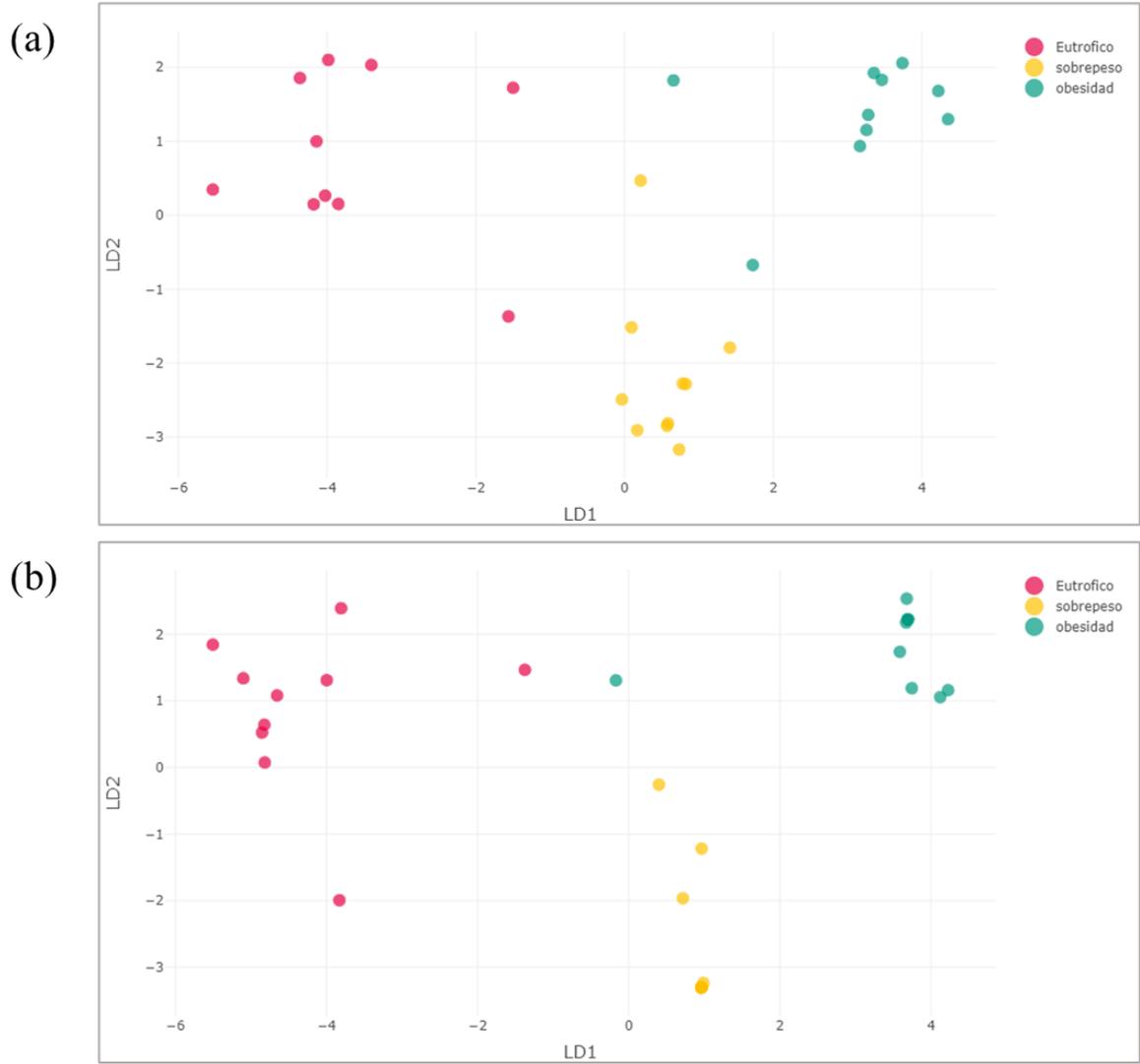


Figura 9.10 Comparación del Análisis de discriminante lineal de los géneros bacterianos (a) y fúngicos (b) encontrados en la microbiota intestinal en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad.

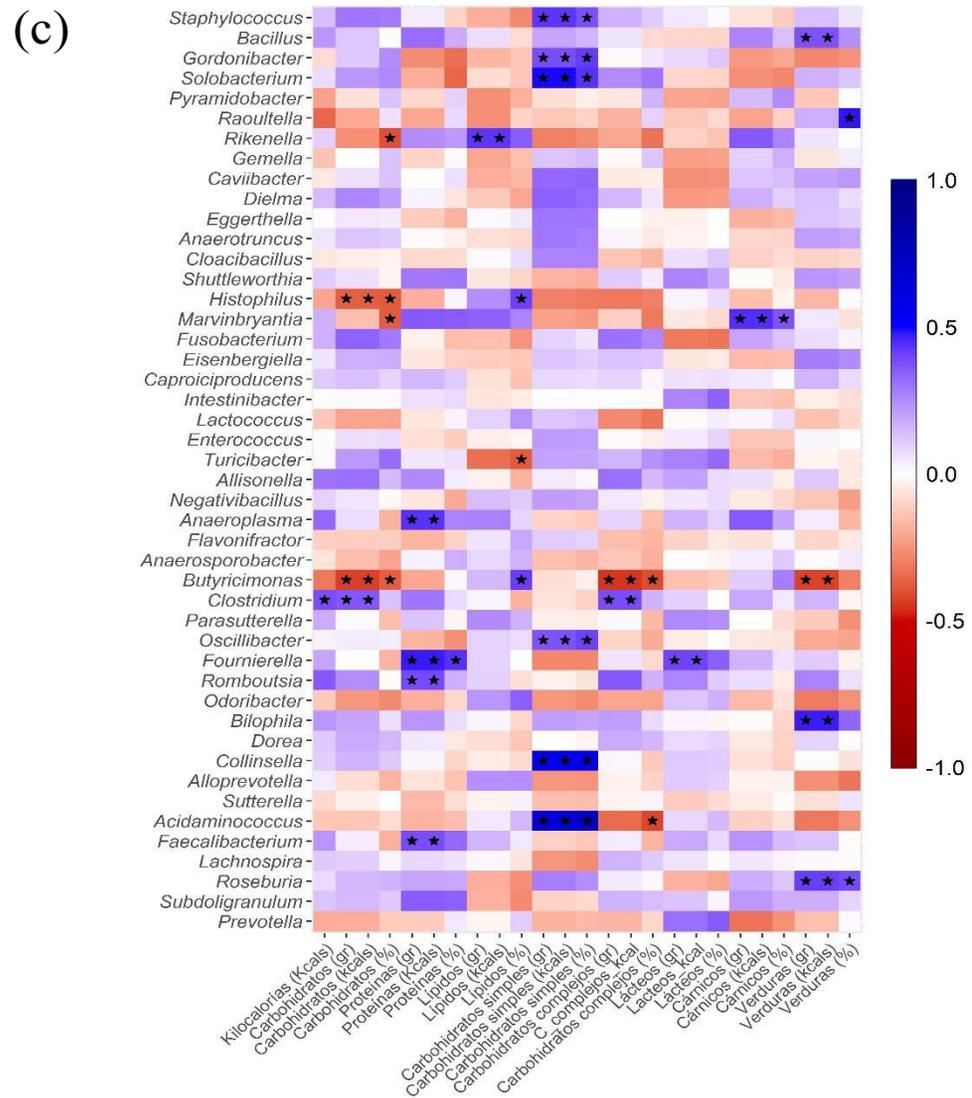


Figura 9.11 Matriz de correlación de las bacterias intestinales de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad con las variables antropométricas (a), bioquímicas (b) y dietéticas (c) (CONTINUACIÓN).

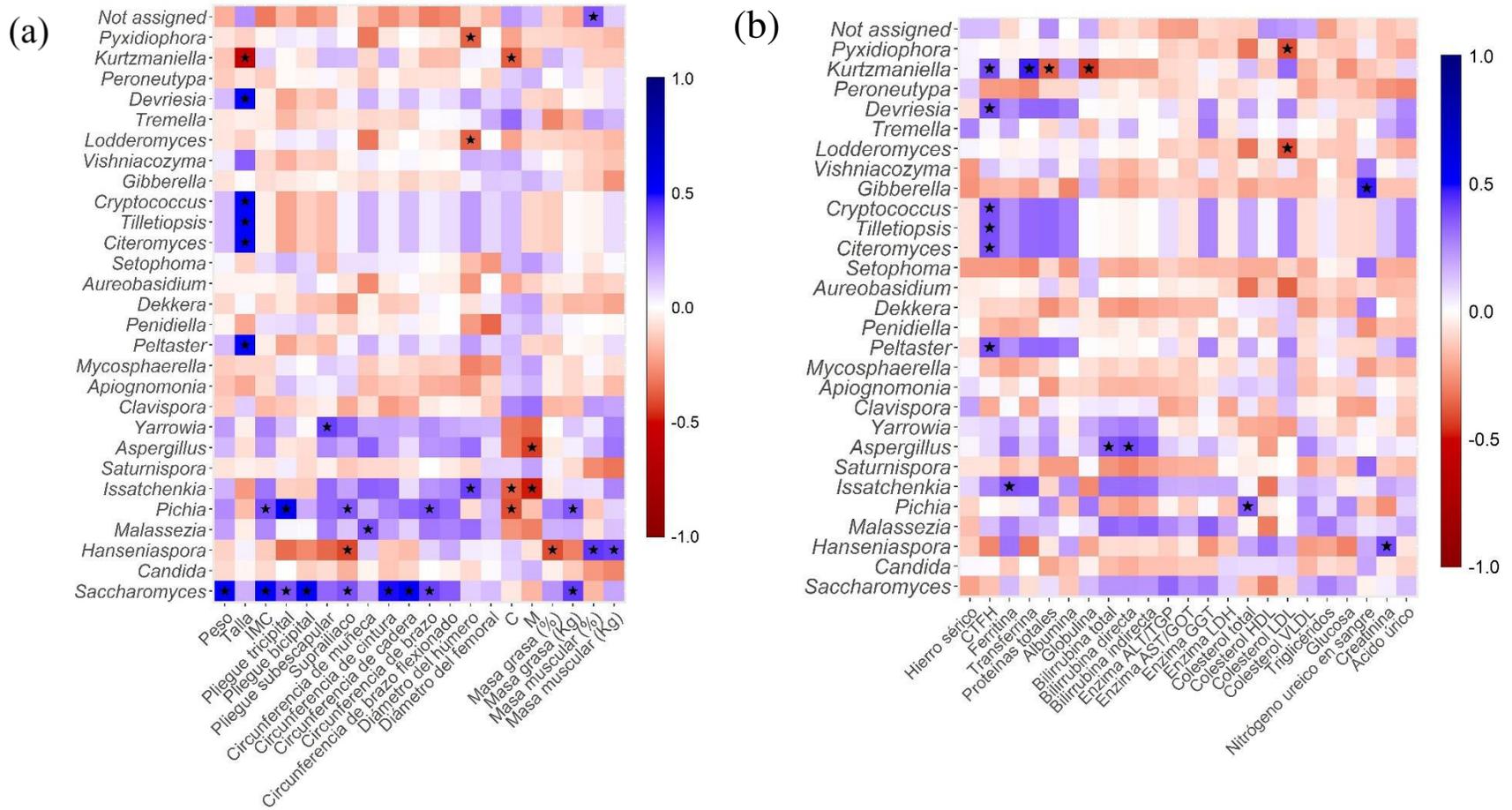


Figura 9.12 Matriz de correlación de los géneros fúngicos intestinales de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad con las variables antropométricas (a), bioquímicas (b) y dietéticas (c).

9.3 Evaluación de simbióticos con efecto de inhibición de crecimiento contra *Candida albicans*

Se estudiaron diferentes sobrenadantes libres de células (SLC) para evaluar su efecto antimicrobiano contra *Candida albicans*; estos SLC se obtuvieron de dos especies de *Lactobacillus* spp. en presencia de fructanos de tipo inulina. La Tabla 9.11 resume todos los sobrenadantes obtenidos de los probióticos cuando se expusieron a fructanos de tipo inulina y dextrosa como fuente de carbono. El contenido de ácidos grasos de cadena corta en los sobrenadantes se muestra en la Tabla 9.12. El ácido láctico fue el AGCC predominante producido por ambos probióticos. *L. paracasei* mostró una mayor producción ($P < 0.05$) de ácido láctico cuando se cultivó con inulina como fuente de carbono (42.15 ± 8.11 mM) en comparación con la dextrosa (10.13 ± 1.66 mM). *L. plantarum* produjo mayor cantidad de ácido láctico en presencia de dextrosa (13.34 ± 0.47 mM). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas en comparación con la inulina (10.55 ± 2.48 mM). Los ácidos acético, propiónico y butírico se produjeron en menores concentraciones. Las concentraciones de estos AGCC oscilaron entre 0.19 y 1.85 mM en los sobrenadantes de ambos probióticos, esto fue significativamente menor que la concentración de ácido acético alcanzada en la metabolización de la dextrosa por *L. paracasei* (9.72 ± 3.12 mM).

Candida spp. se expuso a los sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. para examinar la inhibición del crecimiento contra *Candida* spp. a través de mediciones de densidad óptica. Las Figuras 9.13a y 9.13b muestran la curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 y la cepa de *Candida albicans* clínica en presencia de los SLC obtenidos de *L. paracasei*, respectivamente. La presencia de SLC-50%-W-D-*paracasei* disminuyó el crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 (D.O. 0.066 ± 0.007) ($P < 0.0001$) y *C. albicans* clínica (D.O. 0.076 ± 0.002) ($P < 0.0001$) en comparación a los controles (D.O. 1.217 ± 0.065 y 1.380 ± 0.008 , respectivamente). Las muestras SLC-25%-W-I-*paracasei* y SLC-25%-W-D-*paracasei* mostraron inhibición contra *C. albicans* clínica (D.O. 0.076 ± 0.002 y 1.034 ± 0.13 , respectivamente) ($P < 0.0323$ y $P < 0.026$, respectivamente) en comparación con el control (D.O. 1.39 ± 0.008).

Tabla 9.11. Descripción de los sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de las bacterias probióticas sometidas a diferentes fuentes de carbono.

Probiótico:			<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
Sobrenadante libre de células	Concentración del sobrenadante (%)	Tratamiento	Fuente de carbono	Código de verificación de las muestras	
SLC	50	Sin tratamiento	Inulina	SLC-50%-W-I- <i>paracasei</i>	SLC-50%-W-I- <i>plantarum</i>
	25			SLC-25%-W-I- <i>paracasei</i>	SLC-25%-W-I- <i>plantarum</i>
	12.5			SLC-12.5%-W-I- <i>paracasei</i>	SLC-12.5%-W-I- <i>plantarum</i>
	50		Dextrosa	SLC-50%-W-D- <i>paracasei</i>	SLC-50%-W-D- <i>plantarum</i>
	25			SLC-25%-W-D- <i>paracasei</i>	SLC-25%-W-D- <i>plantarum</i>
	12.5			SLC-12.5%-W-D- <i>paracasei</i>	SLC-12.5%-W-D- <i>plantarum</i>
	50	Neutralizado	Inulina	SLC-50%-N-I- <i>paracasei</i>	SLC-50%-N-I- <i>plantarum</i>
	25			SLC-25%-N-I- <i>paracasei</i>	SLC-25%-N-I- <i>plantarum</i>
	12.5			SLC-12.5%-N-I- <i>paracasei</i>	SLC-12.5%-N-I- <i>plantarum</i>
	50		Dextrosa	SLC-50%-N-D- <i>paracasei</i>	SLC-50%-N-D- <i>plantarum</i>
	25			SLC-25%-N-D- <i>paracasei</i>	SLC-25%-N-D- <i>plantarum</i>
	12.5			SLC-12.5%-N-D- <i>paracasei</i>	SLC-12.5%-N-D- <i>plantarum</i>
	50	Térmico	Inulina	SLC-50%-T-I- <i>paracasei</i>	SLC-50%-T-I- <i>plantarum</i>
	25			SLC-25%-T-I- <i>paracasei</i>	SLC-25%-T-I- <i>plantarum</i>
	12.5			SLC-12.5%-T-I- <i>paracasei</i>	SLC-12.5%-T-I- <i>plantarum</i>
	50		Dextrosa	SLC-50%-T-D- <i>paracasei</i>	SLC-50%-T-D- <i>plantarum</i>
	25			SLC-25%-T-D- <i>paracasei</i>	SLC-25%-T-D- <i>plantarum</i>
	12.5			SLC-12.5%-T-D- <i>paracasei</i>	SLC-12.5%-T-D- <i>plantarum</i>

Concentración del sobrenadante: 50%, 25% and 12.5% de los SLC fueron colocados en un nuevo medio YPD con las cepas de *Candida* spp. Tratamiento: sin tratamiento (los SLC no recibieron ningún tratamiento), Neutralizados (los SLC se ajustaron a pH 6.5), térmico (los SLC se sometieron a 121°C, 15 min). Código de verificación de las muestras: Primero; sobrenadante libre de células. Segundo, la concentración de los sobrenadantes. Tercero, tratamiento. Cuarto, la fuente de carbono, y quinto, la cepa probiótica

Los sobrenadantes neutralizados de *L. paracasei* también mostraron actividad antiCandida (Figuras 9.13c y 9.13d) pero el efecto antimicrobiano fue menor en comparación con los sobrenadantes no neutralizados. Las muestras SLC-50%-N-I-*paracasei* y SLC-50%-N-D-*paracasei* mostraron inhibición contra *C. albicans* ATCC 10231 (D.O. 0.863 ± 0.09 y 0.768 ± 0.097 , respectivamente) ($P < 0.0075$ y 0.0086). Mientras que la inhibición contra *C. albicans* clínica fue 0.993 ± 0.057 y 1.047 ± 0.018 (D.O.) en las muestras SLC-50%-N-I-*paracasei* y SLC-50%-N-D-*paracasei*, respectivamente. Se observaron patrones de inhibición similares contra *C. albicans* ATCC 10231 con sobrenadantes de fructanos de tipo inulina y dextrosa obtenido de *L. paracasei* cuando se sometieron a tratamiento térmico (121°C) (Figura 9.13e). Después del tratamiento térmico, los sobrenadantes SLC-50%-T-I-*paracasei* y SLC-50%-T-D-*paracasei* mantuvieron su efecto inhibitorio (D.O. 0.795 ± 0.024 y 0.151 ± 0.031 , respectivamente). Los sobrenadantes de *L. paracasei* mostraron una mayor inhibición contra *C. albicans* clínica cuando se sometieron a tratamiento térmico, las concentraciones de 12.5%, 25% y 50% de ambos sobrenadantes (fructanos y dextrosa) inhibieron el crecimiento frente de *C. albicans* clínica, mostrando diferencia estadística significativa en comparación con el control ($P < 0.0001$).

Tabla 9.12 Determinación de los ácidos grasos de cadena corta en los SLC obtenidos a partir de los probióticos

AGCC	<i>L. paracasei</i>		<i>L. plantarum</i>	
	Dextrosa	Inulina	Dextrosa	Inulina
Ácido láctico	10.13 ± 1.66 b	42.15 ± 8.11 a	13.43 ± 0.47 a	10.55 ± 2.48 a
Ácido acético	9.72 ± 3.12 a	1.45 ± 0.14 a	1.75 ± 0.95 a	1.52 ± 0.29 a
Ácido propiónico	0.24 ± 0.24 a	0.20 ± 0.014 a	0.23 ± 0.04 a	0.19 ± 0.01 a
Ácido butírico	1.71 ± 0.02 a	1.66 ± 0.002 a	1.85 ± 0.09 a	1.74 ± 0.006 a

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las fuentes de carbono utilizadas por cada microorganismo para el contenido de metabolitos. Los valores se expresan en Mm como media \pm D.E. de los triplicados ($P < 0.05$).

La Figura 9.14 muestra la inhibición del crecimiento contra *Candida* spp. cuando se exponen a los SLC obtenidos de *Lactobacillus plantarum*. La Figura 9.14a muestra que el crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 disminuyó en presencia de los sobrenadantes de dextrosa: SLC-25%-W-D-*plantarum* (D.O. 0.919 ± 0.075) y SLC-50%-W-D-*plantarum* (D.O. 0.064 ± 0.002). Sin embargo, el efecto de inhibición de estos sobrenadantes disminuyó cuando se neutralizaron (Figura 9.14c). Sin embargo, cuando los sobrenadantes se sometieron a tratamiento térmico

mostraron inhibición contra *C. albicans* ATTC 10231 (SLC-50%-T-D-*plantarum* D.O. 0.058 ± 0.0007) (Figura 9.14e). La Figura 9.14b muestra la inhibición de la cepa *C. albicans* clínica. La presencia de SLC-25%-W-D-*plantarum*, SLC-50%-W-D-*plantarum* y SLC-50%-W-I-*plantarum* (D.O. 0.746 ± 0.049 , 0.081 ± 0.005 y 0.827 ± 0.012 , respectivamente) inhibieron el crecimiento de *C. albicans* clínica. Además, estos sobrenadantes mantuvieron su efecto inhibitorio cuando se sometieron a tratamiento térmico (D.O. 0.071 ± 0.010 , 0.080 ± 0.004 y 0.926 ± 0.51 , respectivamente) (Figura 9.14f). La muestra SLC-50%-N-I-*plantarum* (D.O. 0.975 ± 0.016) fue la muestra que mantuvo su efecto inhibitorio contra *C. albicans* clínica (Figura 9.14d). En la prueba t pareada (Figura 9.15) no se encontraron diferencias estadísticas en los siguientes pares de sobrenadantes obtenidos de *L. paracasei*: SLC-50%-W-I-*paracasei* versus SLC-25%-W-D-*paracasei*, SLC-25%-W-I-*paracasei* versus SLC-25%-W-D-*paracasei*, y SLC-12.5%-W-I-*paracasei* versus SLC-12.5%-W-D-*paracasei*. Por el contrario, se encontraron diferencias estadísticas entre todos los sobrenadantes de *L. plantarum* ($P < 0.05$).

Los efectos de inhibición en la formación de biopelículas de los SLC obtenidos de *L. paracasei* y *L. plantarum* contra *C. albicans* se muestran en la Figura 9.16. Las Figuras 9.16a y 9.16b muestran que cuatro sobrenadantes obtenidos de *L. paracasei* mostraron efecto de inhibición en la formación de biopelículas contra *Candida* spp. Las muestras SLC-25%-W-D-*paracasei*, SLC-50%-W-D-*paracasei*, SLC-25%-W-I-*paracasei*, SLC-50%-W-I-*paracasei* inhibieron la formación de biopelículas de *C. albicans* ATCC 10231 (84.18%, 88.78%, 70.14% 91.58%, respectivamente) y *C. albicans* clínica (88.49%, 93.94%, 81.70%, 91.66%, respectivamente). No se encontró diferencia estadística entre la respuesta inhibitoria de estas muestras ($P < 0.05$). La Figura 9.16c muestra que los sobrenadantes obtenidos de *L. plantarum*, SLC-12.5%-W-D-*plantarum*, SLC-25%-W-D-*plantarum*, SLC-50%-W-D-*plantarum* y SLC-50%-W-I-*plantarum*, mostraron valores de inhibición de 71.75%, 76.02%, 78.53% y 71.49%, respectivamente, frente a *C. albicans* ATCC 10231. No se encontró diferencia estadística entre estas muestras ($P < 0.05$). Mientras que los sobrenadantes de *L. plantarum* SLC-25%-W-D-*plantarum*, SLC-50%-W-D-*plantarum* y SLC-50%-W-I-*plantarum* mostraron mayor inhibición de formación de biopelícula contra *C. albicans* clínica (83.04%, 85.26% y 90.10%, respectivamente), no se encontraron diferencias estadísticas entre estas muestras ($P < 0.05$) (Figura 9.16d).

Candida albicans ATCC 10231

Candida albicans clínica

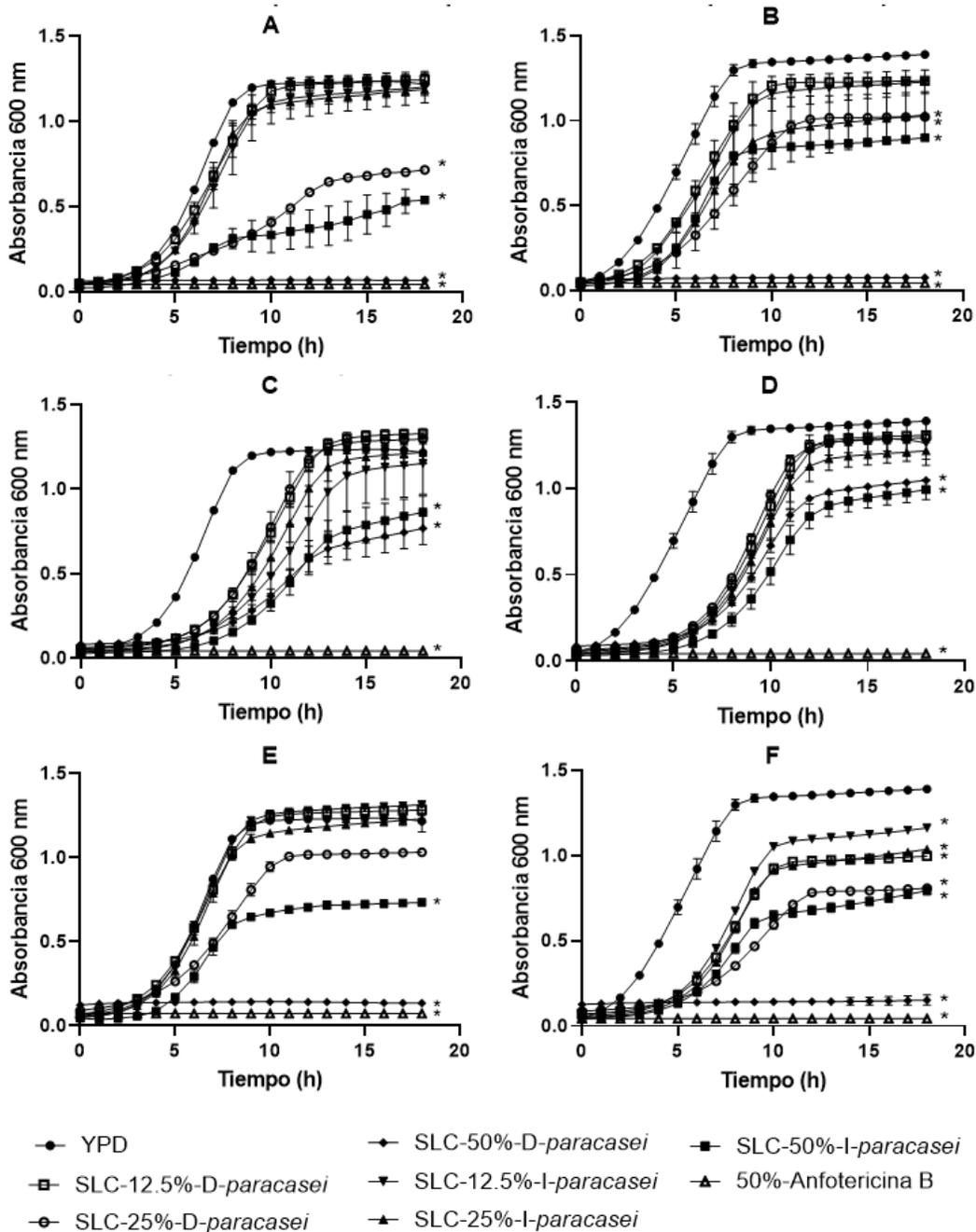


Figura 9.13 Cinética de crecimiento de *Candida* spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de *Lactobacillus paracasei*: sobrenadantes A-B sin tratamiento, sobrenadantes neutralizados C-D y sobrenadantes a 121°C E-F. Los valores se expresan en densidad óptica (D.O.) como media \pm D.E. de los triplicados. (*) significa diferencia estadística en comparación con el control ($P < 0.05$).

Candida albicans ATCC 10231

Candida albicans clínica

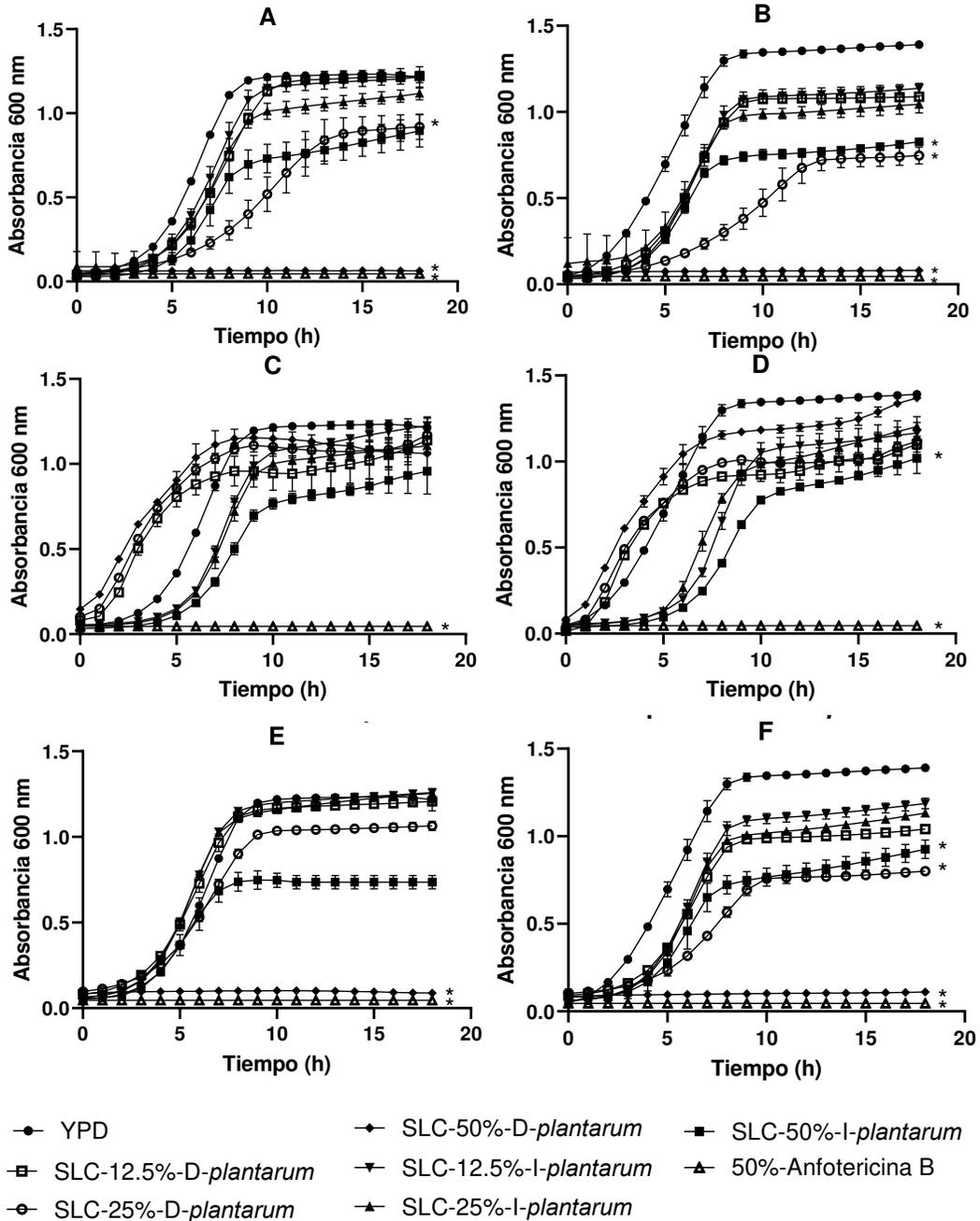


Figura 9.14 Cinética de crecimiento de *Candida* spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de *Lactobacillus plantarum*: sobrenadantes A-B sin tratamiento, sobrenadantes neutralizados C-D y sobrenadantes a 121°C E-F. Los valores se expresan en densidad óptica (D.O.) como media \pm D.E. de los triplicados. (*) significa diferencia estadística en comparación con el control ($P < 0.05$).

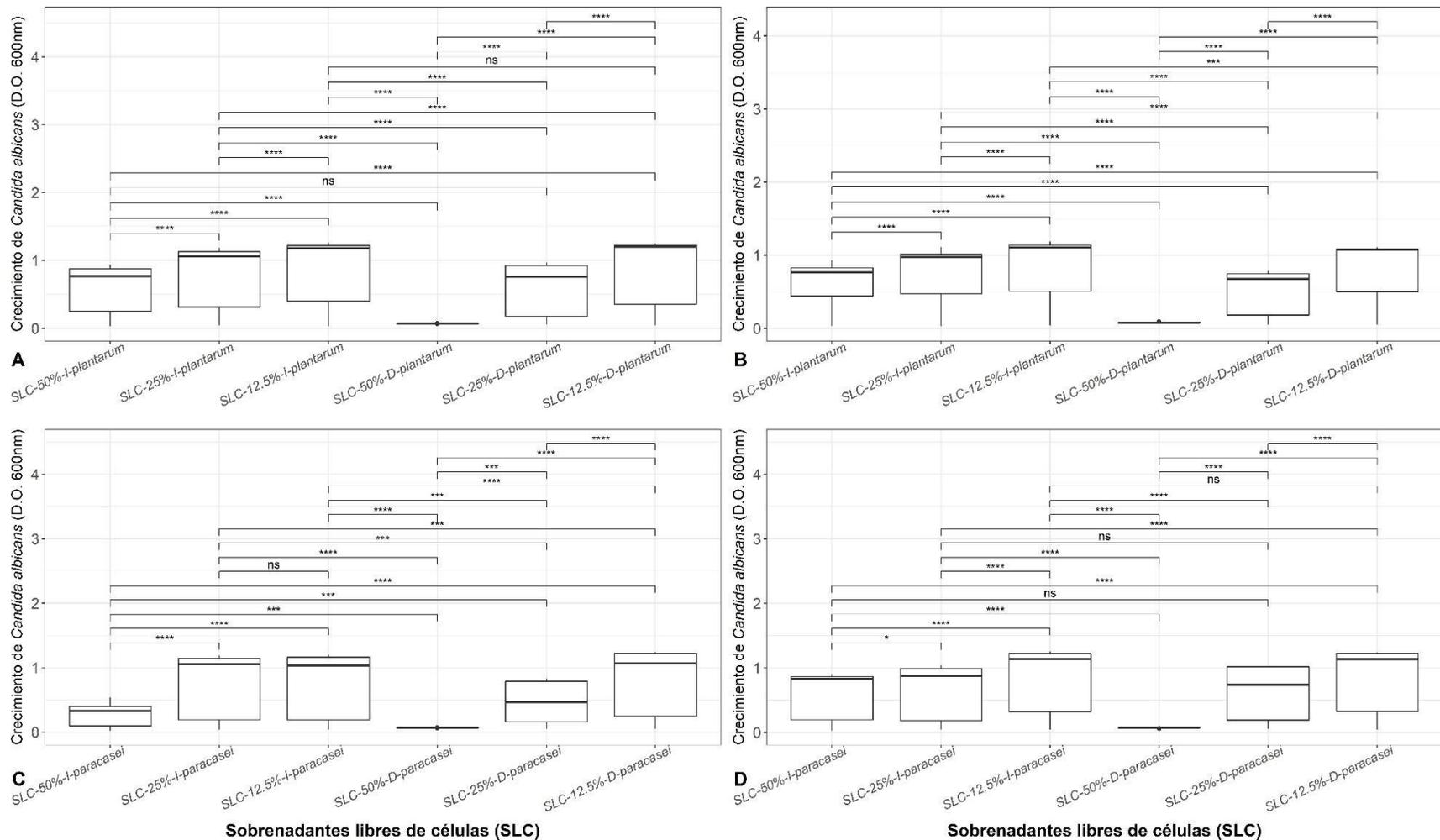


Figura 9.15 Comparación de la prueba t pareada de los diferentes sobrenadantes al evaluar la inhibición del crecimiento contra *Candida albicans*. A y B representan el sobrenadante de *L. paracasei* contra *C. albicans* ATCC 10231 y *C. albicans* clínica, respectivamente. C y D representan el sobrenadante de *L. plantarum* contra *C. albicans* ATCC 10231 y *C. albicans* clínica, respectivamente. Los valores se expresan en densidad óptica (D.O.) como media \pm D.E. de los triplicados. (*) significa diferencia estadística en comparación con el control ($P < 0.05$)

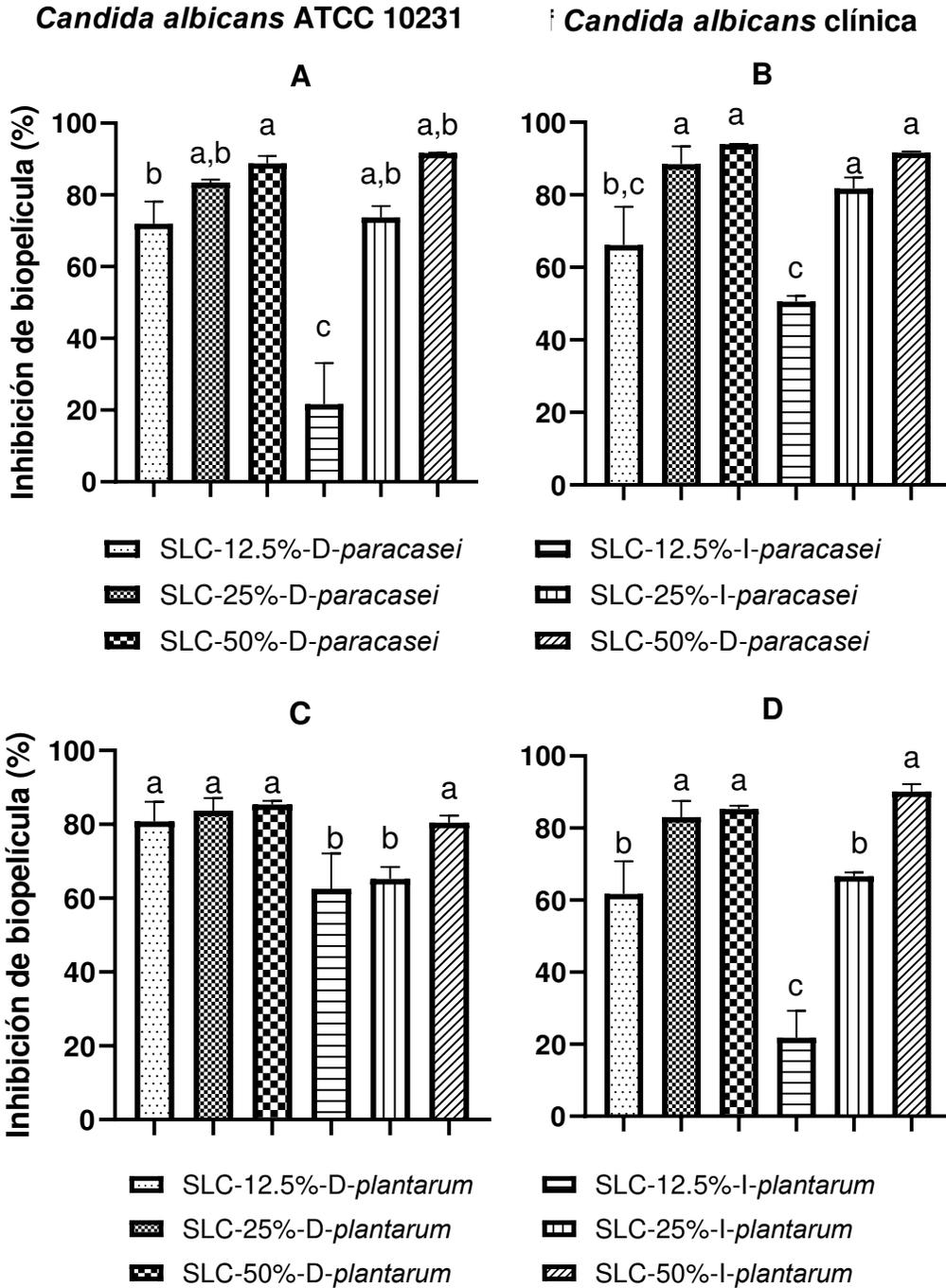


Figura 9.16 Prueba de inhibición de biopelícula contra *Candida* spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células. A y B representan la inhibición de sobrenadantes libres de células obtenidos de *Lactobacillus paracasei*. C y D representan la inhibición de sobrenadantes libres de células obtenidos de *Lactobacillus plantarum*. Los valores se expresan en densidad óptica (D.O.) como media \pm D.E. de los triplicados. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

La Tabla 9.13 muestra los SLC obtenidos de cada probiótico. Los SLC de *Lactocaseibacillus rhamnosus* y *Pediococcus acidilactici* fueron colocados con *Candida* spp. para evaluar su efecto de inhibición del crecimiento. Las Figuras 9.17a y 9.17b muestran las cinéticas de crecimiento de *Candida* spp. en presencia de las diferentes concentraciones de los SLC obtenidos de *L. rhamnosus*. La muestra SLC-50%-W-D-*rhamnosus* (D.O. 0.71 ± 0.007) inhibió el crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 en comparación con el control (D.O. 1.217 ± 0.06) ($P < 0.05$). La presencia de las muestras SLC-25%-W-D-*rhamnosus*, SLC-50%-W-D-*rhamnosus* y SLC-50%-W-I-*rhamnosus* inhibió el crecimiento de *C. albicans* clínica (D.O. 0.081 ± 0.003 , 0.804 ± 0.03 y 0.870 ± 0.016 , respectivamente) ($P < 0.05$). El efecto de inhibición disminuyó cuando estos SLC fueron neutralizados como se muestra en las Figuras 9.17c y 9.17d El efecto de inhibición persistió cuando los SLC de *L. rhamnosus* se sometieron a tratamiento térmico. Las concentraciones de 12.5%, 25% y 50% de los SLC de dextrosa e inulina inhibieron el crecimiento de *C. albicans* clínica (Figura 9.17f), esto sugiere que cantidades mínimas de estos sobrenadantes presentaron inhibición, mostrando diferencia estadística ($P < 0.05$) en comparación con los controles.

La Figura 9.18 muestra el efecto de inhibición de los SLC de *Pediococcus acidilactici* contra *Candida* spp. La muestra SLC-50%-W-D-*P.acidilactici* (D.O. 0.078 ± 0.008) inhibió a *C. albicans* ATCC 10231 ($P < 0.05$) en comparación con los controles. La presencia de las concentraciones de 12.5%, 25% y 50% de los SLC de dextrosa inhibieron el crecimiento de *C. albicans* clínica: SLC-12.5%-W-D-*P.acidilactici*, SLC-25%-W-D-*P.acidilactici* y SLC-12.5%-W-D-*P.acidilactici* mostraron una densidad de 1.008 ± 0.002 , 0.812 ± 0.015 y 0.141 ± 0.064 , respectivamente. La presencia de SLC-25%-W-I-*P.acidilactici* y SLC-50%-W-I-*P.acidilactici* inhibieron el crecimiento de *C. albicans* clínica. Las muestras SLC-25%-W-I-*P.acidilactici* y el SLC-50%-W-I-*P.acidilactici* disminuyeron su densidad óptica (1.035 ± 0.022 y 0.784 ± 0.035 , respectivamente) en comparación con el control (D.O. 1.217 ± 0.064) ($P < 0.05$). El efecto de inhibición de la muestra SLC-50%-N-I-*P.acidilactici* contra *C. albicans* (D.O. 1.045 ± 0.008) permaneció incluso cuando la muestra se sometió a neutralización (Figura 9.18d).

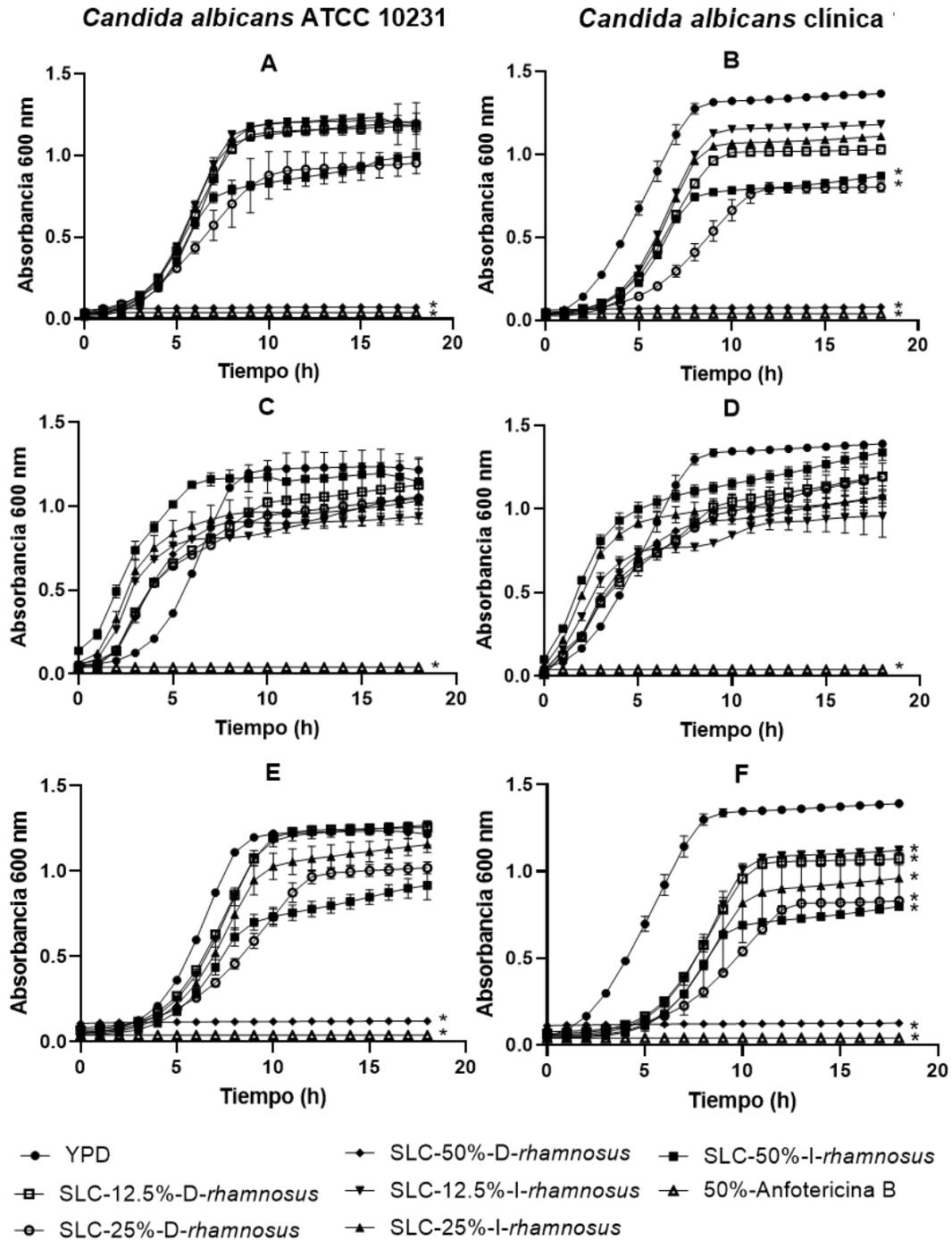


Figura 9.17 Cinética de crecimiento de *Candida* spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de *Lactocaseibacillus rhamnosus*: sobrenadantes A-B sin tratamiento, sobrenadantes neutralizados C-D y sobrenadantes a 121°C E-F. Los valores se expresan en densidad óptica (D.O.) como media \pm D.E. de los triplicados. (*) significa diferencia estadística en comparación con el control ($P < 0.05$).

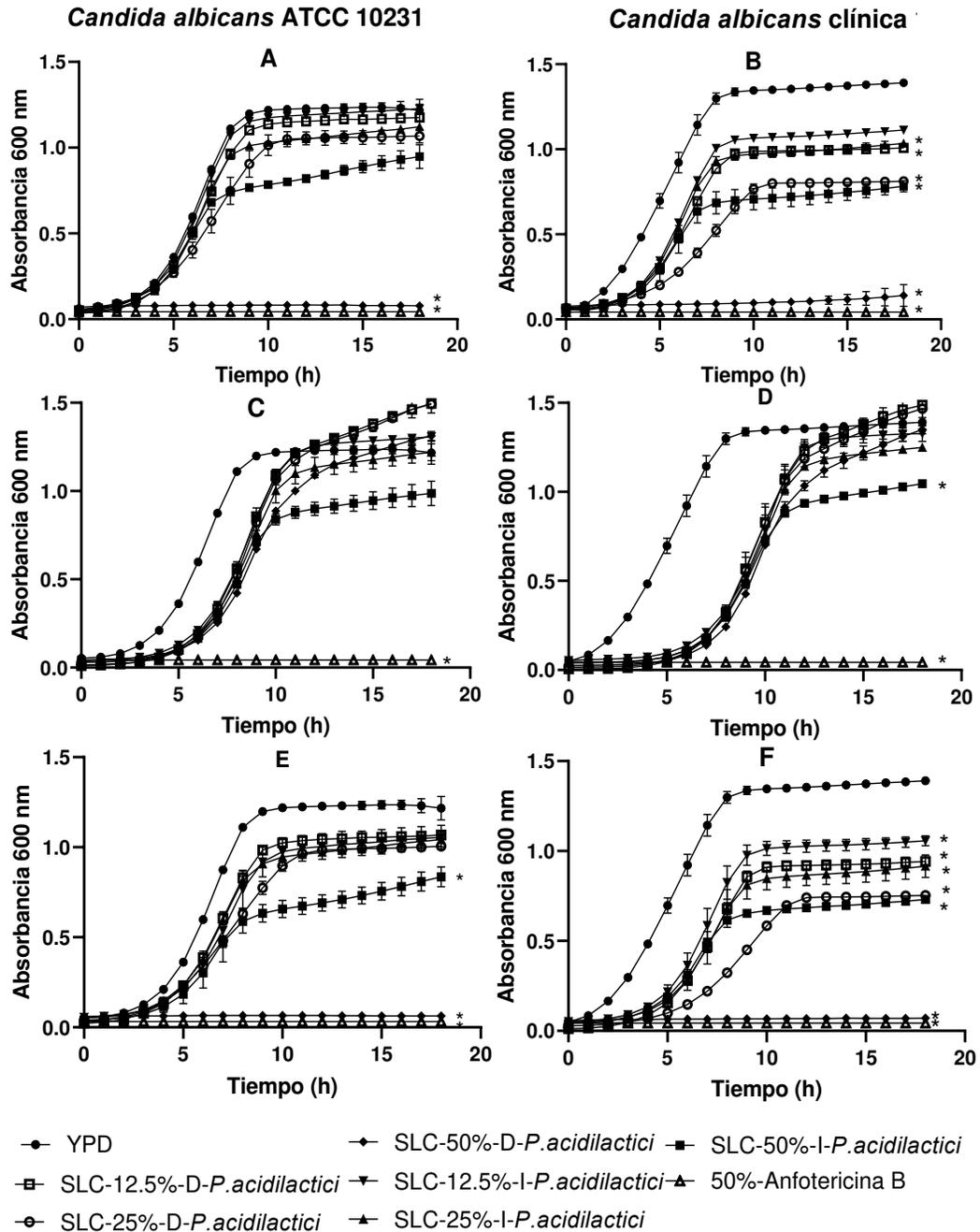


Figura 9.18 Cinética de crecimiento de *Candida* spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células obtenidos de *Pediococcus acidilactici*: sobrenadantes A-B sin tratamiento, sobrenadantes neutralizados C-D y sobrenadantes a 121°C E-F. Los valores se expresan en densidad óptica (D.O.) como media \pm D.E. de los triplicados. (*) significa diferencia estadística en comparación con el control ($P < 0.05$).

Tabla 9.13 Descripción de los sobrenadantes obtenidos de las bacterias probióticas.

Probióticos:				<i>L. rhamnosus</i>	<i>P. acidilactici</i>
Sobrenadante libre de células	Concentración del sobrenadante (%)	Tratamiento	Fuente de carbono	Código de verificación de las muestras	
SLC	50	Sin tratamiento	Inulina	SLC-50%-W-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-50%-W-I- <i>P.acidilactici</i>
	25			SLC-25%-W-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-25%-W-I- <i>P.acidilactici</i>
	12.5			SLC-12.5%-W-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-12.5%-W-I- <i>P.acidilactici</i>
	50		Dextrosa	SLC-50%-W-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-50%-W-D- <i>P.acidilactici</i>
	25			SLC-25%-W-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-25%-W-D- <i>P.acidilactici</i>
	12.5			SLC-12.5%-W-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-12.5%-W-D- <i>P.acidilactici</i>
	50	Neutralizado	Inulina	SLC-50%-N-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-50%-N-I- <i>P.acidilactici</i>
	25			SLC-25%-N-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-25%-N-I- <i>P.acidilactici</i>
	12.5			SLC-12.5%-N-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-12.5%-N-I- <i>P.acidilactici</i>
	50		Dextrosa	SLC-50%-N-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-50%-N-D- <i>P.acidilactici</i>
	25			SLC-25%-N-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-25%-N-D- <i>P.acidilactici</i>
	12.5			SLC-12.5%-N-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-12.5%-N-D- <i>P.acidilactici</i>
	50	Térmico	Inulina	SLC-50%-T-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-50%-T-I- <i>P.acidilactici</i>
	25			SLC-25%-T-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-25%-T-I- <i>P.acidilactici</i>
	12.5			SLC-12.5%-T-I- <i>rhamnosus</i>	SLC-12.5%-T-I- <i>P.acidilactici</i>
	50		Dextrosa	SLC-50%-T-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-50%-T-D- <i>P.acidilactici</i>
	25			SLC-25%-T-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-25%-T-D- <i>P.acidilactici</i>
	12.5			SLC-12.5%-T-D- <i>rhamnosus</i>	SLC-12.5%-T-D- <i>P.acidilactici</i>

Concentración del sobrenadante: 50%, 25% and 12.5% de los SLC fueron colocados en un nuevo medio YPD con las cepas de *Candida* spp.

Tratamiento: sin tratamiento (los SLC no recibieron ningún tratamiento), Neutralizados (los SLC se ajustaron a pH 6.5), térmico (los SLC se sometieron a 121°C, 15 min).

Código de verificación de las muestras: Primero; sobrenadante libre de células. Segundo, la concentración de los sobrenadantes.

Tercero, tratamiento. Cuarto, la fuente de carbono, y quinto, la cepa probiótica.

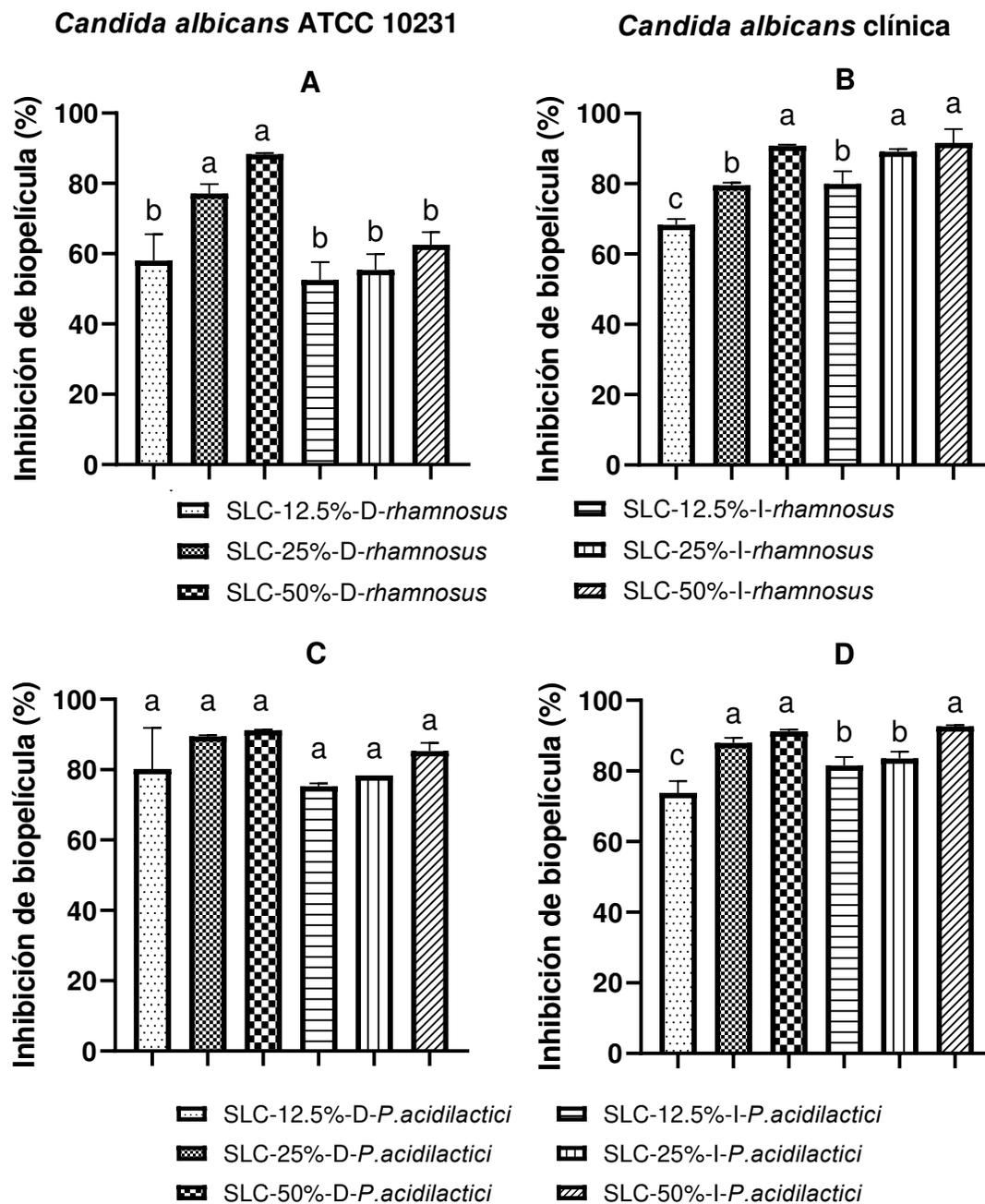


Figura 9.19 Prueba de inhibición de biopelícula contra *Candida* spp. en presencia de diferentes concentraciones de los sobrenadantes libres de células. A y B representan la inhibición de sobrenadantes libres de células obtenidos de *Lactobacillus rhamnosus*.

C y D representan la inhibición de sobrenadantes libres de células obtenidos de *Pediococcus acidilactici*. Los valores se expresan en densidad óptica (DO) como media \pm D.E. de los triplicados. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Tabla 9.14 Determinación de los ácidos grasos de cadena corta obtenidos de los probióticos en la metabolización de dextrosa e inulina como fuente de carbono.

AGCC	<i>L. rhamnosus</i>		<i>P. acidilactici</i>	
	Dextrosa	Inulina	Dextrosa	Inulina
Ácido láctico	8.24 ± 1.36 a	5.87 ± 0.70 b	9.02 ± 0.40 a	5.48 ± 0.17 b
Ácido acético	1.66 ± 0.37 b	7.00 ± 1.26 a	17.6 ± 2.54 a	6.92 ± 0.76 b
Ácido propiónico	0.21 ± 0.04 a	0.23 ± 0.06 a	0.66 ± 0.067 a	0.20 ± 0.03 a
Ácido butírico	1.83 ± 0.23 a	1.89 ± 0.20 a	1.80 ± 0.04 a	1.67 ± 0.02 a

AGCC: ácidos grasos de cadena corta. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las fuentes de carbono utilizadas por cada microorganismo para el contenido de metabolitos. Los valores se expresan como media ± D.E de los triplicados ($P < 0.05$).

Los SLC de *P. acidilactici* térmicamente tratados inhibieron el crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231. Se presentaron las siguientes densidades ópticas 0.063 ± 0.006 y 0.836 ± 0.056 para SLC-50%-T-I-*P. acidilactici* y SLC-50%-T-D-*P. acidilactici*, respectivamente (Figura 9.18e). Todos los SLC Térmicamente tratados inhibieron el crecimiento de *C. albicans* clínica (Figura 9.18f). Los SLC de dextrosa 12.5%-T-D-*P. acidilactici*, SLC-25%-T-D-*P. acidilactici* y SLC-50%-T-D-*P. acidilactici* inhibieron el crecimiento de *C. albicans* clínica: D.O. 0.941 ± 0.026 , 0.753 ± 0.003 y 0.070 ± 0.003 , respectivamente. Los SLC de inulina SLC-12.5%-T-I-*P. acidilactici*, SLC-25%-T-I-*P. acidilactici* y SLC-50%-T-I-*P. acidilactici* inhibieron el crecimiento de *C. albicans* clínica: O.D 0.073 ± 0.006 , 0.916 ± 0.062 y 0.731 ± 0.003 , respectivamente.

La Figura 9.19 muestra la inhibición de biopelículas de los sobrenadantes obtenidos de *L. rhamnosus* y *P. acidilactici*. Las muestras SLC-25%-D-*rhamnosus* (77.10%) y SLC-50%-D-*rhamnosus* (88.25%) mostraron los porcentajes de inhibición de biopelículas más altos contra *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 9.19a) mientras que las muestras SLC-50%-D-*rhamnosus* (90.83%), SLC-25%-I-*rhamnosus* (89.13%) y SLC-50%-I-*rhamnosus* (91.60%) mostraron el mayor efecto de inhibición de biopelículas contra *C. albicans* clínica; no se encontró diferencia estadística entre ellos ($P < 0.05$) (Figura 9.19b). Los SLC de dextrosa e inulina obtenidos de *P. acidilactici* mostraron inhibición de biopelícula contra *C. albicans* ATCC 10231. El porcentaje de inhibición fue del 80.17% al 91.25% para los SLC de dextrosa y del 75.25% al 85.26% para los SLC de inulina (Figura 9.19c). las muestras SLC-25%-D-*P. acidilactici*, SLC-50%-D-*P. acidilactici* y SLC-50%-I-*P. acidilactici* inhibieron la formación de biopelículas contra *C.*

albicans clínica como sigue: 87.99%, 91.17% y 92.59%, respectivamente; no se presentó diferencia estadística entre ellos ($P < 0.05$) (Figura 9.19d).

Las concentraciones de los AGCC se muestran en la Tabla 9.14. El ácido láctico fue el metabolito que *L. rhamnosus* sintetizó en mayor cantidad cuando se suplementó dextrosa o inulina como fuente de carbono (8.24 ± 1.36 y 5.87 ± 0.70 mM, respectivamente) ($P < 0.05$). Sin embargo, *L. rhamnosus* secretó una mayor cantidad de ácido acético ($P < 0.05$) cuando se suplementó con inulina (7.00 ± 1.26 mM) como fuente de carbono en comparación con la dextrosa (1.66 ± 0.37 mM). El ácido acético fue el AGCC que se encontró en mayor cantidad en los SLC de *P. acidilactici*, pero el SLC de dextrosa tuvo la concentración más alta (17.6 ± 2.54 mM) en comparación con el SLC de inulina (6.92 ± 0.76 mM) con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Las concentraciones de ácido láctico fueron 9.02 ± 0.40 mM y 5.48 ± 0.17 mM para los SLC de dextrosa e inulina, respectivamente; se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$). No se encontró diferencia estadística entre los ácidos propiónico y butírico de los SLC de *L. rhamnosus* y *P. acidilactici* suplementados con dextrosa o inulina. Los ácidos propiónico y butírico fueron los AGCC con la concentración más baja en todos los SLC.

10. Discusión de los resultados

10.1 Estudio de la microbiota intestinal cultivable

La mayoría de las especies fúngicas que habitan el tracto gastrointestinal son comensales y patógenos oportunistas que podrían convertirse en amenazas potenciales según la capacidad de virulencia de cada cepa y el estado del sistema inmunológico del hospedero (Rizzetto et al., 2015).

Desde esta perspectiva, para descubrir una infección patógena, es crucial definir con exactitud qué especies están normalmente presentes en cada nicho corporal. En este estudio, los sujetos con obesidad mostraron altos conteos de levaduras cultivables en comparación con los sujetos normopeso. Esto concuerda con el estudio de Borges et al. (2018) en el que los sujetos con obesidad mostraron mayor presencia de levaduras en comparación con los sujetos normopeso y con sobrepeso. Otro estudio demostró que el aumento en el conteo total de levaduras aisladas de heces se correlacionó negativamente con la expresión del gen PPAR α , cuya activación está involucrada en la disminución de la acumulación de grasa corporal (Dong-Hyeon et al., 2017). Por tanto, es posible plantear la hipótesis de que la alta presencia de levaduras y la expresión del gen PPAR α están relacionados con el peso corporal y el control de la grasa corporal.

Los resultados de este estudio muestran que la microbiota intestinal cultivable pertenece a los filos Ascomycota y Basidiomycota. Ascomycota presentó una mayor prevalencia en los 3 grupos de estudio. Esto concuerda con otros estudios que han informado que Ascomycota y Basidiomycota son los filos dominantes en la microbiota intestinal humana (Anandakumar et al., 2019; Coker et al., 2019; Hallen-Adams & Suhr, 2017; J. Li et al., 2018). Otros estudios mostraron una alta proporción de especies fúngicas pertenecientes a Ascomycota en comparación con las pertenecientes a Basidiomycota (Borges et al., 2018; Hamad et al., 2017; Rodríguez et al., 2015). *Candida* spp. fue el género con mayor presencia en este estudio. Hoffmann et al. (2013) investigaron la relación entre la dieta y la comunidad fúngica intestinal y encontraron que *Candida* spp. se correlacionó positivamente con el consumo de carbohidratos, principalmente azúcares simples, similar a este estudio. Sin embargo, esta correlación no fue estadísticamente significativa. Además, encontramos que los sujetos con obesidad y con sobrepeso consumían más carbohidratos que los normopeso.

Borgo et al. (2017) informaron que la presencia de *Candida* spp. podría estar relacionada con la descomposición del almidón de los alimentos con carbohidratos, lo que lleva a la liberación de

azúcares simples en el intestino que, a su vez, son fermentados por bacterias (*Prevotella* spp. y *Ruminococcus* spp.). Con respecto a la microbiota intestinal bacteriana, existe evidencia que demuestra el papel de dos filos bacterianos específicos en sujetos obesos (alta abundancia de Firmicutes y baja abundancia de Bacteroidetes) (Al-Assal et al., 2018).

La relación Firmicutes-Bacteroidetes se puede modificar de acuerdo al peso corporal y la dieta, especialmente en dietas con alto contenido de lípidos (Huazano-García et al., 2017). En relación con esto, Hoffmann et al. (2013) y Mukherjee et al. (2015) reportaron una correlación negativa entre *Candida* spp. y Bacteroidetes. Esta correlación negativa está relacionada con un aumento de *Candida* spp. y una disminución de Bacteroidetes, mostrando un perfil de Bacteroidetes similar al de la obesidad. Los resultados del presente estudio mostraron una alta presencia de *Candida* en sujetos con sobrepeso y obesidad en comparación con los normopeso. Por lo tanto, es posible pensar que los grupos con sobrepeso y obesidad de este estudio podrían mostrar una alta cantidad de Firmicutes y una baja presencia de Bacteroidetes. Para confirmar esto, será necesario estudiar las bacterias intestinales en ensayos futuros.

Candida albicans se considera parte de la microbiota intestinal autóctona, y también se ha reportado que su colonización está ampliamente relacionada con el agravamiento de la inflamación. Varios estudios han reportado que los sujetos con obesidad pueden tener diferentes grados de inflamación (Sonoyama et al., 2011). En este estudio se presentó alta presencia de *Candida albicans* en las heces de sujetos con obesidad en comparación con los normopeso y sobrepeso. Ng et al. (2016) reportaron que la principal fuente de carbono de *Candida albicans* es la glucosa; por tanto, es posible pensar que la presencia de *C. albicans* se debe a la alta ingesta de azúcar de los participantes con obesidad. Además, *Candida albicans* mostró una correlación positiva con parámetros relacionados con la obesidad y enfermedades metabólicas (peso, IMC, las circunferencias de cadera y cintura, índice cintura-cadera y masa grasa) y mostró una correlación negativa con el colesterol HDL y la masa magra, parámetros relacionados con buena salud (Bardagjy & Steinberg, 2019). Además, en el análisis discriminante lineal, *Candida albicans* mostró el coeficiente más significativo.

Candida glabrata estuvo presente en todos los grupos; por tanto, es posible pensar que esta levadura no pertenece a un grupo específico tomando como referencia el IMC. La abundancia relativa de esta levadura fue mayor que la de otras especies. Curiosamente, los sujetos

normopeso mostraron mayor prevalencia de *C. glabrata*. Sin embargo, algunos estudios han reportado que este microorganismo está asociado con infecciones (Li et al., 2007) y pacientes hospitalizados (Cataldi et al., 2016; Khatib et al., 2001). Se necesitan más estudios para comprender el papel de *C. glabrata* en la microbiota intestinal mexicana o el metabolismo.

Rhodotorula mucilaginosa tuvo alta presencia en el grupo de sujetos con obesidad. En la microbiota intestinal, este microorganismo se considera un patógeno oportunista (Nina Gouba et al., 2013). Este microorganismo se puede encontrar en el medio ambiente y su transmisión a los seres humanos se produce principalmente a través del aire y los alimentos. Sin embargo, su crecimiento en el tracto gastrointestinal puede estar inhibido debido a que sus condiciones de crecimiento no son óptimas estando en el tracto gastrointestinal. *R. mucilaginosa* puede mostrar alta presencia en el tracto gastrointestinal cuando hay una alteración de la microbiota intestinal o disbiosis (Hof, 2019). Una razón particular de esta alteración es el tratamiento con azoles, que crea una ventaja para estos hongos resistentes a los azoles.

Los pacientes hospitalizados tratados con azoles (fluconazol y posaconazol) presentaron una alta presencia de *R. mucilaginosa* en comparación con los tratados con anfotericina B y flucitosina, que son los agentes antifúngicos con mayor espectro (Gomez-Lopez et al., 2005; Potenza et al., 2019). Es importante mencionar que altas cantidades de *R. mucilaginosa* no son alarmantes. Por el contrario, cuando este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal humano, puede producir algunos nutrientes, como proteínas, lípidos, vitaminas y carotenoides (Hof, 2019).

Las levaduras que pertenecen al género *Rhodotorula* son capaces de metabolizar ácidos grasos de cadena corta como los ácidos acético, propiónico y butírico. Por tanto, es factible que una presencia masiva de *Rhodotorula* spp. en el intestino podría provocar una escasez de estos productos bacterianos. *Rhodotorula* spp. es capaz de producir lípidos utilizando glucosa (Luan et al., 2015), ácido acético y ácido propiónico y producir ácidos grasos saturados e insaturados (Kolouchová et al., 2015). Con esta información, es posible plantear la hipótesis de que *Rhodotorula mucilaginosa* en sujetos con obesidad juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad y correlación positiva con la masa grasa. Algunos de los ácidos grasos producidos por *Rhodotorula* spp. son los ácidos palmítico y esteárico (16:0 y 18:0, respectivamente); Aro et al. (1997) reportaron que estos ácidos grasos son importantes en la disminución de HDL.

En este estudio, los sujetos con obesidad presentaron bajas cantidades de HDL con respecto a los grupos normopeso y sobrepeso. Además, el tejido adiposo utiliza el ácido palmítico y esteárico para la lipogénesis (Yanting et al., 2018). Asimismo, un estudio reportó que el ácido palmítico posee efecto colesterolémico (Tholstrup et al., 1994), y en este estudio se mostró alta presencia de colesterol en sujetos con obesidad. No hay suficientes estudios que demuestren cómo afecta la microbiota intestinal al metabolismo de los lípidos del huésped, como se ha informado con las bacterias intestinales (Ghazalpour et al., 2016). Sin embargo, Rodríguez et al. (2015) relacionaron la presencia de *Rhodotorula* spp. con anomalías metabólicas asociadas con la alteración de lípidos. Por tanto, es posible plantear la hipótesis de que la microbiota intestinal, especialmente *Rhodotorula* spp., es capaz de modular la producción de ácidos grasos, la energía y el estado nutricional del huésped y contribuye al desarrollo de la obesidad. Esto podría estar relacionado con los resultados de este estudio porque *Rhodotorula* spp. mostró una correlación positiva con el peso, el índice de masa corporal, la cadera y la masa grasa. Por tanto, con estos resultados y el papel de *Rhodotorula* spp. en el metabolismo de los lípidos, es factible esperar que esta levadura esté relacionada con la obesidad.

Candida kefyr se presentó sólo en sujetos con obesidad y mostró una correlación positiva con el índice de masa corporal y la grasa subcutánea tricipital, subescapular y suprailíaca. Además, el consumo de carbohidratos, principalmente azúcares simples, mostró una correlación positiva con *C. kefyr*, pero no alcanzó a ser estadísticamente significativa. Esto es similar a otro estudio, que informó la presencia de *C. kefyr* en la microbiota oral sólo en sujetos con obesidad en comparación con sujetos normopeso (Hudek et al., 2018). Sin embargo, otros estudios relacionaron la presencia de *C. kefyr* con una disminución de la obesidad o la pérdida de peso (Dong-Hyeon et al., 2017). *C. kefyr* es otra levadura que es capaz de modificar la relación Firmicutes-Bacteroides (Hoffmann et al., 2013), y esta modificación puede cambiar el desarrollo de la obesidad (Takata et al., 2015). Por tanto, es posible pensar que *C. kefyr* puede afectar el peso corporal.

Candida lambica estuvo presente sólo en los grupos con sobrepeso y obesidad. Además, el análisis discriminante lineal mostró un alto coeficiente en estos grupos. *C. lambica* mostró correlación positiva con variables relacionadas con la ganancia de peso, incluyendo peso, IMC, grasa subcutánea (tricipital, bicipital y suprailíaca) y la acumulación de masa grasa. Además, *C.*

lambica presentó correlación positiva con el índice cintura-cadera, que es un parámetro relacionado con la obesidad central tipo androide (definida como obesidad central o abdominal con distribución excesiva de grasa corporal en el abdomen). Este tipo de obesidad se caracteriza por varios riesgos para la salud, como hipertensión, enfermedades cardiometabólicas y resistencia a la insulina (Leary et al., 2018).

Fraberger et al. (2018) reportaron que *C. lambica* es capaz de metabolizar azúcares simples, como glucosa, fructosa y sacarosa. En base con los resultados dietéticos, los participantes con sobrepeso y obesidad consumieron grandes cantidades de carbohidratos. Se ha reportado que un porcentaje de los carbohidratos de la dieta pueden escapar de la digestión en el intestino delgado y llegan al colon, y estos carbohidratos podrían ser consumidos por este microorganismo (Blaut & Clavel, 2007). Scott et al. (2013) reportaron que 40 g de carbohidratos al día llegan a la microbiota intestinal, y este valor depende de la ingesta de carbohidratos en la dieta. Por tanto, en dietas altas en carbohidratos, como las que consumen los grupos con sobrepeso y obesidad, habrá más carbohidratos disponibles en el colon, y con esto, puede ocurrir el crecimiento de microorganismos, como *C. lambica*.

Es importante destacar que, en nuestro estudio, *Kazachstania exigua* y *Candida orthopsilosis* sólo estuvieron presentes en sujetos normopeso, mientras que *Candida valida* y *Geotrichum candidum* sólo estuvieron presentes en sujetos con obesidad. Ningún informe ha indicado claramente el papel de estas levaduras en el tracto gastrointestinal; por tanto, es importante estudiar con profundidad las funciones de estos microorganismos en la micobiota intestinal.

Los resultados de este estudio demuestran que hay diferencias entre la micobiota intestinal cultivable en sujetos mexicanos normopeso, sobrepeso y obesidad. Los sujetos con obesidad mostraron los conteos más altos de UFC, mientras que el grupo normopeso mostró los conteos bajos. Ascomycota y Basidiomycota fueron los dos filos encontrados de los microorganismos fúngicos identificados, y Ascomycota fue el que mostró mayor abundancia. *Candida* spp. fue el género que mostró más especies. *Candida albicans* fue la levadura con mayor presencia en sujetos con obesidad. *Candida albicans*, *C. kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa* fueron las levaduras que mostraron correlación positiva con la obesidad, el aumento de peso y la masa grasa y mostraron correlación negativa con el HDL y la masa magra, parámetros relacionados con la pérdida de peso. Por otro lado, *Kazachstania exigua* y *Candida orthopsilosis* se

encontraron sólo en sujetos normopeso. Estos resultados se obtuvieron a partir de técnicas dependientes de cultivos microbiológicos. Por lo tanto, proponemos estudiar la micobiota intestinal de estas poblaciones con técnicas moleculares para investigar la comunidad fúngica no cultivable y su relación con la obesidad.

10.2 Estudio del microbioma y micobioma intestinal

Antes de este estudio, la micobiota intestinal cultivable de estos mismos participantes, ya había sido evaluada por métodos dependientes de cultivo en combinación con la técnica de MALDI TOF (García-Gamboa et al., 2021).

En este estudio se presentan los resultados del análisis de la micobiota intestinal por técnicas moleculares, lo cual permite realizar una comparación entre ambos estudios. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en estudiar la comunidad bacteriana que habita en el tracto gastro intestinal y su relación con diversos estados fisiológicos y patológicos (Fan & Pedersen, 2021). Sin embargo, en el microbioma intestinal también habitan microorganismos tipo arqueas, eucariotas y virus y las funciones de estos microorganismos sobre la salud no están completamente elucidadas (Coker, 2021). En este estudio se identificó el microbioma y micobioma intestinal en mexicanos normopeso, con sobrepeso y obesidad relacionándolo con los parámetros antropométricos, bioquímicos y dietéticos.

Las bacterias son los principales microorganismos encontrados en el microbioma intestinal. Por otra parte, las secuencias de ADN de las especies fúngicas intestinales pueden representar aproximadamente el 0.1% del total de secuencias genómicas (Nash et al., 2017). Aunque la población fúngica en el intestino representa aproximadamente entre el 0.03% y el 2.0% de los microorganismos, el tamaño de una célula fúngica puede ser de hasta 100 veces mayor que una célula procariota (García-Gamboa et al., 2021) por lo tanto forman una importante biomasa a nivel intestinal. Además, se ha reportado que los microorganismos fúngicos tienen diversas funciones sobre el metabolismo del huésped, por lo tanto, son un componente interesante para estudiar en el contexto de la salud y la enfermedad (Hoffmann et al., 2013).

Los resultados de la diversidad alfa no mostraron diferencias significativas tanto en la composición de bacterias como de hongos en los tres grupos de estudio. Lo anterior es diferente al trabajo reportado por Borgo et al., (2017), en el cual los sujetos con obesidad mostraron disminución en la diversidad alfa de la comunidad bacteriana, en comparación con los

participantes con peso saludable. Otro estudio evaluó la diversidad bacteriana en sujetos con obesidad metabólicamente sana y en sujetos con obesidad metabólicamente enferma, se encontró que el segundo grupo presentó menor diversidad (Kim et al., 2020). En estudios previos se ha demostrado que la diversidad bacteriana intestinal está asociada con diferentes componentes metabólicos, por ejemplo mayor riqueza se correlaciona negativamente con el aumento de triglicéridos, y positivamente con las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las cuales se ha demostrado ejercer un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares (Matey-Hernandez et al., 2018).

La diversidad de la comunidad fúngica del microbioma intestinal sigue siendo poco explorada. En el presente estudio no se mostró diferencia significativa en la diversidad de los microorganismos fúngicos en ninguno de los grupos de estudio. Se ha reportado que la diversidad fúngica puede estar afectada con la presencia de enfermedades infecciosas, como en infecciones por el virus de la hepatitis B donde se mostró mayor diversidad fúngica en comparación con la microbiota de los voluntarios sanos, mostrando que la diversidad fúngica se relaciona positivamente con la progresión de la enfermedad (Chen et al., 2011). Otro estudio evaluó la diversidad fúngica en pacientes con presentaban la enfermedad de Crohn y la comparó con la de individuos sanos, se encontró que los participantes con la patología de mostraron mayor diversidad (Mukherjee et al., 2015). Por lo tanto, es posible plantearse la hipótesis de que la diversidad fúngica en el intestino podría estar relacionada positivamente con la presencia de patologías. Sin embargo, son necesarios futuros estudios que prueben el papel de la microbiota en el desarrollo y progresión de las patologías. Algunos estudios que han estudiado la diversidad de la microbiota y la microbiota intestinal, han encontrado que la las bacterias poseen mayor diversidad en comparación con la comunidad fúngica (Hallen-Adams & Suhr, 2017; Nash et al., 2017; Qin et al., 2010), lo anterior es consistente con nuestro estudio.

Se ha reportado que los individuos que presentan obesidad tienen alta abundancia de Firmicutes (Jinatham et al., 2018; Koliada et al., 2017) y baja abundancia de Bacteroidetes (Crovesy et al., 2020; Koliada et al., 2017).

En este estudio los grupos con sobrepeso y obesidad presentaron un perfil similar al anterior y mostraron un aumento en la relación Firmicutes/Bacteroidetes en comparación con el grupo normopeso. La relación Firmicutes/Bacteroidetes se cita con frecuencia en la literatura como un

sello distintivo en la obesidad (Magne et al., 2020). Por otra parte, las dietas que conducen a la obesidad, es decir altas en calorías, carbohidratos y lípidos, pueden aumentar la relación Firmicutes/Bacteroidetes y promover un estado disbiosis intestinal, que se caracteriza como un desequilibrio en la comunidad microbiana (Locke et al., 2015).

Se ha reportado un incremento de Bacteroidetes en la microbiota de sujetos que fueron sometidos a dietas restringidas en calorías, en sujetos con peso saludable y en sujetos que han perdido peso corporal (Magne et al., 2020). Asimismo, Bacteroidetes ha demostrado correlación positiva con la reducción de grasa corporal, mientras que Firmicutes se asocia con bacterias productoras de energía, debido a que los microorganismos pertenecientes a este filo pueden secretar enzimas capaces de metabolizar carbohidratos complejos que no son digeridos en la parte alta del tracto gastrointestinal, permitiendo mayor disponibilidad y absorción de energía a partir de estos nutrientes (Crovesy et al., 2020).

Proteobacteria es un filo que con frecuencia presenta variabilidad en su abundancia. Alta abundancia de Proteobacteria puede estar relacionada con disbiosis intestinal y una disminución de la diversidad bacteriana (Stojanov et al., 2020). En este estudio los grupos con sobrepeso y obesidad presentaron mayor abundancia de Proteobacteria en comparación con el grupo normopeso.

Bacteroides spp. fue uno de los géneros que presentó mayor prevalencia en este estudio, mostrando mayor abundancia en los grupos con sobrepeso y obesidad. Este género se ha asociado con dietas altas en grasas y dietas de estilo occidental, por lo tanto, esto es consistente con los resultados de este estudio debido a que los grupos con mayor IMC mostraron alta ingesta de grasa (García-Gamboa et al., 2021).

La presencia de *Prevotella* spp. en los participantes normopeso puede estar relacionado con lo reportado por Bushman et al. (2013), debido a que *Prevotella* spp. se asocia con el consumo de dietas altas en fibras dietéticas. Asimismo, el índice *Bacteroides/Prevotella* se han propuesto como posible biomarcador en la identificación de estados nutricionales y en el manejo de la obesidad (Ortega-Santos & Whisner, 2019).

Un bajo índice de *Bacteroides/Prevotella* se ha asociado con la obesidad (Borgo et al., 2017). *Bacteroides Vulgatus*, especie que mostró mayor presencia en el grupo normopeso, ha mostrado

correlación negativa con la obesidad. Mientas que, la presencia de esta especie en individuos normopeso se relaciona con un ecosistema intestinal saludable, además, de mostrar un papel protector contra la aterosclerosis (Yoshida et al., 2021). *Prevotella copri*, especie que presentó mayor abundancia de su género, mostró mayor presencia en sujetos normopeso, este hallazgo puede estar relacionado con el mejoramiento en el metabolismo de la glucosa debido a un mecanismo asociado con la producción de succinato a partir de la fermentación de fibras dietéticas, según lo reportado por Cani, (2018).

En este estudio, los grupos con elevado IMC presentaron mayor presencia de *Akkermansia* spp., principalmente *Akkermansia muciniphila*. Diferente a estos resultados, los trabajos de Borgo et al. (2017) y Everard et al. (2013) reportaron que *A. muciniphila* está inversamente relacionada con el aumento de peso. Otros estudios se ha reportado que la presencia de *A. muciniphila* en sujetos con obesidad puede mejorar algunos parámetros metabólicos, como la sensibilidad a la insulina, y el colesterol total en plasma (Depommier et al., 2019), glucosa y triglicéridos y mejora el estado metabólico en general (Dao et al., 2016). Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en este estudio debido a que los participantes con sobrepeso y obesidad que presentaron alta abundancia de *A. muciniphila* mostraron un perfil saludable de lípidos y glucosa, en comparación que los participantes con sobrepeso y obesidad con baja abundancia de este microorganismo.

En este estudio, Ascomycota y Basidiomycota fueron los filos fúngicos que predominaron en la microbiota intestinal de los tres grupos. Esto coincide con otros estudios que demuestran que la mayoría de los microorganismos fúngicos en otras partes del cuerpo, incluida la piel, la vagina, el intestino y la cavidad bucal, pertenecen a estos filos (Drell et al., 2013; Dupuy et al., 2014; Findley et al., 2013; Ghannoum et al., 2010). En este trabajo, *Nakaseomyces* spp., *Saccharomyces* spp., *Kazachstania* spp., *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., y *Malassezia* spp. fueron los géneros que mostraron mayor abundancia. En un estudio donde se secuenció la región 2 del gen ITS en el microbioma intestinal de participantes saludables, se mostró baja diversidad en la comunidad fúngica. Encontraron que, el género *Saccharomyces* spp. fue el más abundante en el microbioma de individuos sanos, seguido de *Malassezia* spp. y *Candida* spp. (Nash et al., 2017). En este estudio se analizó la región 1 del gen ITS y estuvieron presentes estos tres géneros fúngicos.

Se ha reportado que *Candida* spp. puede formar parte del microbioma intestinal en sujetos sanos. En un estudio que investigó la posible relación que existe entre la microbiota intestinal y la dieta, encontraron que *Candida* spp. mostró correlación positiva con el consumo de carbohidratos (Hoffmann et al., 2013). Esto coincide con este estudio, debido a que los participantes con sobrepeso y obesidad mostraron mayor consumo de carbohidratos en sus reportes dietéticos. Lo anterior puede ser debido a que *Candida* spp. participa en la descomposición de polisacáridos en los alimentos, liberando azúcares simples, que, a su vez, son fermentados por bacterias intestinales como *Ruminococcus* spp. (Borgo et al., 2017).

En el trabajo de Bardagjy y Steinberg, (2019) se reportó que *Candida albicans* mostró una correlación positiva con diferentes parámetros relacionados con la obesidad (peso, IMC, circunferencias de cadera y cintura, índice cintura-cadera y masa grasa) y enfermedades metabólicas, mostrando una correlación negativa con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la masa magra, parámetros relacionados con buena salud (Bardagjy & Steinberg, 2019). En el estudio de la microbiota cultivable se observó que *C. albicans* presentó alta presencia, principalmente en los participantes con obesidad (García-Gamboa et al., 2021).

En este estudio, el grupo con sobrepeso mostró mayor prevalencia de *Candida* spp., siendo *Candida zeylanoides* la que mostró mayor abundancia. A pesar de que existen reportes que indiquen que *C. zeylanoides* puede habitar en el tracto gastrointestinal (Raimondi et al., 2019), su papel en la fisiología y patología del huésped no está bien estudiado. Por otra parte, *C. parapsilosis* también mostró alta presencia en sujetos con sobrepeso. Se ha reportado que la presencia de *C. parapsilosis* en dietas altas en grasas, promueve el desarrollo de la obesidad. El mecanismo está asociado a que esta levadura secreta lipasas, permitiendo una mayor descomposición y aprovechamiento de las grasas que se encuentra en el tracto gastrointestinal (Sun et al., 2021). Lo anterior también es consistente con el estudio de la microbiota cultivable, en el cual *C. parapsilosis* mostró mayor abundancia en el grupo con sobrepeso (García-Gamboa et al., 2021).

Saccharomyces spp., *Nakaseomyces* spp., *Malassezia* spp. no mostraron presencia en el estudio de microbiota cultivable en los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad. Lo anterior puede ser debido a que algunas especies fúngicas no se cultivan de forma consistente y pueden tener condiciones de crecimiento más estrictas, por ejemplo, *Malassezia* spp. muestra condiciones de

cultivo más estrictas, y no puede cultivarse en medios de cultivo comunes para levaduras, como Sabouraud Dextrosa (Nash et al., 2017).

El ligero aumento del filo Basidiomycota en sujetos con sobrepeso y obesidad se debió al aumento de *Malassezia* spp. Este microorganismo se ha reportado principalmente en el microbioma de la piel y puede representar hasta el 90% de los hongos que habitan en este nicho. En el tracto gastrointestinal, su presencia es controversial, ya que *Malassezia* spp. se ha asociado con inflamación a nivel intestinal y cáncer (Spatz & Richard, 2020). Otro estudio identificó la presencia de *Malassezia* spp. en el microbioma intestinal de sujetos sanos, encontrando que este microorganismo es el segundo género con mayor abundancia (Raimondi et al., 2019). Dentro de este género, *Malassezia globosa* fue la especie más abundante, esto es consistente con lo reportado por (Nash et al., 2017).

En este estudio los grupos con sobrepeso y obesidad mostraron mayor presencia de esta especie. Sin embargo, no se encontraron reportes que indiquen la relación entre *M. globosa* y el desarrollo de la obesidad. *M. globosa* se ha asociado principalmente con enfermedades fuera del intestino, como enfermedades relacionadas con daño pancreático y enfermedades del sistema nervioso central (Spatz & Richard, 2020). Tanto *Malassezia* spp., como *Aspergillus* spp. fueron géneros diferenciales en los participantes con obesidad, no se encontraron reportes que indiquen el papel de estos microorganismos en la ganancia de peso corporal.

Los resultados de este estudio mostraron que *Saccharomyces* spp. presentó correlación positiva con el IMC. Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos de *Saccharomyces* spp. que contribuyen con el desarrollo de la obesidad, este microorganismo puede colonizar en el tracto gastrointestinal y puede permanecer estable en este nicho por largos periodos de tiempo (Raimondi et al., 2019). Mims et al. (2021) reportaron que la variación en la abundancia de *Saccharomyces* spp. está relacionada con la ganancia de peso y con alteraciones metabólicas. Por otra parte, se ha reportado que la clase Saccharomycetes se relaciona positivamente con la adiposidad y con alteraciones metabólicas en sujetos con obesidad en comparación con sujetos normopeso (Rodríguez et al., 2015).

Un hallazgo importante que ocurrió en el estudio de la micobiota cultivable es que *Rhodotorula* spp. presentó alta abundancia en sujetos con obesidad (García-Gamboa et al., 2021). Sin embargo, en este estudio no se mostró la presencia de *Rhodotorula* spp. en ninguno de los

grupos. La alta abundancia de *Rhodotorula* spp. se ha asociado con disbiosis intestinal (Hof, 2019), y se ha asociado con la obesidad debido a que es capaz de sintetizar lípidos al utilizar glucosa, ácido acético y ácido propiónico como fuente de carbono y producir ácidos grasos saturados e insaturados (Kolouchová et al., 2015). Por tanto, es posible plantear la hipótesis de que la microbiota intestinal, especialmente *Rhodotorula* spp., es capaz de modular la producción de ácidos grasos, la energía y el estado nutricional del huésped y que contribuye al desarrollo de la obesidad. Los estudios que han identificado a *Rhodotorula* spp. mediante técnicas moleculares se han enfocado en el gen 18S (Borges et al., 2018; Deligios et al., 2015). Por lo tanto, es posible deducir que, por esta razón, en este estudio no se pudo identificar este microorganismo, debido a la utilización del gen ITS 1.

La presencia de *Kazachstania* spp. en el grupo normopeso fue similar al estudio de la microbiota cultivable (García-Gamboa et al., 2021). *Kazachstania exigua* fue la principal especie encontrada en ambos estudios. No se ha encontrado algún reporte que informen el papel de *K. exigua* en el microbioma intestinal humano, algunos estudios han reportado la presencia de *Kazachstania* spp. en la microbiota intestinal de algunos animales, principalmente cerdos (Bendová et al., 2020), resaltando la importancia de *Kazachstania* spp. en el desarrollo de un microbioma porcino saludable, debido a que promueve el crecimiento de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (Urubschurov et al., 2017), lo cual puede considerarse como un beneficio en la salud intestinal (Blaak et al., 2020). Por tanto, futuros estudios deberían considerar las funciones de este microorganismo y su papel en la microbiota intestinal en humanos.

En el estudio de Witherden et al. (2017) reportaron que existe efecto antagonista entre *Pichia* spp. y *Candida* spp., de modo que un aumento en la abundancia de *Pichia* spp. se asocia con una reducción de *Candida* spp. Lo anterior es similar a los resultados obtenidos en este estudio, debido los sujetos con obesidad presentaron mayor presencia de *Pichia* spp. y baja abundancia de *Candida albicans* en comparación con los participantes con sobrepeso y normopeso. La presencia de *Pichia* spp. en el grupo de individuos con obesidad es similar a los datos reportados por Rodríguez et al. (2015) y Gouba et al. (2019). El efecto antagonista de *Pichia* spp. puede ser debido a lo reportado por Mukherjee et al. (2014), debido a que *Pichia* spp. limita de nutrientes y modula la síntesis de factores de crecimiento y de virulencia contra *Candida* spp.

Esto resalta la importancia de seguir investigando el papel de las interacciones entre los microorganismos que forman parte de la microbiota y microbiota intestinal, sobre todo en el desarrollo del sobrepeso y obesidad.

Otro hallazgo importante se mostró en el análisis discriminante lineal de la comunidad fúngica, tanto en este estudio como en el estudio de la microbiota cultivable (García-Gamboa et al., 2021). En ambos estudios, se mostraron clusters claramente diferenciados para los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad de acuerdo a las observaciones realizadas en la abundancia de microorganismos fúngicos. No se encontraron reportes que agrupen grupos de personas en base a su IMC y a la composición de la comunidad fúngica, sin embargo, estos resultados pueden resaltar la importancia de seguir investigando el papel de la microbiota intestinal y su papel en la obesidad. Los microorganismos fúngicos que mostraron presencia y similitud en ambos estudios fueron *Candida* spp. en sujetos con sobrepeso, *C. parapsilosis* en los grupos normopeso y con sobrepeso, *Pichia* spp. en sujetos con obesidad, *Kazachstania* spp. y *K. exigua* en sujetos normopeso. Los hallazgos encontrados en la microbiota intestinal cultivable y por secuenciación, pueden proporcionar interés a seguir investigando esta área, tanto desde la perspectiva funcional como de la diversidad microbiana y que la microbiota intestinal pueda ser abordada desde el punto de vista de nutrición humana, salud, enfermedad, metabolismo de los fármacos, entre otros.

En resumen, las bacterias mostraron mayor diversidad que los microorganismos fúngicos en el microbioma intestinal en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad. En el análisis Beta las bacterias mostraron clusters diferenciados en los grupos normopeso, con sobrepeso y obesidad, mostrando diferencia significativa. Sin embargo, en la microbiota no se mostró este efecto. Se observó que los índices Firmicutes/Bacteroidetes y *Bacteroides/Prevotella* mostraron correlación positiva con el IMC, estos índices son parámetros encontrados en la obesidad. Los participantes con sobrepeso y obesidad que presentaron mayor abundancia de *Akkermansia muciniphila* mostraron un perfil saludable de lípidos y glucosa, en comparación con los participantes con sobrepeso y obesidad que presentaron baja abundancia de *A. muciniphila*. *Eggerthella* spp., *Allisonella* spp., *Subdoligranulum* spp., *Dielma* spp., *Clostridium* spp. y *Romboutsia* spp. fueron los géneros bacterianos diferenciales en los grupos con sobrepeso y obesidad. Además, mostraron correlación positiva con las variables antropométricas,

bioquímicas y dietéticas relacionadas con el aumento de peso. *Faecalibacterium* spp., *Histophilus* spp., *Rikenella* spp., *Odoribacter* spp. y *Marvinbryantia* spp. fueron los géneros bacterianos diferenciales en el grupo normopeso, mostraron correlación positiva con las variables antropométricas, bioquímicas y dietéticas relacionadas con buena salud y peso ideal.

Ascomycota y Basidiomycota fueron los filos más abundantes en la microbiota intestinal de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad. Ascomycota presentó mayor abundancia. *Nakaseomyces* spp. y *Saccharomyces* spp. fueron los géneros fúngicos que presentaron mayor abundancia en la microbiota intestinal en los tres grupos.

Nakaseomyces spp., *Kazachstania* spp., *Kluyveromyces* spp. y *Hanseniaspora* spp., fueron los géneros que mostraron mayor abundancia en sujetos normopeso, mostraron relación negativa con el IMC. Mientras que *Saccharomyces* spp., *Debaryomyces* spp. y *Pichia* spp., fueron los géneros con mayor abundancia en sujetos con sobrepeso y obesidad y mostraron relación positiva con el IMC. *Candida* spp. presentó mayor abundancia en sujetos con sobrepeso, mostrando correlación positiva con el consumo de hidratos de carbono simples. *Malassezia* spp. y *Aspergillus* spp. fueron los géneros fúngicos diferenciales en sujetos con obesidad y mostraron relación con las variables antropométricas, bioquímicas y dietéticas relacionados con la ganancia de peso. La presencia de *Kazachstania* spp. en el grupo normopeso, de *Candida parapsilosis* en los grupos normopeso y sobrepeso, y de *Pichia* en el grupo con obesidad, fue consistente con el estudio de la microbiota cultivable.

10.3 Evaluación de simbióticos con efecto de inhibición de crecimiento contra *Candida albicans*

Lactobacillus paracasei y *Lactobacillus plantarum* son bacterias con propiedades probióticas (Roobab et al., 2020). Uno de los beneficios de estos probióticos es su efecto inhibitorio contra las bacterias patógenas intestinales (García-Gamboa et al., 2019). Sin embargo, existen pocos estudios que se enfoquen en el efecto antimicrobiano de estos probióticos contra las levaduras intestinales.

En el presente estudio, *L. paracasei* y *L. plantarum* mostraron inhibición del crecimiento de *Candida albicans*. Estos resultados son consistentes con un estudio previo que reportó el efecto fungistático y fungicida de *Lactobacillus* spp. contra diferentes especies de *Candida* spp., incluida *C. albicans* (Parolin et al., 2015). *L. paracasei* y *L. plantarum* pueden producir peróxido

de hidrógeno y lactato, que tienen actividad antimicrobiana. En este estudio, se encontró que el lactato fue el AGCC predominante y *L. paracasei* produjo la mayor cantidad de este metabolito en presencia de fructanos de tipo inulina. Rossoni et al. (2020) demostraron la actividad inhibitoria de los postbióticos de *L. paracasei* contra *C. auris*, mientras que el estudio de Barros et al. (2018) demostraron inhibición en la formación de hifas de *C. albicans*. En otro estudio, Salari & Ghasemi et al. (2020) estudiaron el efecto antifúngico de los probióticos contra *Candida* spp. aislada de pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Reportaron que el efecto inhibitorio se demostró tanto utilizando las células (probióticos) como en los SLC de *L. acidophilus* y *L. plantarum*.

Se ha reportado que cuando los patógenos habitan en el tracto intestinal pueden activar genes que están implicados en la susceptibilidad y resistencia a los fármacos antimicrobianos (Cronin et al., 2009). Healey et al. (2017) utilizaron un modelo intestinal murino para encontrar la relación entre las levaduras intestinales y su resistencia a los antifúngicos. Los autores reportaron que el tracto gastrointestinal es el sitio principal para que *Candida* spp. genere mutaciones y resistencia a los fármacos antifúngicos; en consecuencia, esto puede afectar la efectividad de los tratamientos farmacológicos.

Los prebióticos pueden modular la composición del microbioma intestinal y mejorar la salud de su huésped. Los prebióticos también pueden aportar beneficios a otras áreas distintas al intestino, como en las cavidades oral y vaginal y en la piel (Sanders et al., 2019). Un estudio anterior demostró que las combinaciones simbióticas de fructanos de agave como prebióticos y especies de *Lactobacillus* spp. son capaces de producir sobrenadantes con efecto inhibitorio contra tres bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (García-Gamboa et al., 2018). En este estudio, los postbióticos obtenidos de la metabolización de fructanos tipo inulina mostraron un efecto antimicrobiano y de inhibición de formación de biopelículas contra *Candida albicans*.

La formación de biopelículas forma parte de los factores de virulencia que pueden desarrollar diferentes patógenos intestinales (Aarti et al., 2018). Desde un punto de vista médico, es importante analizar la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas porque, en esta forma, esta levadura puede proliferar en el tracto gastrointestinal del huésped. Las biopelículas de *C.*

albicans son intrínsecamente resistentes a los fármacos antimicóticos, al sistema inmunológico del huésped y a los diferentes entornos dentro del tracto gastrointestinal (Nobile & Johnson, 2015). Por esta razón, el tratamiento contra las infecciones derivadas de estos microorganismos formadores de biopelículas es un desafío importante (Rossoni et al., 2020).

Los resultados del presente estudio demostraron que los postbióticos producidos por *L. paracasei* y *L. plantarum* inhiben la formación de biopelículas de *Candida albicans*. Esto es similar con otros estudios donde varias especies de *Lactobacillus* spp. inhiben la formación de biopelículas de *Candida* spp. (Aarti et al., 2018; Bulgasem et al., 2016; Ribeiro et al., 2020). Esta capacidad de *Lactobacillus* spp. podría deberse a la producción de moléculas con propiedades biosurfactantes que afectan la adhesión de *C. albicans* (Ceresa et al., 2015). Otros estudios han reportado que el efecto antimicrobiano de los probióticos es debido a la presencia de AGCC (Higashi et al., 2020).

Un estudio reportó que los AGCC secretados de microorganismos probióticos, incluidos el acetato, el propionato y el butirato, están relacionados con el crecimiento de *C. albicans* en el tracto gastrointestinal. Encontraron una disminución de las concentraciones de los AGCC en el microbioma de ratones que fueron tratados con antibióticos y presentaron alta abundancia de *C. albicans*. En otro grupo de ratones, encontraron que la alta presencia de bacterias productoras de AGCC en ratones no tratados con antibióticos inhibieron *in vitro* el crecimiento, el tubo germinativo, las hifas y el desarrollo de biopelículas de *C. albicans* (Guinan et al., 2019). Otro estudio que evaluó las interacciones entre patógenos intestinales reportó que, *Clostridium difficile* y *C. albicans*, son patógenos oportunistas que pueden colonizar la microbiota intestinal en la disbiosis. Se encontró que en presencia de *C. albicans*, *Clostridium difficile* podía crecer en el tracto gastrointestinal y poseen diversas interacciones interespecies que les permiten habitar en este nicho (van Leeuwen et al., 2016). Por lo tanto, es posible plantearse la hipótesis que los postbióticos evaluados en este estudio pueden impactar indirectamente sobre el crecimiento de otros patógenos intestinales como las bacterias.

La resistencia a fármacos de cepas patógenas ha provocado un creciente interés en la búsqueda de nuevas alternativas a los tratamientos antimicrobianos. Sin embargo, pocos estudios se han centrado en la búsqueda de alternativas naturales contra patógenos de tipo eucariota como las levaduras, ya que la mayoría se ha centrado en patógenos procariotas. El presente estudio

demuestra que las dos combinaciones simbióticas de fructanos de tipo inulina combinados con *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum* mostraron actividad inhibitoria sobre el crecimiento e inhibición de formación de biopelículas contra *C. albicans*. Por tanto, *L. paracasei* y *L. plantarum* cultivados en presencia de fructanos tipo inulina constituyen una nueva formulación simbiótica con efecto antiCandida para producir nutracéuticos como posible alternativa a los fármacos antifúngicos o compuestos antimicrobianos. Este enfoque es valioso considerando que los patógenos de tipo levadura pueden habitar el microbioma intestinal y contribuir a un estado infeccioso o de disbiosis.

Hay alrededor de 200 especies en el género *Candida* de las cuales 20 especies están relacionadas con candidiasis en humanos; por lo tanto, *Candida* spp. juega un papel importante en la salud pública (Pal, 2020). *Candida albicans* es la principal especie relacionada con las infecciones, es un patógeno oportunista que puede adaptarse y habitar en el cuerpo humano (Debta et al., 2020). Las propiedades benéficas de los probióticos se evalúan debido a su efecto de inhibición contra patógenos humanos como *C. albicans*.

Los probióticos a menudo se administran como microorganismos vivos debido a sus efectos benéficos, y los postbióticos incluyen cualquier sustancia o producto liberado o producido a través de la actividad metabólica de los probióticos que pueden ejercer múltiples efectos benéficos sobre la salud del huésped (Żółkiewicz et al., 2020). La actividad antimicrobiana es una característica clave de los probióticos (García-Gamboa et al., 2020), y la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas. En este trabajo, se demostró el efecto de inhibición contra *C. albicans* de los postbióticos producidos por *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Pediococcus acidilactici* en combinación con fructanos de tipo inulina.

Los SLC obtenidos de la combinación simbiótica de *L. rhamnosus* con fructanos tipo inulina mostraron inhibición del crecimiento e inhibición de formación de biopelícula contra *Candida albicans*. Del mismo modo, Dausset et al. (2020) demostraron que los SLC de *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lcr35 inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, reduciendo así la viabilidad en 3 log₁₀ (UFC/mL). Esto sugiere que la presencia de metabolitos producidos por este probiótico ejerce un efecto antimicrobiano. Parte de esta inhibición se debe a la producción de metabolitos secundarios, como el peróxido de hidrógeno o el ácido láctico, que tienen la

capacidad de causar lisis en células fúngicas. Sin embargo, otros mecanismos pueden estar involucrados en este efecto antimicrobiano. *L. rhamnosus* GG puede producir exopolisacáridos o quitinasa, estas moléculas pueden interferir con la formación de hifas de *Candida* spp. (Allonsius et al., 2017; Allonsius et al., 2019).

Se ha reportado la actividad antimicrobiana de *P. acidilactici* contra patógenos bacterianos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (García-Gamboa et al., 2018). Sin embargo, existe poca información sobre el efecto antifúngico de *Pediococcus acidilactici* y sobre los mecanismos involucrados. El efecto antiCandida de los SLC de *P. acidilactici* aquí demostrado es similar al mostrado por Crowley et al. (2013), estos autores demostraron que los SLC de *P. acidilactici* HW01 disminuyeron el crecimiento e inhibieron la formación de biopelículas de *C. albicans*. Los resultados en este estudio son similares a otros estudios que reportaron el efecto antimicrobiano de diferentes cepas que pertenecen al género *Lactobacillus* spp., estas cepas son capaces de secretar metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, metabolitos de grasas y bacteriocinas. Asimismo, se ha reportado que el efecto antimicrobiano de *Pediococcus* spp. contra patógenos puede deberse a la secreción de compuestos similares a las proteínas (Muhialdín et al., 2011).

Las bacterias ácido lácticas pueden producir bacteriocinas capaces de modular el crecimiento de patógenos. En este estudio, el ácido láctico y el ácido acético fueron los metabolitos producidos en mayor cantidad por *L. rhamnosus* y *P. acidilactici*. Estos ácidos orgánicos pueden inhibir indirectamente el crecimiento de patógenos al disminuir el pH del medio (Le Barz et al., 2015). Además, *L. rhamnosus* produjo una mayor concentración de ácido acético en presencia de inulina como fuente de carbono en comparación con la dextrosa. Se ha reportado que las bacterias productoras de ácido acético en el entorno intestinal pueden mejorar la salud del colon (Hu et al., 2020). Por lo tanto, es posible plantearse la hipótesis de que probióticos *L. rhamnosus* y *P. acidilactici* pueden modular la salud intestinal en presencia de prebióticos como la inulina.

La disminución del efecto antimicrobiano de los sobrenadantes neutralizados de *L. rhamnosus* y *P. acidilactici* en este estudio puede deberse a la presencia de compuestos diferentes a las bacteriocinas (Kim & Kang, 2019). Sólo la muestra SLC-50%-N-I-*P.acidilactici* mantuvo el efecto antimicrobiano después de ser neutralizado, incluso el efecto antimicrobiano fue

significativamente más alto que los sobrenadantes sin neutralizar. Lo anterior puede sugerir que la metabolización de los fructanos de tipo inulina pueden estimular a *P. acidilactici* para que secrete una mayor cantidad de compuestos de tipo bacteriocina. Esto es consistente con un estudio que muestra que la combinación de prebióticos con bacterias probióticas mejora la secreción de bacteriocinas (Pranckutė et al., 2016).

Este estudio mostró que las combinaciones simbióticas de *Lactiseibacillus rhamnosus* y *Pediococcus acidilactici* con fructanos de tipo inulina mostraron inhibición de crecimiento e inhibición de formación de biopelículas contra *Candida albicans*. Estas formulaciones simbióticas podrían ser una alternativa prometedora al uso de fármacos antimicóticos. Sin embargo, se necesitan realizar estudios *in vivo* para confirmar los hallazgos encontrados en este estudio.

11. Conclusiones

El estudio de la microbiota intestinal cultivable mostró diferencias entre los microorganismos fúngicos identificados en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad. El grupo con obesidad mostró los conteos más altos de UFC, mientras que el grupo normopeso mostró los conteos bajos. Ascomycota y Basidiomycota fueron los dos filos encontrados en la microbiota intestinal cultivable, y Ascomycota fue el que mostró mayor abundancia. *Candida* spp. fue el género que mayor número de especies, *Candida albicans* fue la levadura con mayor presencia en el grupo de obesidad. *Candida albicans*, *C. kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa* fueron las levaduras que mostraron correlación positiva con la obesidad, el aumento de peso y la masa grasa. Estas levaduras también mostraron correlación negativa con el HDL y la masa magra, parámetros relacionados con la pérdida de peso. Por otro lado, *Kazachstania exigua* y *Candida orthopsilosis* se encontraron sólo en normopeso. Por lo tanto, es posible plantearse que la composición de la microbiota cultivable puede estar influenciada la composición corporal y el estado metabólico.

En el estudio del microbioma y micobioma intestinal, las bacterias mostraron mayor diversidad que los microorganismos fúngicos en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad. El análisis Beta mostró que las bacterias presentaron clusters diferenciados en los tres grupos, mostrando diferencia significativa. Sin embargo, en el micobioma intestinal no se mostró este efecto. Los índices Firmicutes/Bacteroidetes y *Bacteroides/Prevotella* mostraron correlación positiva con el IMC, estos índices son parámetros encontrados en la obesidad. Los grupos con sobrepeso y obesidad que presentaron mayor abundancia de *Akkermansia muciniphila* mostraron un perfil saludable de lípidos y glucosa, en comparación con los participantes con sobrepeso y obesidad que presentaron baja abundancia de *A. muciniphila*. *Eggerthella* spp., *Allisonella* spp., *Subdoligranulum* spp., *Dielma* spp., *Clostridium* spp. y *Romboutsia* spp. fueron los géneros bacterianos diferenciales en los grupos con sobrepeso y obesidad, estos géneros mostraron relación positiva con las variables antropométricas, bioquímicas y dietéticas relacionadas con el aumento de peso. *Faecalibacterium* spp., *Histophilus* spp., *Rikenella* spp., *Odoribacter* spp. y *Marvinbryantia* spp. fueron los géneros diferenciales en el grupo normopeso y mostraron relación positiva con las variables antropométricas, bioquímicas y dietéticas relacionadas con buena salud y peso ideal.

Ascomycota y Basidiomycota fueron los filos más abundantes en el micobioma intestinal en los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad. Ascomycota, *Nakaseomyces* spp. y *Saccharomyces*

spp. presentaron mayor abundancia en el microbioma intestinal en los tres grupos. *Nakaseomyces* spp., *Kazachstania* spp., *Kluyveromyces* spp. y *Hanseniaspora* spp., mostraron mayor abundancia en el grupo normopeso y mostraron relación negativa con el IMC. Mientras que *Saccharomyces* spp., *Debaryomyces* spp. y *Pichia* spp., mostraron mayor abundancia en los grupos con sobrepeso y obesidad y presentaron relación positiva con el IMC. *Candida* spp. presentó mayor abundancia en sujetos con sobrepeso, mostró correlación positiva con el consumo de hidratos de carbono simples. *Malassezia* spp. y *Aspergillus* spp. fueron los géneros fúngicos diferenciales en el grupo con obesidad y mostraron relación con las variables antropométricas, bioquímicas y dietéticas relacionadas con la ganancia de peso. La presencia de *Kazachstania* spp. en el grupo normopeso, de *Candida parapsilosis* en los grupos normopeso y sobrepeso, y de *Pichia* en el grupo con obesidad, fue consistente con el estudio de la microbiota cultivable. Por lo tanto, es posible concluir que, para el estudio de algunas especies fúngicas de la microbiota, como *Kazachstania*, *Candida parapsilosis* y *Pichia*, pueden ser estudiadas utilizando técnicas de cultivo y técnicas genómicas.

En el presente trabajo se demostró que las cuatro combinaciones simbióticas que contenían fructanos de tipo inulina en combinación con *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* y *Pediococcus acidilactici* mostraron inhibición de crecimiento e inhibición de formación de biopelículas contra *Candida albicans*. Por lo tanto, estos probióticos y prebióticos podrían ser utilizados como nuevas formulaciones simbióticas capaces de modular el microbioma intestinal, principalmente modular el crecimiento de levaduras patógenas causantes de disbiosis.

De acuerdo con el análisis del microbioma, *Candida albicans* mostró alta presencia los grupos con sobrepeso y obesidad, por lo tanto, es posible plantearse que en estos grupos exista un estado de disbiosis. En consecuencia, se sugieren futuros estudios *in vivo* que evalúen la aplicación de estas formulaciones en personas con sobrepeso y obesidad.

12. Perspectivas

Este estudio representa el primer análisis de la microbiota intestinal en mexicanos relacionado con el sobrepeso y la obesidad. Sin embargo, hacen falta futuros estudios que aborden las interacciones entre los microorganismos de la microbiota y microbiota intestinal y su papel en la salud y en la obesidad. Para ello es posible utilizar modelos *ex vivo*, como un simulador de tracto digestivo, que permite tener una mayor comprensión entre las interacciones microbianas y tener resultados más precisos que permitan y puedan ofrecer tratamientos preventivos y terapéuticos en la disbiosis intestinal y en la obesidad.

Por otra parte, hacen falta estudios que involucren el análisis de las rutas metabólicas que genomas de hongos y levaduras y compararlos con genomas bacterianos para comprender de manera más específica las vías metabólicas entre estas comunidades de microorganismos y su relación con la obesidad.

Se sugiere que en futuros estudios se involucre un estudio metabolómico del microbioma intestinal y analizar como los metabolitos generados por el microbioma y el micobioma tienen relación con la homeostasis humana y con el desarrollo y progresión de la obesidad. Lo anterior puede funcionar como una herramienta que complemente el diagnóstico y al tratamiento de anomalías en el microbioma intestinal en la obesidad.

Los resultados de esta investigación, debido a lo novedoso, y por qué no se encontraron reportes en población mexicana, abre múltiples perspectivas y futuros estudios en el área de investigación en el micobioma intestinal.

El efecto antiCandida demostrado por las combinaciones simbióticas puede ser utilizado para producir nutracéuticos como posible alternativa a los fármacos antifúngicos o compuestos antimicrobianos. Este enfoque es valioso considerando que los patógenos de tipo levadura pueden habitar el microbioma intestinal y contribuir a un estado infeccioso o de disbiosis. Sin embargo, se necesitan realizar estudios *in vivo* para confirmar los hallazgos encontrados en este estudio.

13. Referencias

- Aarti, C., Khusro, A., Varghese, R., Arasu, M. V., Agastian, P., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., & Choi, K. C. (2018). *In vitro* investigation on probiotic, anti-Candida, and antibiofilm properties of *Lactobacillus pentosus* strain LAP1. *Archives of Oral Biology*, 89, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.02.014>
- Al-Assal, K., Martinez, A. C., Torrinhas, R. S., Cardinelli, C., & Waitzberg, D. (2018). Gut microbiota and obesity. *Clinical Nutrition Experimental*, 20, 60–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.03.001>
- Allonsius, Camille N, van den Broek, M. F. L., De Boeck, I., Kiekens, S., Oerlemans, E. F. M., Kiekens, F., Foubert, K., Vandenheuvel, D., Cos, P., Delputte, P., & Lebeer, S. (2017). Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1753–1763. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12799>
- Allonsius, Camille Nina, Vandenheuvel, D., Oerlemans, E. F. M., Petrova, M. I., Donders, G. G. G., Cos, P., Delputte, P., & Lebeer, S. (2019). Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39625-0>
- Amplicon, P. C. R., Clean-Up, P. C. R., & Index, P. C. R. (2013). 16s metagenomic sequencing library preparation. *Illumina. Com.*
- Anandakumar, A., Pellino, G., Tekkis, P., & Kontovounisios, C. (2019). Fungal microbiome in colorectal cancer: a systematic review. *Updates in Surgery*, 71(4), 625-630. <https://doi.org/10.1007/s13304-019-00683-8>
- Aro, A., Jauhiainen, M., Partanen, R., Salminen, I., & Mutanen, M. (1997). Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein (a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(5), 1419–1426. <https://doi.org/10.1093/ajcn/65.5.1419>
- Arrizon, J. Hernandez-moedano, A. toksoy O. and G.-A. M. (2014). *In Vitro* Prebiotic Activity of Fructans With Different Fructosyl Linkage for Symbiotics Elaboration. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9(3), 69–76.

- Bardagjy, A. S., & Steinberg, F. M. (2019). Relationship Between HDL Functional Characteristics and Cardiovascular Health and Potential Impact of Dietary Patterns: A Narrative Review. *Nutrients*, *11*(6), 1231. <https://doi.org/10.3390/nu11061231>
- Bendová, B., Piálek, J., Ďureje, L., Schmiedová, L., Čížková, D., Martin, J.-F., & Kreisinger, J. (2020). How being synanthropic affects the gut bacteriome and mycobiome: comparison of two mouse species with contrasting ecologies. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01859-8>
- Blaak, E. E., Canfora, E. E., Theis, S., Frost, G., Groen, A. K., Mithieux, G., Nauta, A., Scott, K., Stahl, B., & van Harsselaar, J. (2020). Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Beneficial Microbes*, *11*(5), 411–455. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>
- Blaut, M., & Clavel, T. (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 751S-755S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.751S>
- Borges, F. M., de Paula, T. O., Sarmiento, M. R. A., de Oliveira, M. G., Pereira, M. L. M., Toledo, I. V., Nascimento, T. C., Ferreira-Machado, A. B., Silva, V. L., & Diniz, C. G. (2018). Fungal Diversity of Human Gut Microbiota Among Eutrophic, Overweight, and Obese Individuals Based on Aerobic Culture-Dependent Approach. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1438-8>
- Borgo, F., Verduci, E., Riva, A., Lassandro, C., Riva, E., Morace, G., & Borghi, E. (2017). Relative Abundance in Bacterial and Fungal Gut Microbes in Obese Children: A Case Control Study. *Childhood Obesity*, *13*(1), 78–84. <https://doi.org/10.1089/chi.2015.0194>
- Bourrie, B. C. T., Cotter, P. D., & Willing, B. P. (2018). Traditional kefir reduces weight gain and improves plasma and liver lipid profiles more successfully than a commercial equivalent in a mouse model of obesity. *Journal of Functional Foods*, *46*, 29–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.039>
- Bulgasem, B. Y., Lani, M. N., Hassan, Z., Wan Yusoff, W. M., & Fnaish, S. G. (2016). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Natural Honey against Pathogenic *Candida* Species. *Mycobiology*, *44*(4), 302–309.

<https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.302>

- Bushman, F. D., Lewis, J. D., & Wu, G. D. (2013). Diet, gut enterotypes and health: is there a link? *The Importance of Immunonutrition*, 77, 65–73. <https://doi.org/10.1159/000351385>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campbell, N. A. (1978). The influence function as an aid in outlier detection in discriminant analysis. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 27(3), 251–258. <https://doi.org/10.2307/2347160>
- Cani, P. D. (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716–1725. <https://doi.org/10.1530/endoabs.63.S5.1>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K., & Gordon, J. I. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26(1), 26191. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26191>
- Castell, G. S., Serra-Majem, L., & Ribas-Barba, L. (2015). What and how much do we eat? 24-hour dietary recall method. *Nutricion Hospitalaria*, 31(3), 46–48.
- Cataldi, V., Di Campli, E., Fazii, P., Traini, T., Cellini, L., & Di Giulio, M. (2016). *Candida* species isolated from different body sites and their antifungal susceptibility pattern: Cross-analysis of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Medical Mycology*, 55(6), 624–634. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw126>
- Ceresa, C., Tessarolo, F., Caola, I., Nollo, G., Cavallo, M., Rinaldi, M., & Fracchia, L. (2015). Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1116–1125. <https://doi.org/10.1111/jam.12760>

- Chen, Y., Chen, Z., Guo, R., Chen, N., Lu, H., Huang, S., Wang, J., & Li, L. (2011). Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *70*(4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.005>
- Ciardo, E., Lucke, K., Imhof, A., Bloemberg, V., & Böttger, C. (2010). Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: A 5-year study. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(8), 2809–2813. <https://doi.org/10.1128/JCM.00289-10>
- Coker, O. O. (2021). Non-bacteria microbiome (Virus, fungi, and archaea) in gastrointestinal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1111/jgh.15738>
- Coker, O. O., Nakatsu, G., Dai, R. Z., Wu, W. K. K., Wong, S. H., Ng, S. C., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2019). Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. *Gut*, *68*(4), 654–662. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317178>
- Cox, L. M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V., Leung, J. M., Cho, I., Kim, S. G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárate Rodríguez, J. G., Rogers, A. B., Robine, N., Loke, P., & Blaser, M. J. (2014). Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell*, *158*(4), 705–721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052>
- Cronin, S. J. F., Nehme, N. T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, J. A., Schramek, D., Leibbrandt, A., de Matos Simoes, R., Gruber, S., & Puc, U. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science*, *325*(5938), 340–343. <https://doi.org/10.1126/science.1173164>
- Crovesy, L., Masterson, D., & Rosado, E. L. (2020). Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *European Journal of Clinical Nutrition*, *74*(9), 1251–1262. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6>
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, *33*(2), 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>

- Cui, L., Morris, A., & Ghedin, E. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome Medicine*, 5(7), 63. <https://doi.org/10.1186/gm467>
- Czerucka, D., Piche, T., & P. Rampal. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
- Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Kayser, B. D., Levenez, F., Chilloux, J., & Hoyles, L. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), 426–436. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308778>
- Dausset, C., Bornes, S., Miquel, S., Kondjoyan, N., Angenieux, M., Nakusi, L., Veisseire, P., Alaterre, E., Bermúdez-Humarán, L. G., & Langella, P. (2020). Identification of sulfur components enhancing the anti-Candida effect of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12.
- De Barros, P. P., Scorzoni, L., de Camargo Ribeiro, F., de Oliveira Fugisaki, L. R., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., Jorge, A. O. C., Junqueira, J. C., & Rossoni, R. D. (2018). *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microbial Pathogenesis*, 117, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.019>
- Debta, P., Swain, S. K., Sahu, M. C., Debta, F. M., & Mohanty, J. N. (2020). A Review on Oral *Candida* as Commensal and Opportunistic Pathogen. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(4), 8381.
- Deligios, M., Fraumene, C., Abbondio, M., Mannazzu, I., Tanca, A., Addis, M. F., & Uzzau, S. (2015). Draft genome sequence of *Rhodotorula mucilaginosa*, an emergent opportunistic pathogen. *Genome Announc.*, 3(2), e00201-15.

<https://doi.org/10.1128/genomeA.00201-15>

Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, *362*(9390), 1142–1151.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14472-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14472-8)

Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., Falony, G., Raes, J., Maiter, D., & Delzenne, N. M. (2019). Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*, *25*(7), 1096–1103. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0495-2>

Dong-Hyeon, K., Hyunsook, K., Dana, J., Il-Byeong, K., Jung-Whan, C., Hong-Seok, K., Song, K.-Y., & Seo, K.-H. (2017). Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *44*, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.014>

Drell, T., Lillsaar, T., Tummeleht, L., Simm, J., Aaspõllu, A., Väin, E., Saarma, I., Salumets, A., Donders, G. G. G., & Metsis, M. (2013). Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PloS One*, *8*(1), e54379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054379>

Dufossé, L., Fouillaud, M., & Caro, Y. (2021). Fungi and Fungal Metabolites for the Improvement of Human and Animal Nutrition and Health. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 4, p. 274). <https://doi.org/10.3390/jof7040274>

Dupuy, A. K., David, M. S., Li, L., Heider, T. N., Peterson, J. D., Montano, E. A., Dongari-Bagtzoglou, A., Diaz, P. I., & Strausbaugh, L. D. (2014). Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One*, *9*(3), e90899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090899>

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., & Delzenne, N. M. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(22), 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>

- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(1), 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Femia, A. Pietro, Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K. J., Paglierani, M., & Caderni, G. (2002). Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, *23*(11), 1953–1960. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1953>
- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., & Kong, H. H. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, *498*(7454), 367–370. <https://doi.org/10.1038/nature12171>
- Fraberger, V., Call, L.-M., Domig, K. J., & D’Amico, S. (2018). Applicability of Yeast Fermentation to Reduce Fructans and Other FODMAPs. *Nutrients*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/nu10091247>
- Freedman, D. S., Thornton, J. C., Pi-Sunyer, F. X., Heymsfield, S. B., Wang, J., Pierson Jr, R. N., Blanck, H. M., & Gallagher, D. (2012). The Body Adiposity Index (Hip Circumference ÷ Height^{1.5}) Is Not a More Accurate Measure of Adiposity Than Is BMI, Waist Circumference, or Hip Circumference. *Obesity*, *20*(12), 2438–2444. <https://doi.org/10.1038/oby.2012.81>
- García-Gamboa, R., Gradilla-Hernández, M., Ortiz-Basurto, R., García-Reyes, R., & González-Avila, M. (2019). Assessment of intermediate and long chains agave fructan fermentation on the growth of intestinal bacteria cultured in a gastrointestinal tract simulator. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *19*. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio842>
- García-Gamboa, R., Gradilla-Hernández, M. S., Ortiz-Basurto, R. I., García-Reyes, R. A., & González-Avila, M. (2020). Assessment of intermediate and long chains agave fructan fermentation on the growth of intestinal bacteria cultured in a gastrointestinal tract simulator. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *19*(2), 827–838. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio842>

- García-Gamboa, R., Kirchmayr, M. R., Gradilla-Hernández, M. S., Pérez-Brocal, V., Moya, A., & González-Avila, M. (2021). The intestinal mycobiota and its relationship with overweight, obesity and nutritional aspects. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. <https://doi.org/10.1111/jhn.12864>
- García Gamboa, R., Ortiz Basurto, R. I., Calderón Santoyo, M., Bravo Madrigal, J., Ruiz Álvarez, B. E., & González Avila, M. (2018). *In vitro* evaluation of prebiotic activity, pathogen inhibition and enzymatic metabolism of intestinal bacteria in the presence of fructans extracted from agave: A comparison based on polymerization degree. *LWT - Food Science and Technology*, 92(February), 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.051>
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000713. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- Ghazalpour, A., Cespedes, I., Bennett, B. J., & Allayee, H. (2016). Expanding role of gut microbiota in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 27(2), 141. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000278>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L., & Cuenca-Estrella, M. (2005). Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 312–316. <https://doi.org/10.1093/jac/dki020>
- Gouba, N, & Drancourt, M. (2015). Digestive tract mycobiota: A source of infection. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 45(1), 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.01.007>
- Gouba, Nina, Hien, Y. E., Guissou, M. L., Fonkou, M. D. M., Traoré, Y., & Tarnagda, Z. (2019). Digestive tract mycobiota and microbiota and the effects on the immune system. *Human*

Microbiome Journal, 12, 100056. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2019.100056>

Gouba, Nina, Raoult, D., & Drancourt, M. (2013). Plant and fungal diversity in gut microbiota as revealed by molecular and culture investigations. *PloS One*, 8(3), e59474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059474>

Guinan, J., Wang, S., Hazbun, T. R., Yadav, H., & Thangamani, S. (2019). Antibiotic-induced decreases in the levels of microbial-derived short-chain fatty acids correlate with increased gastrointestinal colonization of *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45467-7>

Guo, R., Chen, Z., Chen, N., & Chen, Y. (2010). Quantitative Real-Time PCR Analysis of Intestinal Regular Fungal Species in Fecal Samples From Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Laboratory Medicine*, 41(10), 591–596. <https://doi.org/10.1309/LMMC0WVZXD13PUJG>

Hallen-Adams, H. E., Kachman, S. D., Kim, J., Legge, R. M., & Martínez, I. (2015). Fungi inhabiting the healthy human gastrointestinal tract: a diverse and dynamic community. *Fungal Ecology*, 15, 9–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.01.006>

Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352–358. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1247140>

Hamad, I., Ranque, S., Azhar, I., Yasir, M., Jiman-Fatani, A., Tissot-Dupont, H., Raoult, D., & Bittar, F. (2017). Culturomics and Amplicon-based Metagenomic Approaches for the Study of Fungal Population in Human Gut Microbiota. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17132-4>

Hamad, I., Raoult, D., & Bittar, F. (2016). Repertory of eukaryotes (eukaryome) in the human gastrointestinal tract: Taxonomy and detection methods. *Parasite Immunology*, 38(1), 12–36. <https://doi.org/10.1111/pim.12284>

Hamad, I., Sokhna, C., Raoult, D., & F. Bittar. (2012). Molecular Detection of Eukaryotes in a Single Human Stool Sample from Senegal. *PLOS ONE*, 7(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040888>

Hamad, Ibrahim, Ranque, S., Azhar, E. I., Yasir, M., Jiman-Fatani, A. A., Tissot-Dupont, H.,

- Raoult, D., & Bittar, F. (2017). Culturomics and amplicon-based metagenomic approaches for the study of fungal population in human gut microbiota. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17132-4>
- Healey, K. R., Nagasaki, Y., Zimmerman, M., Kordalewska, M., Park, S., Zhao, Y., & Perlin, D. S. (2017). The gastrointestinal tract is a major source of echinocandin drug resistance in a murine model of *Candida glabrata* colonization and systemic dissemination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12), e01412-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01412-17>
- Heisel, T., Podgorski, H., Staley, C. M., Knights, D., Sadowsky, M. J., & Gale, C. A. (2015). Complementary Amplicon-Based Genomic Approaches for the Study of Fungal Communities in Humans. *PLOS ONE*, 10(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116705>
- Hiel, S., Gianfrancesco, M. A., Rodriguez, J., Portheault, D., Leyrolle, Q., Bindels, L. B., da Silveira Cauduro, C. G., Mulders, M. D. G. H., Zamariola, G., & Azzi, A.-S. (2020). Link between gut microbiota and health outcomes in inulin-treated obese patients: Lessons from the Food4Gut multicenter randomized placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition*, 39(12), 3618–3628. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.04.005>
- Higashi, B., Mariano, T. B., de Abreu Filho, B. A., Gonçalves, R. A. C., & de Oliveira, A. J. B. (2020). Effects of fructans and probiotics on the inhibition of *Klebsiella oxytoca* and the production of short-chain fatty acids assessed by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 248, 116832. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116832>
- Hof, H. (2019). *Rhodotorula* spp. in the gut—foe or friend? *GMS Infectious Diseases*, 7. <https://doi.org/10.3205/id000042>
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., & Bushman, F. D. (2013). Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents. *PLOS ONE*, 8(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019>
- Hu, P., Zhao, F., Wang, J., & Zhu, W. (2020). Early-life lactoferrin intervention modulates the colonic microbiota, colonic microbial metabolites and intestinal function in suckling

- piglets. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*, 6185–6197. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10675-z>
- Huazano-García, A., Shin, H., & López, M. (2017). Modulation of gut microbiota of overweight mice by agavins and their association with body weight loss. *Nutrients*, *9*(9), 821. <https://doi.org/10.3390/nu9090821>
- Huberty, C. J., & Olejnik, S. (2006). *Applied MANOVA and discriminant analysis* (Vol. 498). John Wiley & Sons.
- Huđek, A., Škara, L., Smolkovič, B., Kazazić, S., Ravlić, S., Nanić, L., Osvatić, M. M., Jelčić, J., Rubelj, I., & Bačun-Družina, V. (2018). Higher prevalence of FTO gene risk genotypes AA rs9939609, CC rs1421085, and GG rs17817449 and saliva containing *Staphylococcus aureus* in obese women in Croatia. *Nutrition Research*, *50*, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.12.005>
- Huffnagle, G. B., & Noverr, M. C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends in Microbiology*, *21*(7), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.04.002>
- Iichmann, H., Olier, M., Lencina, C., Ellero-Simatos, S., Riba, A., Guillou, H., Guzylack-Piriou, L., Theodorou, V., & Menard, S. (2018). Su1987 - Early Life Stress Induces type 2 Diabetes-Like Symptoms at Adulthood in Mice Associated with Defect of Intestinal I17 and I22 Secretion. *Gastroenterology*, *154*(6, Supplement 1), S-656-S-657. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(18\)32333-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-5085(18)32333-3)
- Iliev, I. D., Funari, V. A., Taylor, K. D., Nguyen, Q., Reyes, C. N., Strom, S. P., Brown, J., Becker, C. A., Fleshner, P. R., Dubinsky, M., Rotter, J. I., Wang, H. L., McGovern, D. P. B., Brown, G. D., & Underhill, D. M. (2012). Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1221789>
- Ishii, M., Matsumoto, Y., Nakamura, I., & Sekimizu, K. (2017). Silkworm fungal infection model for identification of virulence genes in pathogenic fungus and screening of novel antifungal drugs. *Drug Discoveries & Therapeutics*, *11*(1), 1–5. <https://doi.org/10.5582/ddt.2016.01080>

- Jinatham, V., Kullawong, N., Kespechara, K., Gentekaki, E., & Popluechai, S. (2018). Comparison of gut microbiota between lean and obese adult Thai individuals. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(3), 277–287. <https://doi.org/10.4014/mbi.1711.11003>
- Kaur, N., Chen, C.-C., Luther, J., & Kao, J. Y. (2011). Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 2(4), 211–216. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.17863>
- Każmierczak-Siedlecka, K., Dvořák, A., Folwarski, M., Daca, A., Przewłócka, K., & Makarewicz, W. (2020). Fungal gut microbiota dysbiosis and its role in colorectal, oral, and pancreatic carcinogenesis. *Cancers*, 12(5), 1326. <https://doi.org/10.3390/cancers12051326>
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Khatib, R., Riederer, K. M., Ramanathan, J., & Baran Jr, J. (2001). Faecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients. *Mycoses*, 44(5), 151–156. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00639.x>
- Kim, H., & Kang, S.-S. (2019). Antifungal activities against *Candida albicans*, of cell-free supernatants obtained from probiotic *Pediococcus acidilactici* HW01. *Archives of Oral Biology*, 99, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.006>
- Kim, M.-H., Yun, K. E., Kim, J., Park, E., Chang, Y., Ryu, S., Kim, H.-L., & Kim, H.-N. (2020). Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76474-8>
- Kim, S., Goel, R., Kumar, A., Qi, Y., Lobaton, G., Hosaka, K., Mohammed, M., Handberg, E., Richards, E., Pepine, C., & Raizada, M. (2018). Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. *Clinical Science*, 132(6), 701–718. <https://doi.org/10.1042/CS20180087>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and

- next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., & Tkach, S. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiology*, *17*(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1>
- Kolouchová, I., Schreiberová, O., Sigler, K., Masák, J., & Řezanka, T. (2015). Biotransformation of volatile fatty acids by oleaginous and non-oleaginous yeast species. *FEMS Yeast Research*, *15*(7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov076>
- Kühbacher, T., Ott, S. J., Helwig, U., Mimura, T., Rizzello, F., Kleessen, B., Gionchetti, P., Blaut, M., Campieri, M., Fölsch, U. R., Kamm, M. A., & Schreiber, S. (2006). Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut*, *55*(6), 833 LP – 841. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2005.078303>
- Le Barz, M., Anhê, F. F., Varin, T. V., Desjardins, Y., Levy, E., Roy, D., Urdaci, M. C., & Marette, A. (2015). Probiotics as complementary treatment for metabolic disorders. *Diabetes & Metabolism Journal*, *39*(4), 291–303. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.4.291>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, *500*, 541. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12506>
- Leary, M. P., Roy, S. J., Lim, J., Park, W., Ferrari, R., Eaves, J., Machin, D. R., & Tanaka, H. (2018). Nonfat milk attenuates acute hyperglycemia in individuals with android obesity: A randomized control trial. *Food Science & Nutrition*, *6*(8), 2104–2112. <https://doi.org/10.1002/fsn3.767>
- Lemoine, S., Kemgang, A., Belkacem, K. Ben, Straube, M., Jegou, S., Corpechot, C., Network, S.-A. I. B. D., Chazouillères, O., Housset, C., & Sokol, H. (2020). Fungi participate in the dysbiosis of gut microbiota in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut*, *69*(1), 92–

102. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317791>

- Li, J., Chen, D., Yu, B., He, J., Zheng, P., Mao, X., Yu, J., Luo, J., Tian, G., Huang, Z., & Luo, Y. (2018). Fungi in Gastrointestinal Tracts of Human and Mice: from Community to Functions. *Microbial Ecology*, *75*(4), 821–829. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1105-9>
- Li, L., Redding, S., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2007). *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*, *86*(3), 204–215. <https://doi.org/10.1177/154405910708600304>
- Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., & Li, J. (2014). Dysbiosis of Gut Fungal Microbiota is Associated With Mucosal Inflammation in Crohn's Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *48*(6), 513–523. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000035>
- Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., Powell, C., Vedantam, S., Buchkovich, M. L., Yang, J., Croteau-Chonka, D. C., Esko, T., Fall, T., Ferreira, T., Gustafsson, S., Kutalik, Z., Luan, J., Mägi, R., Randall, J. C., Speliotes, E. K. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*, *518*(7538), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature14177>
- Luan, C., Xie, L., Yang, X., Miao, H., Lv, N., Zhang, R., Xiao, X., Hu, Y., Liu, Y., Wu, N., Zhu, Y., & Zhu, B. (2015). Dysbiosis of Fungal Microbiota in the Intestinal Mucosa of Patients with Colorectal Adenomas. *Scientific Reports*, *5*, 7980. <http://dx.doi.org/10.1038/srep07980>
- Ma, J., Prince, A. L., Bader, D., Hu, M., Ganu, R., Baquero, K., Blundell, P., Alan Harris, R., Frias, A. E., Grove, K. L., & Aagaard, K. M. (2014). High-fat maternal diet during pregnancy persistently alters the offspring microbiome in a primate model. *Nature Communications*, *5*(May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4889>
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an *in vitro* colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(4), 956–964. <https://doi.org/10.1128/AEM.06385-11>

- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*, *12*(5), 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, *10*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
- Matey-Hernandez, M. L., Williams, F. M. K., Potter, T., Valdes, A. M., Spector, T. D., & Menni, C. (2018). Genetic and microbiome influence on lipid metabolism and dyslipidemia. *Physiological Genomics*, *50*(2), 117–126. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00053.2017>
- Mims, T. S., Al Abdallah, Q., Stewart, J. D., Watts, S. P., White, C. T., Rousselle, T. V, Gosain, A., Bajwa, A., Han, J. C., & Willis, K. A. (2021). The gut mycobiome of healthy mice is shaped by the environment and correlates with metabolic outcomes in response to diet. *Communications Biology*, *4*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01820-z>
- Moyes, D. L., & Naglik, J. R. (2012). The Mycobiome: Influencing IBD Severity. *Cell Host & Microbe*, *11*(6), 551–552. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.009>
- Muhaladin, B. J., Hassan, Z., & Sadon, S. K. (2011). Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasi* D5 on Selected Foods. *Journal of Food Science*, *76*(7), M493–M499. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x>
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Retuerto, M., Sikaroodi, M., Brown, R. E., Jurevic, R., Salata, R. A., Lederman, M. M., Gillevet, P. M., & Ghannoum, M. A. (2014). Oral mycobiome analysis of HIV-infected patients: identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi. *PLoS Pathogens*, *10*(3), e1003996. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003996>
- Mukherjee, P. K., Sendid, B., Hoarau, G., Colombel, J.-F., Poulain, D., & Ghannoum, M. A. (2015). Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *12*(2), 77–87. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.188>
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., & Gibbs, R. A. (2017). The gut mycobiome of the

- Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Neves, E. B., Ripka, W. L., Ulbricht, L., & Stadnik, A. M. W. (2013). Comparison of the fat percentage obtained by bioimpedance, ultrasound and skinfolds in young adults. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 19(5), 323–327. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922013000500004>
- Ng, T. S., Desa, M. N. M., Sandai, D., Chong, P. P., & Than, L. T. L. (2016). Growth, biofilm formation, antifungal susceptibility and oxidative stress resistance of *Candida glabrata* are affected by different glucose concentrations. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.004>
- Nieminen, M. T., & Salaspuro, M. (2018). Local Acetaldehyde—An Essential Role in Alcohol-Related Upper Gastrointestinal Tract Carcinogenesis. *Cancers*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/cancers10010011>
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Ortega-Santos, C. P., & Whisner, C. M. (2019). The Key to Successful Weight Loss on a High-Fiber Diet May Be in Gut Microbiome *Prevotella* Abundance. *The Journal of Nutrition*, 149(12), 2083–2084. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz248>
- Ott, S. J., Kühbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., Drews, O., Weichert, W., Timmis, K. N., & Schreiber, S. (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(7), 831–841. <https://doi.org/10.1080/00365520801935434>
- Pal, M. (2020). Candidiasis: An important opportunistic mycosis of global public health concern. *Research in Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 2(1), 49–51.
- Parolin, C., Marangoni, A., Laghi, L., Foschi, C., Ñahui Palomino, R. A., Calonghi, N., Cevenini, R., & Vitali, B. (2015). Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-Candida activity. *PloS One*, 10(6), e0131220.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131220>

- Perez Rodrigo, C., Aranceta, J., Salvador, G., & Varela-Moreiras, G. (2015). Food frequency questionnaires. *Nutricion Hospitalaria*, *31 Suppl 3*, 49–56. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup3.8751>
- Potenza, L., Chitasombat, M. N., Klimko, N., Bettelli, F., Dragonetti, G., Del Principe, M. I., Nucci, M., Busca, A., Fracchiolla, N., & Sciumè, M. (2019). *Rhodotorula* infection in haematological patient: Risk factors and outcome. *Mycoses*, *62*(3), 223–229. <https://doi.org/10.1111/myc.12875>
- Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, *111*(3), 387–402. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002560>
- Pranckutė, R., Kaunietis, A., Kuisienė, N., & Čitavičius, D. J. (2016). Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 669–676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.041>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., & Yamada, T. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Raimondi, S., Amaretti, A., Gozzoli, C., Simone, M., Righini, L., Candelieri, F., Brun, P., Ardizzoni, A., Colombari, B., & Paulone, S. (2019). Longitudinal survey of fungi in the human gut: ITS profiling, phenotyping, and colonization. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1575. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01575>
- Relloso, M. S., Nievas, J., Taie, S. F., Farquharson, V., Mujica, M. T., Romano, V., Zarate, M. S., & Smayevsky, J. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS

- para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.004>
- Ribaldone, D. G., Caviglia, G. P., Abdulle, A., Pellicano, R., Ditto, M. C., Morino, M., Fusaro, E., Saracco, G. M., Bugianesi, E., & Astegiano, M. (2019). Adalimumab therapy improves intestinal dysbiosis in Crohn's disease. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), 1646. <https://doi.org/10.3390/jcm8101646>
- Ribeiro, F. C., Rossoni, R. D., de Barros, P. P., Santos, J. D., Fugisaki, L. R. O., Leão, M. P. V, & Junqueira, J. C. (2020). Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 175–185. <https://doi.org/10.1111/jam.14511>
- Rizzetto, L., De Filippo, C., & Cavalieri, D. (2015). Mycobiota: micro-eukaryotes inhabiting our body as commensals or opportunistic pathogens. <http://dx.doi.org/10.4172/2165-8056.1000120>
- Rodríguez, M., Pérez, D., Chaves, J., Esteve, E., Marin-Garcia, P., Xifra, G., Vendrell, J., Jové, M., Pamplona, R., Ricart, W., Portero-Otin, M., Chacón, M., & J. Fernández Real. (2015). Obesity changes the human gut mycobiome. *Scientific Reports*, 5, 14600. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14600>
- Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., & Aadil, R. M. (2020). Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 32, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003>
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grzeškowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Rossoni, R. D., de Barros, P. P., de Alvarenga, J. A., Ribeiro, F. de C., Velloso, M. dos S., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., Jorge, A. O. C., & Junqueira, J. C. (2018). Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*, 34(2), 212–225. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1425402>

- Rossoni, R. D., de Barros, P. P., do Carmo Mendonça, I., Medina, R. P., Silva, D. H. S., Fuchs, B. B., Junqueira, J. C., & Mylonakis, E. (2020). The postbiotic activity of *Lactobacillus paracasei* 28.4 against *Candida auris*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00397>
- Salari, S., & Ghasemi Nejad Almani, P. (2020). Antifungal effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* against different oral *Candida* species isolated from HIV/AIDS patients: an *in vitro* study. *Journal of Oral Microbiology*, *12*(1), 1769386. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1769386>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *16*(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2), 361s-364s. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, *69*(1), 52–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., & Garrett, W. S. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.*, *12*. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-S1-P6>
- Sherry, L., Rajendran, R., Lappin, D. F., Borghi, E., Perdoni, F., Falleni, M., Tosi, D., Smith, K., Williams, C., & Jones, B. (2014). Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-182>
- Sonoyama, K., Miki, A., Sugita, R., Goto, H., Nakata, M., & Yamaguchi, N. (2011). Gut colonization by *Candida albicans* aggravates inflammation in the gut and extra-gut tissues in mice. *Medical Mycology*, *49*(3), 237–247.

<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.511284>

- Spatz, M., & Richard, M. L. (2020). Overview of the potential role of *Malassezia* in gut health and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 201. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00201>
- Steinert, R. E., Rehman, A., Souto Lima, E. J., Agamennone, V., Schuren, F. H. J., Gero, D., Schreiner, P., Vonlanthen, R., Ismaeil, A., & Tzafos, S. (2020). Roux-en-Y gastric bypass surgery changes fungal and bacterial microbiota in morbidly obese patients—A pilot study. *Plos One*, *15*(7), e0236936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236936>
- Stewart, A., Marfell-Jones, M., Olds, T., & Ridder, de H. (2001). International Society for the Advancement of Kinanthropometry. *International Standards for Anthropometric Assessment. Australia. Lower Hutt, New Zealand: International Society for the Advancement of Kinanthropometry.*
- Stojanov, S., Berlec, A., & Štrukelj, B. (2020). The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, *8*(11), 1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>
- Strati, F., Di Paola, M., Stefanini, I., Albanese, D., Rizzetto, L., Lionetti, P., Calabrò, A., Jousson, O., Donati, C., Cavalieri, D., & De Filippo, C. (2016). Age and Gender Affect the Composition of Fungal Population of the Human Gastrointestinal Tract. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01227>
- Sun, S., Sun, L., Wang, K., Qiao, S., Zhao, X., Hu, X., Chen, W., Zhang, S., Li, H., & Dai, H. (2021). The gut commensal fungus, *Candida parapsilosis*, promotes high fat-diet induced obesity in mice. *Communications Biology*, *4*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02753-3>
- Takata, K., Tomita, T., Okuno, T., Kinoshita, M., Koda, T., Honorat, J. A., Takei, M., Hagihara, K., Sugimoto, T., Mochizuki, H., Sakoda, S., & Nakatsuji, Y. (2015). Dietary Yeasts Reduce Inflammation in Central Nerve System via Microflora. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *2*(1), 56–66. <https://doi.org/10.1002/acn3.153>
- Team, R. C. (2013). *R: A language and environment for statistical computing.*

- Tholstrup, T., Marckmann, P., Jespersen, J., & Sandström, B. (1994). Fat high in stearic acid favorably affects blood lipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *59*(2), 371–377. <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.2.371>
- Tilg, H., Zmora, N., Adolph, T. E., & Elinav, E. (2020). The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *20*(1), 40–54. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0198-4>
- Underhill, D. M., & Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*, *14*(6), 405–416. <https://doi.org/10.1038/nri3684>
- Urubschurov, V., Büsing, K., Freyer, G., Herlemann, D. P. R., Souffrant, W.-B., & Zeyner, A. (2017). New insights into the role of the porcine intestinal yeast, *Kazachstania slooffiae*, in intestinal environment of weaned piglets. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw245>
- van Leeuwen, P. T., van der Peet, J. M., Bikker, F. J., Hoogenkamp, M. A., Oliveira Paiva, A. M., Kostidis, S., Mayboroda, O. A., Smits, W. K., & Krom, B. P. (2016). Interspecies interactions between *Clostridium difficile* and *Candida albicans*. *MSphere*, *1*(6), e00187-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00187-16>
- Witherden, E. A., Shoaie, S., Hall, R. A., & Moyes, D. L. (2017). The Human Mucosal Mycobiome and Fungal Community Interactions. *Journal of Fungi*, *3*(4). <https://doi.org/10.3390/jof3040056>
- Xie, Y., Zhang, H., Liu, H., Xiong, L., Gao, X., Jia, H., Lian, Z., Tong, N., & Han, T. (2015). Hypocholesterolemic effects of *Kluyveromyces marxianus* M3 isolated from Tibetan mushrooms on diet-induced hypercholesterolemia in rat. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(2), 389–395. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220131278>
- Yan, H., Baldrige, M. T., & King, K. Y. (2018). Hematopoiesis and the bacterial microbiome. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-832519>
- Yanting, C., Yang, Q. Y., Ma, G. L., Du, M., Harrison, J. H., & Block, E. (2018). Dose- and

type-dependent effects of long-chain fatty acids on adipogenesis and lipogenesis of bovine adipocytes. *Journal of Dairy Science*, *101*(2), 1601–1615. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-13312>

Yoshida, N., Yamashita, T., Osone, T., Hosooka, T., Shinohara, M., Kitahama, S., Sasaki, K., Sasaki, D., Yoneshiro, T., & Suzuki, T. (2021). *Bacteroides* spp. promotes branched-chain amino acid catabolism in brown fat and inhibits obesity. *IScience*, 103342. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103342>

Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*, *12*(8), 2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>

14. Anexos

Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo

ALIMENTO	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Ocasional	No
LECHE:						
A.- Leche descremada o yogur descremado						
B.- Leche semidescremada o yogur						
C.- Leche entera o yogur natural						
D.- Leche con chocolate o vainilla o leche malteada						
PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL:						
A.- Pechuga de pollo sin piel						
Atún en agua						
Queso cottage						
Tenera.						
B.- Muslo o pierna, hígado de pollo.						
Barbacoa (maciza)						
Carne de cerdo sin grasa.						
Pescado						
Queso panela						
Embutidos de pavo						
Res magra (cuete, filete, falda, aguayón)						
C.- Pollo con piel						
Queso oaxaca						
Huevo entero						
D.-Mariscos						
Embutidos de cerdo						
Queso fuertes						
Cortes de carne con grasa (arrachera, cortes tipo americano como: rib eye, t bone, etc)						

AZUCARES						
Agua preparada de sabor						
Polvo para beber de sabor						
Azúcar						
Cajeta						
Mermelada						
Miel						
Caramelo						
Chicle						
Chocolate en polvo						
Gelatina						
Nieve de frutas						
Helados de crema						
Jugos industrializados						
Refrescos						
Salsa catsup						
SUSTITUTOS						
Sustituto de azúcar (Canderel/Aspartame, Splenda)						
Polvo para bebida (Clight)						
Refresco de dieta						

Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo (continuación)

ALIMENTO	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Ocasional	No
LECHE:						
A.- Leche descremada o yogur descremado						
B.- Leche semidescremada o yogur						
C.- Leche entera o yogur natural						
D.- Leche con chocolate o vainilla o leche malteada						
PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL:						
A.- Pechuga de pollo sin piel						
Atún en agua						
Queso cottage						
Ternera.						
B.- Muslo o pierna, hígado de pollo.						
Barbacoa (maciza)						
Carne de cerdo sin grasa.						
Pescado						
Queso panela						
Embutidos de pavo						
Res magra (cuete, filete, falda, aguayón)						
C.- Pollo con piel						
Queso oaxaca						
Huevo entero						
D.-Mariscos						
Embutidos de cerdo						
Queso fuertes						
Cortes de carne con grasa (arrachera, cortes tipo americano como: rib eye, t bone, etc)						
Pastelillos industrializados						
VERDURAS						
Verduras: crudas/ ensaladas/ cocidas/ precocidos						
Verduras enlatadas						
Jugo de verduras (V8, Licuado de nopal)						
Sopa caldosa						
Sopa de crema						

Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo (continuación)

CEREALES Y TUBÉRCULOS						
<u>Cereales sin grasa:</u>						
Arroz al vapor						
Cereal industrializado						
Elote						
Papa						
Pastas cocidas						
Galletas Marías o saladas						
Palomitas naturales						
Pan de centeno						
Pan de caja: Pan integral						
Pan de caja: Pan blanco						
Tortilla de maíz						
Tortilla de harina						
<u>Cereales con grasa:</u>						
Arroz a la mexicana						
Pasta preparada (con crema, mantequilla, margarina, aceite)						
Pan dulce						
Hot cakes o waffles						
Frituras						
Tamal						

ALIMENTO	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Ocasional	No
FRUTA						
Frutas crudas						
Frutas congeladas/ enlatadas						
Jugo de frutas natural						
LEGUMINOSAS						
Frijol, alubia, habas, lentejas, soya, garbanzo						
LIPIDOS						
<u>Ácidos grasos saturados:</u>						
Mantequilla						
Manteca						
Chicharrón						
Sustituto de crema						
Chorizo						
Tocino						
Crema						
Mayonesa						
Aderezo cremoso para ensaladas						
Chocolates						
<u>Ácidos grasos polinsaturados:</u>						
Aceites de maíz						
Ajonjolí girasol						
Vinagreta						
<u>Ácidos grasos monoinsaturados:</u>						
Oleaginosas						
Aceite de oliva						
Aceite canola						
Aguacate						
<u>Ácidos grasos trans:</u>						
Margarina						

Anexo 2. Cuestionario de Recordatorio de 24 horas

TIEMPO DE COMIDA Y HORA	ALIMENTO, CANTIDAD E INGREDIENTES
DESAYUNO	
COLACIÓN MATUTINA	
COMIDA	
COLACIÓN VESPERTINA	
CENA	

Anexo 3. Mediciones antropométricas realizadas a cada participante

mediciones	resultado
peso	
estatura	
circunferencia de brazo	
circunferencia de brazo flexionado	
circunferencia de cintura	
circunferencia cadera	
circunferencia muñerca	
pliegue cutáneo bicipital	
pliegue cutáneo tricipital	
pliegue cutáneo subescapular	
pliegue cutaneo suprailíaco	
diámetro del húmero	
diámetro del femoral	

Anexo 4. Parámetros bioquímicos realizados a cada participante.

Prueba	Resultado
Electrolitos séricos:	
Calcio	
Sodio	
Potasio	
Cloro	
Fosforo	
Magnesio	
Perfil cinético del hierro:	
Hierro sérico	
UIBC	
Capacidad total de fijación del hierro	
Porcentaje de saturación del hierro	
Ferritina	
Transferrina.	
Perfil hepático:	
Proteínas totales	
Albumina en suero	
Glubulina	
Relación albumina/globulina	
Bilirrubina total	
Bilirrubina directa	
Bilirrubina indirecta	
Alanina aminotransferasa (ALT)	
Aspartato aminotransferasa (AST)	
Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	
Lactato deshidrogenasa (LDH)	
Fosfatasa Alcalina	
Perfil lipídico:	
Colesterol	
Colesterol de alta densidad (HDL)	
Colesterol de baja densidad (LDL)	
Colesterol de muy baja densidad (VLDL)	
Triglicéridos e índice aterogénico	
Química sanguínea:	
Glucosa	
Urea	
Nitrógeno ureico en sangre (BUN)	
Creatinina	
Ácido úrico	

Anexo 5. Secuencias de los cebadores usados en la preparación de la librería (16S). El primer par de cebadores van dirigidos a las secuencias V3 y V4 del gen bacteriano 16S ADN mientras que los segundos cebadores permiten el paso de multiplexación.

Cebador	Secuencia
Amplicón 16S	
Forward (F)	5'- CCTACGGGNGGCWGCAG
Reverse (R)	5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC
Adaptadores	
Forward (F)	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
Reverse (R)	5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

Anexo 5. Secuencias de los cebadores usados en la preparación de la librería (ITS). El primer par de cebadores van dirigidos a la región 1 del gen ITS mientras que el segundo par permiten el paso de multiplexación.

Cebador	Secuencia
Region ITS	
Forward (F)	5'- GATGAAGAACGYAGYRAA
Reverse (R)	5'- TCCTCCGCTTWTGWTGTC
Adaptadores	
Forward (F)	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-GATGAAGAACGYAGYRAA
Reverse (R)	5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-TCCTCCGCTTWTGWTGTC

Anexo 6. Flujo de trabajo para preparar las librerías. Figura extraída de 16s Metagenomic Sequencing Library Preparation (Cod. 150044223 Rev. B).

