



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN HUMANA

Uso de agavinas sobre los efectos adversos intestinales
provocados por la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari
(*Phaseolus acutifolius*) en ratas.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

L.N. Mery Ashley Gómez Garay

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente



Firma

Dr. Alejandro Blanco Labra
Secretario

Firma

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez
Vocal

Firma

Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez
Suplente

Mercedes G. López
Firma

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Suplente

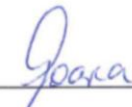


Firma



Dra. Juana Elizabeth Elton Puente

Directora de la Facultad de Ciencias Naturales



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Septiembre, 2018
Querétaro, Qro.
México

Resumen

Las lectinas han sido descritas como compuestos anticancerígenos con alto grado de especificidad. La fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) es capaz de inducir apoptosis en células de cáncer de colon e inhibe la tumorigénesis colónica temprana *in vivo*. Sin embargo, la administración de la FCL produce efectos adversos en intestino, tal como atrofia de las vellosidades y modificaciones en los perfiles de la microbiota. Por otra parte, las agavinas son carbohidratos no digeribles producidos por el agave, constituidos por polímeros de fructosa y una molécula de glucosa. Funcionan como prebióticos que, al ser suplementados en la dieta, aumentan la producción de metabolitos implicados en el mantenimiento de la integridad epitelial intestinal y favorecen el crecimiento de bacterias benéficas en ciego e intestino grueso. En el presente trabajo se estudió el uso de agavinas sobre los efectos adversos provocados por la FCL de frijol Tépari obtenida mediante cromatografía en columna de exclusión de peso molecular, en ratas Sprague Dawley. Para la prueba se utilizaron 24 ratas macho, de 5 semanas de edad (6 por grupo). Grupo control: se administró solución salina. Grupo FCL; se administró cada tercer día una dosis de 50 mg/kg de peso de FCL por vía intragástrica, durante 6 semanas. Grupo agavinas/FCL: Consumieron 10% de agavinas 2 semanas antes del tratamiento con FCL. Grupo agavinas + FCL: Consumieron 10% de agavinas 2 semanas previas y durante el tratamiento con FCL. Las agavinas disminuyeron la ganancia de peso como consecuencia de la disminución del consumo de alimento. En las ratas tratadas con FCL no hubo disminución en la ganancia de peso, sin embargo, se encontró atrofia intestinal. La atrofia intestinal fue menor en los grupos que consumieron agavinas, observada en cortes histológicos del intestino delgado, así como en colon ascendente. Los cambios en los perfiles bacterianos fueron dependientes de la edad y el tratamiento, principalmente por el consumo de agavinas. Los efectos adversos generados en el intestino por el tratamiento de la FCL disminuyeron con las agavinas.

Palabras clave: Agavinas, frijol Tépari, lectinas, microbiota, *Phaseolus acutifolius*, prebióticos.

Summary

Lectins have been described as anticancer compounds with a high degree of specificity. The Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction (TBLF) is capable of inducing apoptosis in colon cancer cells and inhibits early *in vivo* colon tumorigenesis. However, the administration of TBLF produces adverse effects in the intestine, such as villous atrophy as well as changes in microbiota profiles. Agavins are non-digestible carbohydrates from agave, consisting of polymers of fructose and a molecule of glucose. When this prebiotic is supplemented in the diet, it can increase the production of metabolites involved in the maintenance of intestinal integrity and promote the growth of beneficial bacteria in cecum and colon. The aim of this research was to study the use of agavins to reduce the adverse effects caused by TBLF obtained by molecular weight exclusion column chromatography, in Sprague Dawley rats. For acute test male rats of 5 weeks old were used (6 per group). Control group: saline was administered. TBLF group: A dose of 50 mg/kg of TBLF was intragastrically administered every third day of 6 weeks. Agavins/TBLF group: The animals were fed with 10% of agavins 2 weeks before treatment with TBLF. Agavins+TBLF: They were fed with 10% of agavins 2 weeks before and during the treatment with TBLF. Agavins decreased weight gain by decreasing feed intake. In rats treated with TBLF there was no decrease in weight gain, however, intestinal atrophy was found. The intestinal atrophy was lower in the groups that consumed agavins, observed in histological sections of the small intestine, as well as in the ascending colon. Changes in bacterial profiles were dependent on age and treatment, mainly due to the consumption of agavins. The adverse effects generated in the intestine by the treatment of TBLF were found to decrease with agavins.

Key words: Agavins, Tepary bean, lectins, microbiote, *Phaseolus acutifolius*, prebiotics.

Dedico mi tesis con todo mi amor y cariño:

A mis padres, Catalina y Saúl, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como personal. Por inculcar en mi esfuerzo y valentía, de no temer en las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mi hermana pequeña, Kathia, para que nunca olvide que no hay sueños imposibles ni metas inalcanzables. Siempre estaré apoyándote y creyendo en ti.

A mi compañero de vida, Emmanuel, por su infinito amor, comprensión y paciencia. Sabes más que nadie que este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome en todo momento.

A mis suegros y amigos, Guadalupe y Manuel, por su cariño y apoyo incondicional.

A mis abuelos, sus sabios consejos me enseñaron a no rendirme, a luchar siempre por lo creo correcto.

A mi amiga Karla, porque compartíamos el mismo sueño y nos apoyamos para poder lograrlo. Amiga este triunfo también es tuyo.

A mis compañeros de maestría, encontrarlos en el camino fue lo mejor de este proyecto. Su amistad es un gran tesoro para mí.

Agradecimientos

En estas líneas quiero expresar mi profundo agradecimiento:

Al CONACyT por brindarme el financiamiento necesario para la realización de mis estudios y proyecto de maestría.

A la UAQ por darme la oportunidad de formar parte de su historia como alumna de la Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana.

A la Dra. Tere García Gasca por creer en mí, por apoyarme académica y personalmente. Es un honor haber coincidido con una gran persona que admiro y quiero mucho.

Al Dr. Alejandro Blanco Labra por dedicarme tiempo y compartir su conocimiento. Por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Andrea Olvera Ramírez por brindarme su amistad y alentarme cuando las cosas no salían bien, sin importar la hora. Gracias por su sinceridad y confianza.

A la Dra. Mercedes López por su paciencia, su amistad y cariño. Gracias por exigirme lo que cree que puedo dar, sus enseñanzas aumentaron la curiosidad y pasión en todo lo hago.

Al Dr. Roberto Ferriz por su optimismo y compromiso en este proyecto. Me ha ayudado a confiar más en mí misma.

A mis compañeros del laboratorio de biología celular y molecular; Joss, Naye, Wen y Juliana por su paciencia y amistad. Por hacer divertidas las largas horas en el laboratorio.

A Elizabeth, técnico auxiliar de investigación del laboratorio de mecanismo de defensa de plantas en Irapuato, Gto. Por su apoyo y hacerme sentir en casa cada vez que trabajé en ese laboratorio. Le guardo un gran cariño y admiración por ser una gran guerrera.

Índice

Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras.....	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Lectinas vegetales	3
2.2. Efectos antinutricios de las lectinas	6
2.3. Lectinas de frijol Tépari.....	8
2.4. Microbiota intestinal	9
2.5. Prebióticos	12
2.6. Fructanos.....	14
2.7. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC).....	16
2.8. Uso de modelos murinos para el estudio de microbiota intestinal	18
2.9. Técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas	19
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVOS.....	29
5.1. Objetivo general.....	29
5.2. Objetivos específicos	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30

6.1. Diseño de estudio	30
6.2. Obtención de la fracción concentrada en lectinas de frijol tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>).....	30
6.3. Obtención del agavinas	31
6.4. Modelo experimental <i>in vivo</i>	32
6.5. Evaluación de los efectos de la administración subcrónica de cada tratamiento.....	33
6.5.1. Análisis histológicos	33
6.5.2. Análisis de cambios en la microbiota	34
6.6. Análisis estadístico	35
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1. Determinación de la actividad aglutinante	36
7.2. Experimento <i>in vivo</i>	36
7.2.1. Peso y consumo de alimento	36
7.2.2. Histología en intestino delgado y grueso.....	40
7.2.3. Cambios en la microbiota.....	46
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
X. ANEXOS.....	62
ANEXO 1. Histología del intestino	62
Intestino delgado.....	62
Intestino grueso.....	64
Anexo 2. Análisis de pureza e integridad de DNA en NANODROP 2000c.....	66
Anexo 3. Preparación de muestra para PCR.....	67
Anexo 4. Dendograma de los cambios en la microbiota con pruebas por triplicado	68

Índice de cuadros

Cuadro 1. Principales grupos de bacterias intestinales y metabolitos de la fermentación sacarolítica	17
Cuadro 2. Principales taxones en la microbiota intestinal en humanos y modelos murinos.....	19
Cuadro 3. Marcadores hematológicos después del tratamiento con fracción concentrada en lectinas	40
Cuadro 4. Reporte total de bandas del perfil bacteriano por semanas de tratamiento con la FCL	46

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales de lectinas vegetales.....	5
Figura 2. Análisis histopatológico de íleon después del tratamiento con FCL.....	9
Figura 3. Estructuras moleculares basadas en los tres grupos propuestos de agavinas.....	15
Figura 4. Técnicas moleculares para el análisis de comunidades bacterianas.	21
Figura 5. Efecto de la administración de agavinas sobre el peso corporal en ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari.....	37
Figura 6. Efecto de la administración de agavinas sobre el consumo de alimento en ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari.	37
Figura 7. Efecto de la administración de agavinas sobre el consumo de agua en ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari.	38
Figura 8. Efecto de la administración de agavinas sobre peso y longitud de los órganos de ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari	39
Figura 9. Análisis histológico del duodeno.	42
Figura 10. Análisis histológico del yeyuno.....	42
Figura 11. Análisis histológico del íleon.	43
Figura 12. Análisis histológico del intestino grueso.....	44
Figura 13. Perfil electroforético de DNA bacteriano de los pools de ratas por semanas.....	46
Figura 14. Dendograma (UPGMA) de los perfiles de bandas bacterianos de los pools de ratas por semanas.	48
Figura 15. Capas de intestino delgado de rata.....	62
Figura 16. Esquema de los principales linajes celulares del intestino delgado	63
Figura 17. Capas del intestino grueso de rata. Secciones teñidas con hematoxilina-eosina.....	64
Figura 18. Esquema de los principales linajes celulares del intestino grueso. intestinal	65
Figura 19. Prueba de integridad mediante electroforesis.	66

Figura 20. Dendograma de los cambios de la microbiota con pruebas por triplicado..... 68

I. INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, capaces de reconocer carbohidratos y enlazarse reversiblemente a ellos. Su ubicuidad es extensa, especialmente en plantas donde actúan como parte de los mecanismos de defensa contra plagas (Castillo y Abdullaev, 2005). Son abundantes en leguminosas, las cuales han mostrado efectos sobre la adhesión y señalización en células animales, tanto normales como cancerígenas. De esta forma, se propone que reconocen carbohidratos específicos alterados en las membranas de las células cancerígenas (Sharon, 2008). Diversos estudios se han realizado sobre las lectinas como alternativa para el tratamiento del cáncer debido a que las células cancerígenas presentan alteraciones en su glucocálix (Ferriz-Martinez y col., 2010). La fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en células de cáncer de colon de forma diferencial (García-Gasca y col., 2012).

Se ha observado que la FCL administrada por vía intragástrica cada tercer día durante seis semanas con una dosis de 50 mg/kg de peso corporal, es capaz de inhibir la tumorigénesis temprana en cáncer de colon (Ferriz-Martínez, 2015). Por lo anterior se espera que la fracción concentrada en lectinas pueda ser usada en el tratamiento de cáncer de colon. Sin embargo, el tratamiento con la FCL ha mostrado efectos antinutricios caracterizados por una disminución en el consumo de alimento así como disminución en la ganancia de peso corporal, además de causar atrofia en las vellosidades del intestino y atrofia pancreática, efectos que son reversibles al suspender el tratamiento (Ferriz-Martínez y col., 2015; Pita-López, 2015; Alatorre-Cruz y col., 2017).

Las lesiones causadas en el intestino por la administración de FCL pueden afectar la absorción de nutrientes. Se propone que estos efectos adversos también son dependientes de la interacción con la microbiota intestinal por lo que podría generar una disbiosis, esto es cambios en la estructura y funciones de la microbiota presente en el intestino del huésped (Pusztai y Bardocz, 1996; Rhodes.

1999). La microbiota cumple con funciones metabólicas fundamentales para el organismo, entre ellas la protección del tracto digestivo, principalmente por la generación de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta obtenidos de la fermentación de prebióticos (Thorburn y col., 2024; Xiao y col., 2015).

Los prebióticos son sustratos importantes para la microbiota ya que aumentan poblaciones bacterianas benéficas, activando la función inmune del intestino y manteniendo funciones intestinales, energéticas y preventivas contra el cáncer. También mejoran la absorción de nutrimentos inorgánicos y regulan el metabolismo de lípidos (Xiao y col., 2015). El uso de prebióticos reduce la formación de fosas cripticas aberrantes causada por carcinogénicos, debido a que mantienen la integridad de la mucosa intestinal y neutralizan factores bacterianos de virulencia. Los mecanismos de acción están sujetos a la alteración de la actividad metabólica microbiana colónica, reducción del pH cecal, estimulación de la proliferación de bacterias benéficas, así como la producción de ácidos grasos de cadena corta (Pattananandecha y col., 2016). Entre los tipos de prebióticos se encuentran los fructanos, que son metabolizados por plantas y utilizados como su fuente de energía. Según las variaciones en su estructura, se encuentran fructanos tipo inulina, fructanos tipo levano, neoserie y graminado (Ritsema y Smeekens, 2003). Una fuente importante de fructanos es el agave, principalmente de agavinas; su estructura consiste en polisacáridos ramificados y una molécula de glucosa. Los fructanos de agave, al ser suplementados en la dieta al 10% incrementan significativamente la producción de ácidos grasos de cadena corta en ciego y colon de ratas sanas (García-Curbelo y col., 2015). Por lo anterior, el presente trabajo determinó el uso de agavinas para disminuir los efectos adversos de la administración de la FCL de frijol Tépari sobre intestino.

II. ANTECEDENTES

2.1. Lectinas vegetales

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que pueden enlazarse de manera reversible a carbohidratos complejos y azúcares libres. La capacidad de aglutinar células es su principal característica. Estas moléculas están disponibles en organismos como bacterias, hongos, animales y plantas. Entre sus principales funciones biológicas se pueden mencionar la interacción con grupos sanguíneos específicos, aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales, inducción de mitosis en linfocitos y efectos citotóxicos sobre células de cáncer (Castillo y Abdullaev, 2005; Ferriz-Martínez y col., 2010).

Las lectinas vegetales se caracterizan por tener glicosilaciones y reconocer de forma diferencial células animales. La mayoría es capaz de unirse a la membrana de eritrocitos generando aglutinación. Las lectinas vegetales se pueden encontrar en hojas, tallos, cortezas y frutos pero mayormente en los cotiledones y endospermos de las semillas (Lis y Sharon, 1998; Hernández-Cruz, 2005). La función de las lectinas vegetales está implicada con el proceso de culminación de la fase productiva de las semillas, participan como sustratos en la biosíntesis de algunos nutrientes, y son parte del mecanismo de defensa de las plantas ante situaciones de estrés, contra el ataque de hongos, bacterias, insectos, nematodos y animales, además de ser parte de las estructuras de las proteínas de reserva de la semilla (Elizalde y col., 2009). De acuerdo a su estructura molecular, se describen seis familias de lectinas vegetales (Figura 1).

1. Lectinas de leguminosas. Constituyen entre el 2 al 10% del contenido proteico total (Gupta, 1987). La estructura de las lectinas de leguminosas generalmente consta de dos o cuatro subunidades idénticas y en cada subunidad hay un sitio de unión para iones metálicos como Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Cada subunidad está constituida aproximadamente por 250 aminoácidos y pueden contener una o dos N-glicosilaciones. Cada subunidad está compuesta por doce hojas β antiparalelas

conectadas entre sí por bucles, lo que les confiere una estructura aplanada en forma de domo. Cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de unión a carbohidratos y reconocen carbohidratos o azúcares simples uniéndose mediante enlaces débiles como puentes de hidrógeno, iónicos y fuerzas de Van der Waals (Hernández-Cruz y col., 2005). La estructura descrita es rígida y fuerte por lo que son capaces de resistir al ataque proteolítico enzimático (Lis y Sharon, 1998).

2. Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina. Generalmente presentan subunidades idénticas, ricas en cisteína contrariamente a las lectinas de leguminosas. Cada subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína con puentes disulfuros, por lo cual no hay estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña α -hélice de cinco residuos. Cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidratos que no necesita la presencia de iones metálicos (Hernández-Cruz y col., 2005).

3. Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa. Estas lectinas se obtienen de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Son tetraméricas y cada monómero tiene un peso aproximado de 12 kDa y una secuencia de 36 aminoácidos que se repite tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidratos está constituido por cuatro hojas de β antiparalelas unidas entre sí por giros. El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central (Hernández-Cruz y col., 2005).

4. Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina. Las estructuras tridimensionales de estas lectinas vegetales son muy similares a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina). Son lectinas tetraméricas glicosiladas donde cada subunidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β). Están constituidas por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular (Hernández-Cruz y col., 2005).

5. Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas. Consideradas tóxicas. Son de las estructuras más complejas de lectinas. Constituidas por dos cadenas, A y B, diferentes y unidas por enlaces disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción), mientras que la cadena B posee la actividad de lectina. La cadena B está constituida por dos dominios de cuatro sub-unidades, las cuales contienen α -hélices y hojas β (Hernández-Cruz y col., 2005).

6. Lectinas tipo amaranto. Dentro de este grupo están lectinas provenientes de distintas especies de amaranto, entre las que destacan *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus leucocarpus*. Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dominios N y C, unidos por una pequeña hélice. Cada dominio muestra una conformación observada en la cadena B de la lectina *Ricinus communis* (Hernández-Cruz y col., 2005).

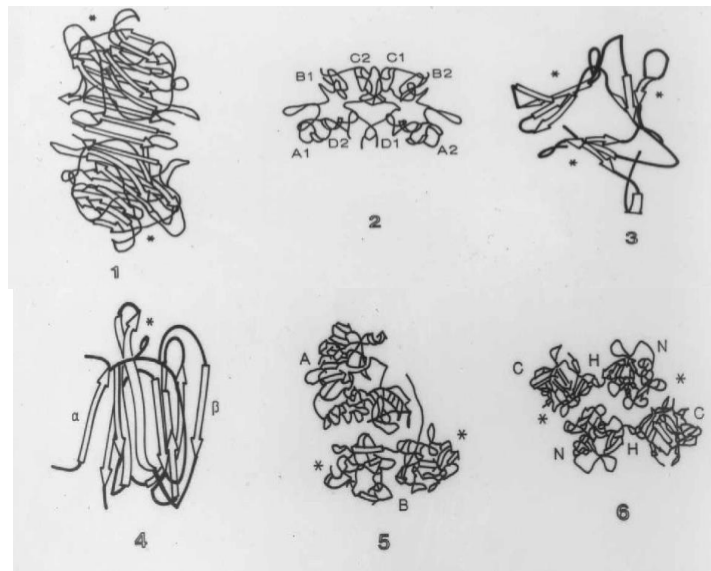


Figura 1. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales de lectinas vegetales. (1) Lectinas aisladas de leguminosas; (2) Lectinas con dominio tipo heveína, en donde cada dominio se representa con las letras de la A-D; (3) Lectinas aisladas de monocotiledóneas, específicas de manosa; (4) Lectinas con estructura tipo primas β ; (5) Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas; (6) Lectinas tipo amaranto. (*) Sitio de unión al carbohidrato (Hernández-Cruz y col., 2005).

2.2. Efectos antinutricios de las lectinas

Las lectinas de la dieta son consideradas factores antinutricios debido a la unión efectiva con los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino, donde ejercen su actividad biológica e inmunológica (Lajolo y Genovese, 2002; González de Mejía y Prisecaru, 2005). Se ha encontrado que son resistentes a la degradación por bacterias presentes en el tracto digestivo y que tienen la capacidad de sobrevivir a la digestión enzimática en los mamíferos (Pusztai y Bardocz, 1996; Rhodes, 1999). Estos efectos pueden evitarse cuando las lectinas son sometidas a tratamientos térmicos, lo que causa desnaturalización irreversible de la proteína. La actividad hemaglutinante ha sido eliminada bajo tratamiento térmico a 92° C por 5 min (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Se ha reportado que la lectina de soya se inactiva mediante tratamiento térmico a 100° C por 10 min (Lajolo y Genevese, 2002).

La disminución de los procesos de absorción de nutrimentos es el principal efecto antinutricio debido a que las lectinas se adhieren a los carbohidratos de la membrana del intestino delgado (principalmente duodeno y yeyuno), lo cual provoca daños en la pared intestinal caracterizados por hipertrofia e hiperplasia. Provocan mayor permeabilidad en las células del intestino, permitiendo la internalización de lectinas y péptidos, lo que puede desencadenar efectos perjudiciales sobre el sistema inmune y otros órganos. Se ha descrito que la unión de lectinas a la mucosa intestinal modifica la actividad de las enzimas digestivas, lo que afecta el catabolismo de macronutrientes obtenidos endógenamente debido a la descamación de las células dañadas. Se ha observado inhibición del crecimiento y aumento de mucinas. Se presume que el daño a la mucosa intestinal permite el paso de bacterias al sistema circulatorio y afecta órganos internos (Pusztai y Bardocz, 1996; Elizalde y col., 2009). El consumo diario de 0.73 mg/g de lectina de soya en ratas ha mostrado reducción en la retención de nitrógeno y aumento en su excreción a través de la orina, interpretándose como interferencia con el metabolismo de proteínas (Czerwinski y col., 2005). Se ha reportado

también que las lectinas de soya reducen la producción de insulina a una dosis oral mayor de 0.02 g/kg de peso corporal (Bardocz y col., 1996).

Respecto a su resistencia, se ha observado que la Concaivalina A, administrada por vía oral, se recuperó en un 90% en heces 4 días después del tratamiento (Nakata y Kimura, 1985). La lectina del frijol kintoki administrada a ratones se encontró en el tracto digestivo a niveles de hasta 78.6% 24 h después de intubación gástrica (Hara y col., 1984). En el caso de lectinas de frijol Tépari, se ha observado que conservan su actividad aglutinante en heces por más de 72 h (Ferriz-Martínez y col., 2015).

Se propone que los efectos adversos también son dependientes de la interacción con la microbiota intestinal. Se ha descrito que las lectinas pueden estimular selectivamente el crecimiento bacteriano en el intestino delgado, causando una mayor endocitosis por células epiteliales. Lo anterior puede provocar internalización de lectinas y bacterias así como de sus metabolitos, lo que puede inducir procesos tóxicos en el organismo. Las dietas altas en lectinas, modifican los perfiles bacterianos ya que pueden interactuar directamente con algunas bacterias residentes del intestino y eliminarlas selectivamente con el paso de la materia intestinal. Otro mecanismo descrito está dado por la eliminación de sitios de unión potenciales para bacterias particulares mediante la interacción directa de las lectinas con borde del cepillo, donde se acelera la rotación de células epiteliales y se modifican las glicosilaciones de los receptores (Pusztai y Bardocz, 1996; Rhodes, 1999). Las lectinas de frijol han favorecido el crecimiento de *E. coli* en el intestino de rata, mostrando ser dependientes de las dosis dado que, al retirar la administración de lectina, el exceso de *E. coli* disminuyó. Un aumento excesivo de esta bacteria puede generar problemas gastrointestinales (Pusztai y col., 1993). Se ha observado modificaciones en los perfiles bacterianos fecales en ratas tras la administración de lectinas de frijol Tépari, efecto reversible al suspender el tratamiento (datos no publicados).

2.3. Lectinas de frijol Tépari

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) es originario del Noroeste de México y Suroeste de los Estados Unidos. Se caracteriza por su alta resistencia a sequías, se adapta a ambientes cálidos, requiere poca humedad y es resistente a plagas. Tiene un ciclo de producción muy corto, sus semillas son de alta calidad proteínica por lo cual ha sido utilizado para mezclarse con el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) para su mejoramiento (López-Soto y col., 2005; Jiménez-Galindo y Acosta Gallegos, 2013). Es una leguminosa poco consumida por el ser humano ya que necesita de largos tiempos de cocción y es de alta dureza. La composición en crudo del frijol Tépari es similar a otras variedades de leguminosas en concentración de cenizas, grasas y carbohidratos totales, pero específicamente posee compuestos antinutricios como inhibidores de proteasas, fitatos y lectinas, que son eliminados casi en su totalidad por cocción, lo que hace seguro su consumo. Una importancia biológica de las lectinas del frijol Tépari es que son encontradas en menor concentración pero mayor actividad hemaglutinante. (González de Mejía y col., 1989; Osman y col., 2003).

Lectinas de frijol Tépari han sido obtenidas por cromatografía de exclusión de peso molecular, en lo que se ha denominado fracción concentrada en lectinas (FCL) y ejercen efecto citotóxico diferencial sobre líneas celulares cancerígenas, particularmente sobre células de cáncer de colon (García-Gasca y col., 2012). Estudios *in vivo* determinaron como dosis máxima sin efectos adversos la de 50 mg/kg de peso vía intragástrica (López-Sánchez y col., 2010). Esta dosis se administró en ratas Sprague Dawley con cáncer de colon inducido por 1,2-Dimetilhidrazina, encontrándose inhibición de la tumorigénesis temprana (Ferriz-Martínez, 2015). La administración subcrónica mostró pérdida de la ganancia de peso corporal en un 10% con respecto al control, además de una disminución significativa en el consumo de alimento en la tercera semana de haber iniciado el tratamiento, sin embargo se observó recuperación en las siguientes tres semanas. La dosis de 50 mg/kg de FCL no presentó efectos tóxicos sistémicos de acuerdo a marcadores séricos para función hepática, pancreática y renal. Al analizar la

respuesta inmunológica después de 24 h de una dosis única de FCL se encontró disminución de linfocitos y aumento de neutrófilos y eosinófilos, lo cual sugiera activación del sistema inmune (Ferriz-Martínez y col., 2015). Se ha reportado que la administración diaria de FCL por vía intragástrica reduce la altura de las vellosidades intestinales en ratas Sprague Dawley, manifestando atrofia intestinal e hipertrofia pancreática reversible al suspender el tratamiento (Figura 2) (Alatorre-Cruz y col., 2017).

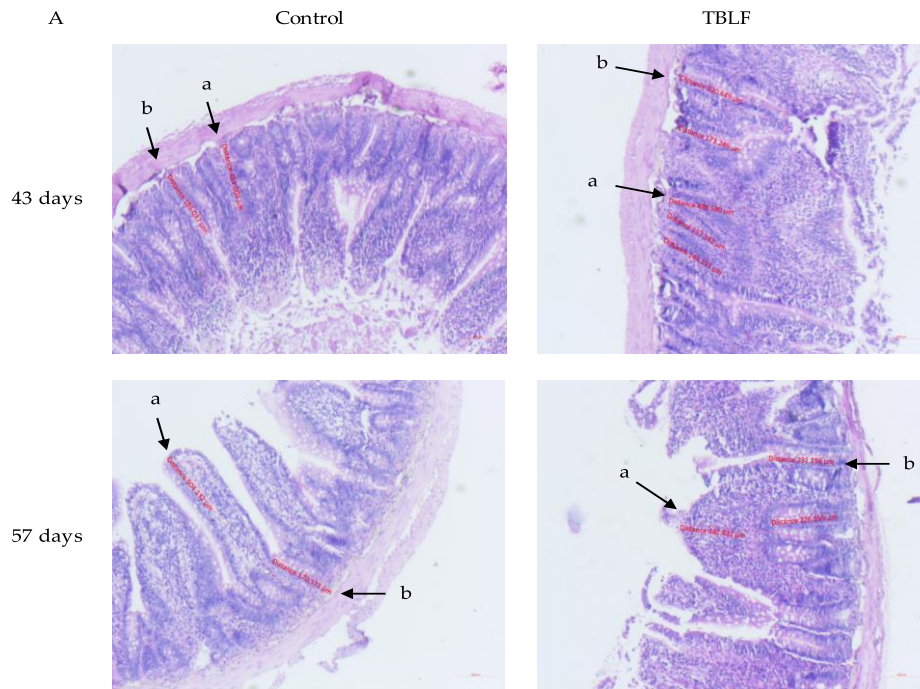


Figura 2. Análisis histopatológico de íleon después del tratamiento con FCL. Microfotografías 5X de íleon muestran que las ratas tratadas mostraron vellosidades atróficas (a) y un aumento de la altura de la cripta (b) después de 43 días de tratamiento.

2.4. Microbiota intestinal

Los microorganismos más estudiados son los que se encuentran en el tubo digestivo dado que la población es numerosa, diversa y dinámica. La microbiota intestinal se ha adecuado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino a través de los cambios adaptativos del ser humano desde su existencia. Se ha comprobado que la función y composición de los perfiles bacterianos se modifican por diversas condiciones del huésped como son salud y enfermedad, las

diferentes etapas de la vida y a factores externos como el tipo de parto (cesárea o parto natural), tipo de lactancia (materna o de fórmula), ciclo circadianos, exposición al estrés, uso de antibióticos, el lugar geográfico donde habita el huésped así como los hábitos alimenticios. Ante la modificación de estos factores se pueden presentar procesos inflamatorios, autoinmunes e infecciosos propios de enfermedades como síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer de colon, úlcera gástrica y obesidad (O'Hara y Shanahan, 2006; Nicholson y col., 2012; Cigarran-Guldris y col., 2016).

Existen bacterias que habitan permanentemente en el tubo digestivo y se van adquiriendo a través de la interacción con el medio ambiente, son denominadas bacterias nativas. Por otro lado se encuentran las bacterias pasajeras, ya que solo se mantienen temporalmente en la luz o mucosas y después desaparecen, son obtenidas principalmente de los alimentos y bebidas que consumimos (Guarner, 2010). La microbiota intestinal del ser humano se compone de más de 100 trillones de microorganismos, supera 10 veces al número de células somáticas y constituyen aproximadamente 1.5 a 2 kg del peso corporal (Bäckhed y col., 2005; Cigarran-Guldris y col., 2016). Se encuentran distribuidas en diferente tipo de perfil bacteriano y cantidad según la porción del tubo digestivo. En el estómago y duodeno corresponden a aproximadamente 10^3 UFC/mL, en esta porción se encuentran en menor cantidad ya que las bacterias son destruidas por las enzimas digestivas además de que el tránsito es rápido lo que impide la colonización estable. En la parte distal del intestino delgado la cantidad es de 10^4 - 10^8 UFC/mL, encontrándose en mayor cantidad en el colon debido a que el tránsito es lento, lo que permite la proliferación de microorganismos y a su vez la generación de metabolitos por la fermentación de materia orgánica presente. El promedio en esta sección es de 10^9 hasta 10^{12} UFC/mL en su mayoría son bacterias anaerobias y están adheridas a mucinas, criptas y colonocitos (Shanahan, 2002; Blaut y Clavel, 2007; Guarner, 2010). Por ubicación y mecanismos se han descrito las siguientes funciones:

- Metabólicas y nutricias: Intervienen en la asimilación de nutrientes de la dieta y glicanos endógenos. La actividad bioquímica de la microbiota incluye la recuperación de energía en forma de ácidos grasos de cadena corta, producción de vitaminas y efectos favorables sobre la absorción de hierro y calcio en el colon (Shanahan, 2002).
- Protectoras: Contribuyen al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos (Guarner, 2010).
- Tróficas: intervienen en la modulación del sistema inmune, en el desarrollo y la proliferación celular y en la diferenciación del epitelio intestinal (Domínguez-Vergara y col., 2009).

La dieta, higiene, los antibióticos o estadios de enfermedad pueden modificar la microbiota, sin embargo, ésta tiene una gran capacidad de resiliencia, es decir, que se adapta a las situaciones adversas que se presentan y es capaz de recuperarse al estado inicial cuando cesa la perturbación; este estado natural positivo para el huésped se conoce como eubiosis (Alarcón-Cavero y col., 2016). Cuando los diversos factores modifican la composición microbiana al grado de comprometer su funcionamiento se dice que se ha producido una disbiosis. Esto puede ocasionar enfermedades relacionadas con las funciones intestinales y sistémicas dependiendo de la susceptibilidad del huésped (Greer y O'Keefe, 2011; Cigarran-Guldris y col., 2016). Para mantener el funcionamiento adecuado de la microbiota se ha propuesto el uso de suplementos dietéticos que pueden influenciar la composición de la microbiota y proveer salud, como prebióticos, probióticos; microorganismos viables, definidos en números suficientes, no patógenos y no tóxicos, que alteran la microbiota, por implantación o colonización, en un compartimiento del huésped, y simbióticos; productos que contienen prebióticos y probióticos, cuya combinación podría mejorar la supervivencia del organismo probiótico, debido a que su sustrato específico está fácilmente disponible para su fermentación, y dar como resultado ventajas para el huésped (Collins y Gibson, 1999; Schrezenmeir y De Vrese, 2001).

2.5. Prebióticos

Un prebiótico es aquel ingrediente alimentario que no puede ser digerido por enzimas humanas, sin embargo, influye en el crecimiento selectivo o la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon, por lo que confiere beneficios para la salud del huésped. Debe entonces cumplir con las siguientes características (Collins y Gibson, 1999; De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

- Ser resistente a la acidez gástrica, así como a la hidrólisis de enzimas de mamíferos, por lo tanto no pueden ser absorbidos.
- Ser fermentado parcialmente por bacterias en el intestino grueso, siendo un sustrato fermentable nutricional para la microbiota intestinal.
- Estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad bacteriana en el intestino que provea salud y bienestar, específicamente aumentando población de bacterias acidófilas fermentativas (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) y ser capaz, en consecuencia, de alterar la microbiota colónica hacia una composición más saludable.

Son considerados prebióticos los oligosacáridos compuestos de 3 a 30 moléculas de monosacáridos los cuales están unidos por enlaces glicosídicos tipo β . Se consideran los siguientes tipos y fuentes (Hernández y col., 2015):

- Fructooligosacáridos (FOS) e inulina. Se adquieren de achoria, cebolla, ajo, alcachofa, yacon, puerro, espárragos, entre otros. Son obtenidos a partir de la sacarosa mediante transfructosilación por la enzima β -fructofuranosidasa. Los FOS están formados por 3-4 unidades de fructosa unidas con enlaces $\beta(1,2)$ con residuo terminal D-glucosa.
- Galacto oligosacárido (GOS). Sus fuentes son la leche y legumbres. Son producidos por la acción de la β -galactosidasa con actividad de transgalactosilación. Las uniones son entre dos unidades de galactosa, principalmente tipo $\beta(1,4)$ o tipo $\beta(1-6)$, utilizando como sustrato lactosa.
- Xilo oligosacárido (XOS). Presentes en verduras, fruta, miel y leche.

- Isomalto oligosacárido (IMOS). Presentes en soya y miel.
- Lactulosa. Se produce mediante la isomerización alcalina de la lactosa de la leche de vaca. Es un disacárido galactosa-fructosa, se ha utilizado como tratamiento para el estreñimiento en la encefalopatía hepática.
- Oligosacáridos de la leche materna. La lactosa como tal se describe por su efecto prebiótico y ésta a su vez origina β -galactooligosacáridos (β -GOS). La unión de β -GOS a fucosa forma OS neutros (fucosilados) y por unión a ácido siálico produce OS ácidos (ácido acetilmurámico). Dichos compuestos cambian su concentración según sea calostro o leche madura.

Los efectos de los prebióticos hasta ahora reportados son (Xiao y col., 2015):

- Funciones intestinales: aumentan la presión osmótica luminal, secreción del agua, el peristaltismo, la generación de gases y el volumen de las heces. Favorecen la prevención de infecciones, diarrea, estreñimiento y mejoran los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- Aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta: Son una fuente importante de nutrimentos para el epitelio intestinal. El butirato estimula la proliferación celular de la mucosa cecal y colónica en humanos y animales como cerdos y ratas. Después de la primera captación, tanto el butirato como el propionato son metabolizados por los hepatocitos. El acético es absorbido directamente por el hígado, contribuyendo así a la ingesta energética del huésped.
- Efecto preventivo de aparición de tumores malignos en el epitelio del colon: Existe evidencia sobre el efecto protector del butirato contra la carcinogénesis y como antiinflamatorio en las células de cáncer de colon. Actúa como regulador del crecimiento celular al retardar la proliferación celular y favorecer la diferenciación y apoptosis.
- Metabolismo de lípidos: Reducen el colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y el nivel de triglicéridos sanguíneos ya que la producción de ácidos grasos de cadena corta inhibe las enzimas implicadas en la síntesis de triglicéridos y colesterol en el hígado en humanos y ratas. Además existe

reporte de que aumentan HDL (lipoproteínas de alta densidad) que están implicadas en el transporte adecuado del colesterol.

- Absorción de nutrimentos inorgánicos: Favorecen el aumento de la biodisponibilidad de nutrimentos inorgánicos como el calcio, zinc, el magnesio y el hierro. Lo anterior cobra importancia en el tratamiento de osteoporosis y sus síntomas al disminuirse moderadamente la excreción urinaria de calcio y aumentarse su absorción.
- Función inmunológica: Aumentan la proliferación de bacterias productoras de ácido láctico, especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; y atenúan componentes patógenos de la microbiota como *Enterobacteriaceae*, *Clostridium sensu strictu*, *Streptococcus faecalis* y *Proteus sp.*

2.6. Fructanos

Los fructanos son polisacáridos de moléculas de fructosa unidas por enlaces glicosídicos β 2-1 y β 2-6, pueden presentar en su estructura una molécula de glucosa terminal o interna y pueden ser lineales o ramificados. El agave produce a su vez diferentes fructanos como; inulina, levanos, neofructanos, graminados y agavinas (Mancilla-Margalli y López. 2006). Las agavinas son consideradas fructanos tipo inulina debido a su grado de polimerización, ya que los fructanos que contienen 3 a 10 moléculas en su estructura se denominan fructooligosacáridos y los que contienen más de 10 se catalogan como inulinas (Figura 2) (Mancilla-Margalli y López. 2006).

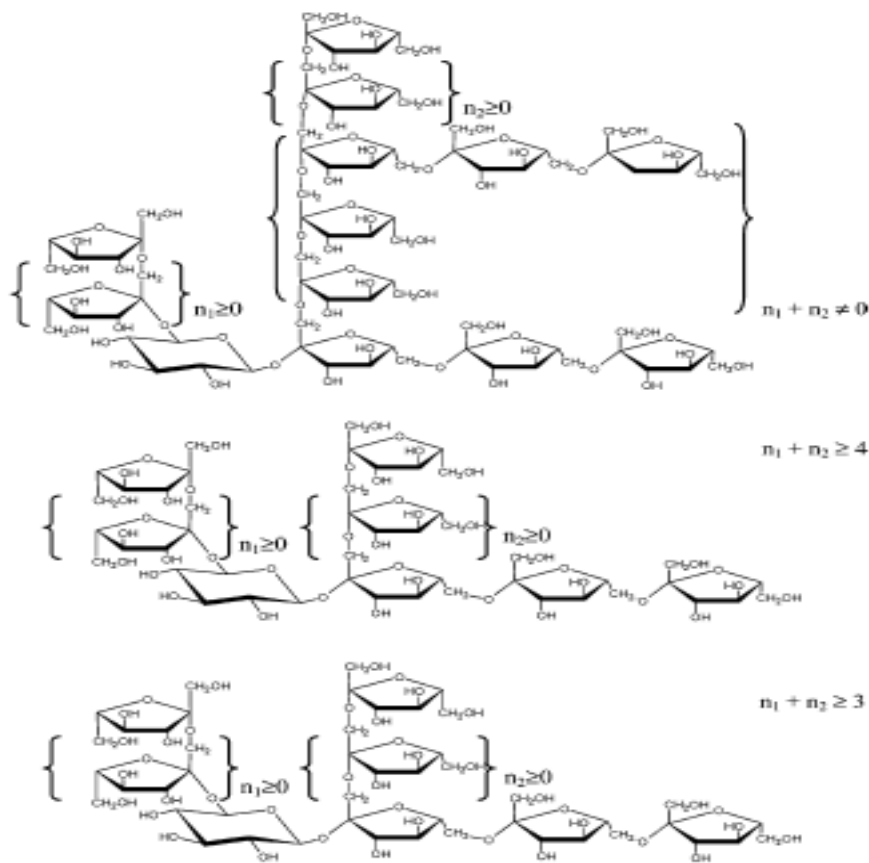


Figura 3. Estructuras moleculares basadas en los tres grupos propuestos de agavinas (Mancilla-Margalli y López. 2006).

La suplementación de oligofruktosa e inulina de cadena larga en modelos murinos ha mostrado un aumento de las vellosidades así como criptas más profundas y estabilización de la barrera de la mucosa intestinal debido a la interacción de los prebióticos con las bacterias presentes en el intestino, con efecto trófico positivo del prebiótico en la barrera mucosa (Kleesen y col., 2003). En modelos de cáncer en ratas se ha observado que la adición de inulina de cadena larga disminuye la formación de fosas de criptas aberrantes, además aumenta la proliferación de bacterias benéficas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Pattananandecha y col., 2016; Reddy y col., 1997).

Estudios en modelos *in vivo* han mostrado que la administración de agavinas reduce la ingesta de alimentos, el peso corporal, la glucosa, los triglicéridos y el colesterol en ratones con sobrepeso, asociado al incremento en los niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente propiónico y butírico, en la porción distal del intestino grueso; así como a la restauración de la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* (Huazano-García y López. 2015). En cuanto a estudios clínicos, se ha observado que la suplementación de inulina de agave altera la composición y actividad de la microbiota en adultos sanos. Estos resultados se atribuyen a la estructura molecular propia de la inulina de agave así como a la cantidad administrada. Los pacientes que consumieron las mayores dosis propuestas en el estudio (5 y 7.5 g de inulina) aumentaron poblaciones de bacterias que confieren beneficios al huésped, principalmente *Bifidobacterium* (Holscher y col., 2015).

2.7. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Resultado de la fermentación de los polisacáridos complejos, que no son digeridos en el intestino delgado, la microbiota del colon genera metabolitos como los AGCC y gases (CO₂ y H₂), entre otros (Chassard y Lacroix, 2013). Se describen principalmente la producción tres AGCC: acetato, propionato y butirato en proporción 3:1:1. Esta producción está mediada por la cantidad en forma física y composición química de los sustratos fermentables así como de las bacterias presentes y su interacción con los demás microorganismos en el tubo digestivo y el vaciamiento intestinal (Macfarlane y Macfarlane, 2003; Louis y col., 2014). La mayoría de bacterias intestinales utilizan la vía glicolítica para obtener energía de los carbohidratos, que de primera instancia se convierten en piruvato y acetyl-CoA. A partir de estos se da el control para la generación de amplia gama de productos obtenidos por metabolismo fermentativo (Macfarlane y Macfarlane, 2003). Las principales bacterias sacarolíticas generadoras de AGCC se muestran en el Cuadro 1 (Puertollano y col., 2014).

Cuadro 1. Principales grupos de bacterias intestinales y metabolitos de la fermentación sacarolítica (Puertollano y col., 2014)

Especies de bacterias	Metabolitos
<i>Bacteriodes</i>	Acetato y propionato
<i>Bifidobacterium</i>	Acetato, lactato
<i>Clostridium</i>	Acetato, butirato, lactato, propionato
<i>Lactobacillus</i>	Acetato y lactato
<i>Atopobium</i>	Acetato y lactato
<i>Faecalibacterium</i>	Butirato
<i>Fusobacterium</i>	Acetato, butirato y lactato
<i>Ruminococcus</i>	Acetato y lactato
<i>Enterobacterium</i>	Acetato y lactato
<i>Eubacterium</i>	Acetato, butirato y lactato
<i>Enterococcus</i>	Lactato
<i>Prevotella</i>	Propionato
<i>Roseburia</i>	Butirato

Los AGCC son utilizados por las células epiteliales del intestino, principalmente de zona distal, como fuente de energía además, están implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación y modulación celular de los colonocitos. También se destaca su importancia en funciones fisiológicas en diferentes tejidos y como usos terapéuticos en trastornos metabólicos e inflamatorios (Puertollano y col., 2014). Entre los mecanismos mediante los cuales están implicados en el mantenimiento funcional y estructural del intestino se encuentran (Thorburn y col., 2014):

1. Promoción de la secreción del moco. El moco es un elemento importante para la separación física de las bacterias de la superficie intestinal y es un contribuyente crítico para la homeostasis intestinal y tolerancia inmune. Está descrito que las especies de alta producción de acetato *Bacteroides thetaiotaomicron* promueven la diferenciación de células caliciformes y la expresión de genes para la producción de moco.

2. Promoción de la secreción de IgA, implicada en el mantenimiento no inflamatorio entre el huésped y la microbiota intestinal. Los AGCC promueven la secreción de esta inmunoglobulina por las células B.

3. Reparación tisular. La mucosa intestinal es propensa a ulceración y daño físico por acciones de parásitos, y dependerá de la capacidad y eficiencia del proceso de reparación. Los AGCC están implicados en estos procesos de reparación al participar en la proliferación y diferenciación celular del epitelio intestinal. Por ejemplo la inhibición de NF-KB por AGCC.

4. Mantenimiento de la integridad epitelial.- Este mecanismo se debe a la implicación del sistema inmunitario innato para la producción de interleucina 18 (IL-18).

2.8. Uso de modelos murinos para el estudio de microbiota intestinal

Los murinos (murinae) son una subfamilia de roedores pertenecientes a la familia Muridae, que incluye ratas y ratones. Estos modelos disminuyen factores de confusión como la genética, edad y dieta. Su genoma está completamente secuenciado, son de rápida reproducción, su manipulación y mantenimiento es fácil por su tamaño en comparación con otros modelos animales. Son utilizados como modelos en la investigación de la microbiota intestinal humana, ya que existe similitud en la anatomía del tracto gastrointestinal con los humanos. Las diferencias entre la microbiota de los humanos y los modelos murinos pueden estar dadas por las diferencias en estructuras anatómicas y un pH diferente a lo largo del tracto digestivo, además de que la capa de mucosa es más gruesa en el colon de humanos que en ratas y ratones. Se ha reportado que los filos más abundantes de bacterias en humanos son *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, siendo también los filos más abundantes en estos modelos pero difieren en su composición. Sin embargo, los taxones encontrados comparten la capacidad de degradar fibras dietéticas, un ejemplo claro es la inulina que en humanos aumenta la abundancia relativa de *B. adolescentes* y *Faecalibacterium praunsnitzii* mientras que en ratas aumenta la abundancia de *Bacteroides uniformis*, *Blautia glucerasea*,

Clostridium indolis y *Bifidobacterium animalis* (Hillman y col., 2017; Pereira y Berry, 2017). El Cuadro 2 muestra los taxones más abundantes entre estas especies (Brooks y col 2003, Zoetandol y col., 2006; Hillman y col., 2017).

Cuadro 2. Principales taxones en la microbiota intestinal en humanos y modelos murinos (Brooks y col 2003, Zoetandol y col., 2006; Hillman y col., 2017).

	Humano	Rata	Ratón
Bacteria/ Géneros presentes	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
	<i>Clostridium coccooides-</i> <i>Eubacterium rectale</i> ↑	<i>Bacillus, lactobacillus,</i> <i>streptococcus</i> ↑	<i>Bacteroidetes</i>
	<i>Clostridium leptum</i> ↑	<i>Clostridium leptum</i>	
	<i>Veillonella</i>	<i>Clostridium coccooides</i>	
	<i>Eubacterium cylindroides</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	
	<i>Lactobacillus-</i> <i>enterococcus</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	
	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>	
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Bacteroides</i> y <i>Cytophaga</i> ↑	
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotellaceae</i>	
	<i>Bacteroides-Prevotella</i> ↑	<i>Rikenellaceae</i>	
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	
	<i>Bifidobacterium</i>		
	<i>Atopobium</i>		
	<i>Proteobacteria</i>		
<i>Enterobacteriaceae</i>			
<i>Verrucomicrobia</i>			
<i>Akkermansia</i>			
Archaea	<i>Methanobrevibacter</i> <i>Nitrososphaera</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobrevibacter</i>
Virus	<i>Herpesviridae</i> <i>Papillomaviridae</i> <i>Polyomaviridae</i> <i>Adenoviridae</i>	Variable	Variable
Hongos	<i>Candida</i> <i>Malassezia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Cladosporium</i>	<i>Ascomycota</i> <i>Basidiomycota</i> <i>Chytridiomycota</i> <i>Zygomycota</i>	<i>Ascomycota</i> <i>Basidiomycota</i> <i>Chytridiomycota</i> <i>Zygomycota</i>

2.9. Técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas

El ser humano tiene interacción directa con diversos microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, arqueas y virus, que residen en el interior o exterior de su cuerpo, llamados microbiota. Puede variar dependiendo al ambiente del huésped en estados de salud y enfermedad. Estos microorganismos pueden diferenciarse

en comensales, mutualistas y patógenos (Marchesi y Ravel, 2015; Alarcón-Cavero y col., 2016; Murray y col., 2017). Al conjunto de material genético, es decir el genoma, de los microorganismos que habitan en un ambiente definido se conoce como microbioma (Gill y col., 2006; Marchesi y Ravel, 2015). Un nicho es un conjunto de relaciones para una población de especies en particular en una comunidad determinada, es decir, la función de una especie dentro de una comunidad dada. Mientras que el hábitat es la respuesta distributiva de dicha especie a factores ambientales intercomunitarios (Whittaker y col, 1973). La complejidad de los conceptos ecológicos en la microbiología ha dado lugar al uso de términos específicos, por ejemplo, se habla de dimensiones bióticas para referir a las interacciones entre organismos y dimensiones abióticas cuando las interacciones son entre el organismo y su entorno. Entendiendo a cada especie individual en el sistema como un bionte, es decir un árbol, humano o bacteria. Entonces un holobionte, describe a una comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que se retroalimenta debido a las actividades y características de sus componentes. Mientras que hologenoma, es la suma total de los genomas componentes de un organismo eucariota, comprende el genoma del hospedero y su microbiota. La teoría del hologenoma postula que; a) Los microorganismos adquieren de su huésped un entorno protegido y rico en nutrientes, b) afectan la aptitud del holobionte y se ven afectados por él, c) la variación del hologenoma puede ser provocada por cambios en el genoma del huésped o en el microbioma y d) estas variaciones pueden transmitirse de generación en generación (Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2011; Guerrero y col, 2013; Cerqueda y Falcón, 2016)

Las técnicas moleculares para el análisis de comunidades microbianas se han ido desarrollando a partir de los objetivos de la investigación como: caracterización de la diversidad bacteriana de las muestras, enumeración de grupos de bacterias relacionados filogenéticamente, seguimiento o monitoreo de organismos o poblaciones específicos tanto cuantitativa como cualitativamente, así como identificación definitiva de bacterias aisladas. Existen dos herramientas esenciales para organizar la diversidad de la vida que son la taxonomía y la filogenia. La

taxonomía clasifica a los organismos basado en una jerarquía de nombres taxonómicos, para bacterias son tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya hasta millones de especies. La filogenia es una estimación de la historia evolutiva de los microorganismos y clasifica cada organismo por una serie de divisiones correspondientes a eventos estimados en los que un ancestro común más reciente se especiaba para formar dos especies hijas. El análisis filogenético de los datos puede permitir categorizar microorganismos no clasificados, probar hipótesis evolutivas sobre asociaciones de rasgos o características que impulsan las asociaciones de hábitat, y comprender mejor como difieren las comunidades bacterianas y como cambian con el tiempo, espacio y los tratamientos (Washburne y col., 2018). La Figura 3 muestra la clasificación general de las técnicas utilizadas para los análisis de comunidades bacterianas.

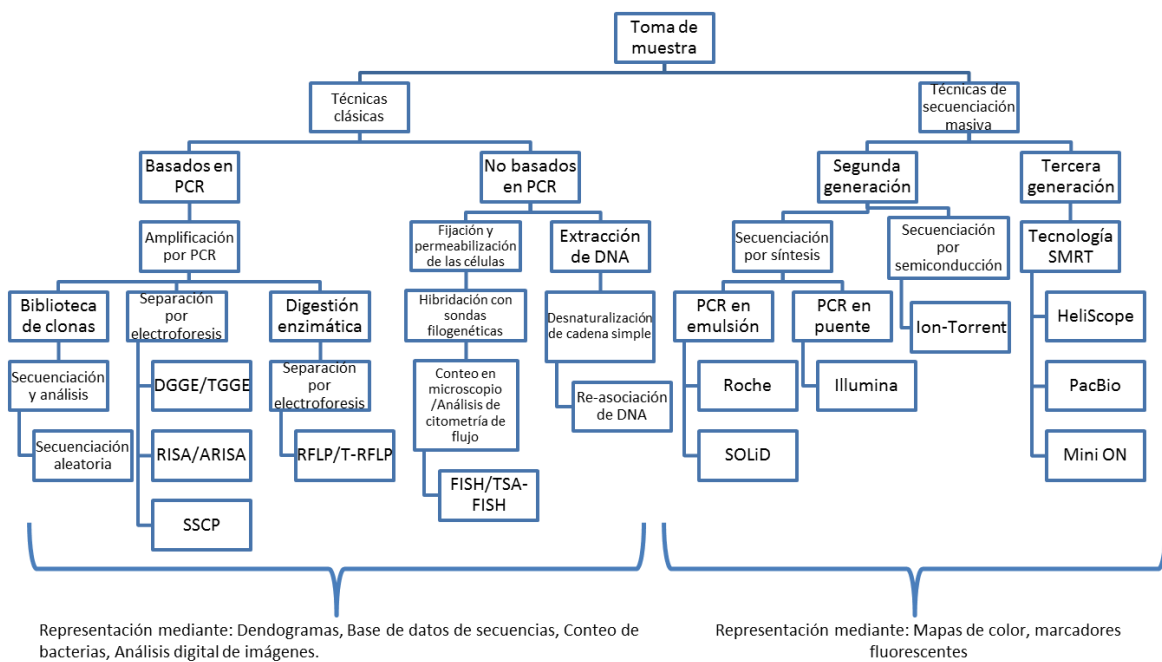


Figura 4. Técnicas moleculares para el análisis de comunidades bacterianas. (Díaz-Ruiz y Wachter-Rodarte, 2003; Doringo y col., 2005; Suárez-Moya, 2017.)

Las técnicas para el análisis de relaciones filogenéticas entre bacterias están basadas en el DNA y secuencias de nucleótidos, especialmente en genes que

codifican para las subunidades ribosómicas como 16S y 23S así como sus espacios intergénicos. La secuencia génica del ARNr 16S es la más ampliamente utilizada, este marcador se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como marcador eficiente de evolución además, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas (Díaz-Ruiz y Wachter-Rodante, 2003).

Bibliotecas de clonas de rDNA 16S: El primer paso en esta técnica es clonar los productos obtenidos de PCR, y posteriormente se realiza una secuenciación aleatoria a través de bases de datos de secuencias existentes (GenebankTM o EMBL) para identificar especies o similitud con especies ya conocidas (Dorigo y col., 2005; Nocker y col., 2007).

DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante), TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura): Se amplifican los genes que codifican el 16S rDNA y posteriormente se realiza una electroforesis en un gel de poliacrilamida. Los fragmentos obtenidos de DNA tienen la misma longitud pero difieren por lo menos en un nucleótido, pueden separarse por electroforesis a través de un gradiente lineal de desnaturalizantes químicos (urea y formamida) en DGGE o mediante un gradiente de temperatura lineal (TGGE). Inicialmente los productos se separan de acuerdo a su peso molecular y la desnaturalización produce la separación de las cadenas de DNA bicatenario. El comportamiento de fusión depende principalmente de la longitud del producto, su contenido de GC y la secuencia de nucleótidos (Dorigo y col., 2005; Nocker y col., 2007; Deng y col., 2008)

RISA (Análisis de espaciadores intergénicos ribosómicos) y ARISA (Análisis de espaciadores intergénicos ribosómicos automáticos): En este método se amplifican las regiones espaciadores transcritas intergénicas (ITS) localizadas entre los genes rDNA 16S y 23S. Los productos de la amplificación difieren en longitud y se separan mediante electroforesis en función de su tamaño y se

visualizan bajo tinción. En ARISA, se usa un cebador directo marcado fluorescentemente, que detecta los amplicones mediante electroforesis capilar automática. El número total de picos fluorescentes distintos en los datos de ARISA dentro de una muestra dada se toma como una estimación de la diversidad de especies, y los tamaños de los fragmentos se pueden comparar con los de la base de datos de GenBank (Dorigo y col., 2005; Nocker y col., 2007).

SSCP (Poliformismo de conformación de cadena única): Detecta las variaciones de secuencias entre los fragmentos de DNA, que generalmente son secuencias del gen 16s rDNA amplificadas por PCR. Posteriormente se realiza electroforesis para analizar los amplicones en función de su tamaño, la desnaturalización se realiza antes de cargar la muestra en el gel. La detección se lleva a cabo mediante tinción o se marcan fluorescentemente para ser detectados por un secuenciador de DNA automatizado (Dorigo y col., 2005; Nocker y col., 2007).

Polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP): El análisis del polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP) detecta las variaciones de secuencia entre los fragmentos de ADN, que generalmente son secuencias del gen rRNA 16S amplificadas por PCR. A bajas temperaturas, el ADN monocatenario adoptará una conformación tridimensional determinada por las interacciones intramoleculares que influyen en su movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Los fragmentos de PCR del mismo tamaño, pero con diferentes secuencias de nucleótidos se separarán debido a su diferente movilidad electroforética. Las diferencias en la movilidad se detectan en autorradiogramas (detección radiactiva), mediante tinción con plata de las bandas o análisis automatizado de alto rendimiento usando cebadores marcados fluorescentemente (Dorigo y col., 2005; Nocker y col., 2007).

RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción): Es un método simple basado en la digestión de restricción del DNA de la comunidad ribosomal amplificado por PCR seguido de separación electroforética de fragmentos de

restricción en alto porcentaje de agarosa o geles de acrilamida. El polimorfismo se basa únicamente en un parámetro, la longitud del fragmento. Un estándar de tamaño etiquetado con un fluoróforo diferente permite la asignación precisa de longitudes de fragmentos con una resolución de par de bases única (Dorigo y col., 2005; Nocker y col., 2007).

T-RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal): Es una técnica de toma de huellas dactilares de la comunidad que se basa en la digestión de restricción de los fragmentos de PCR marcados en el extremo fluorescente de doble cadena. Como regla general, una sola especie contribuirá con un solo fragmento terminal de un tamaño dado, aunque varias especies pueden tener fragmentos terminales de tamaño idéntico. Se realiza electroforesis en gel en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes o por electroforesis capilar, y se distinguen por detección fluorescente inducida por láser. Estos datos de fluorescencia se convierten en electroforegramas, en los cuales los picos representan fragmentos que difieren en tamaño, y las áreas debajo de los picos indican las proporciones relativas de los fragmentos (Dorigo y col., 2005; Nocker y col., 2007).

FISH (Hibridación fluorescente in situ), TSA-FISH (Amplificación de la señal de la tiramida de FISH): En la hibridación fluorescente *in situ* se utilizan sondas fluorescentes dirigidas a rDNA, se usa en microbiología para investigar la composición taxonómica general de comunidades bacterianas o ensamblajes. Las sondas pueden diseñarse para ser complementarias a sitios objetivo específicos de especie, grupo o reino. Las células se fijan para que sean permeables a la sonda, que luego hibrida con su sitio objetivo específico. Después de la hibridación, las comunidades microbianas son típicamente examinadas por microscopía epifluorescente. La TSA-FISH es la modificación de la técnica FISH, donde se aumenta la señal fluorescente de las células hibridadas 20-40 veces (Dorigo y col., 2005).

Re-asociación de DNA: En esta técnica se realizan comparaciones enteras de DNA entre dos comunidades o para estudiar la variedad de la secuencia de una sola comunidad. El DNA se extrae y se purifica. Se monitorea la cinética de re-asociación del DNA monocatenario desnaturalizado con secuencia homóloga, lo que refleja finalmente el tamaño del genoma o la complejidad del DNA. Cuanto mayor es el grado de similitud entre dos comunidades o hay mayor homología de secuencia de una sola comunidad, más rápido es el proceso de reagrupación y viceversa (Dorigo y col., 2005).

Las secuenciación del DNA para crear el primer borrador del genoma humano dio paso al desarrollo de nuevas tecnologías para la secuenciación masiva de DNA (Nikolaki y Tsiamis, 2013). Con un gen de referencia comprobado por los métodos clásicos y nuevas herramientas para el análisis de datos, se ha conseguido información sobre el microbioma humano, con un nivel de detalle sin precedente en cuanto a la taxonomía y función de los microorganismos.

La primera generación de técnicas de secuenciación surgió con el método de Sanger en el cual el uso de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) como terminadores de la cadena de DNA permite la secuencia de DNA directamente a partir de la placa de rayos X o de la imagen de gel (Suárez-Moya, 2017). La pirosecuenciación es un método de secuenciación de DNA basado en la monitorización en tiempo real de la síntesis de DNA, utiliza perlas y comienza con una sola molécula patrón, que se amplifica con PCR en emulsión (Nikolakiy y Tsiamis, 2013). A partir de este fundamento se desarrollaron técnicas de segunda y tercera generación (Nikolakiy y Tsiamis, 2013; Suárez- Maya, 2017):

Segunda generación

Roche: Aplica una técnica basada en la polimerización no fluorescente, que mide la liberación del pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas, que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido. La longitud de las lecturas generadas permite la secuenciación de *novo* de genomas.

SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection): Usa secuenciadores de “Applied Biosystems: Life Technologies” y obtiene la secuencia por ligación de octámeros marcados de secuencia conocida a la cadena de DNA, con la posterior detección de la señal fluorescente emitida tras cada ligación.

Illumina: Adapta la familia de secuenciadores Solexa, aplica también un método basado en la polimerización del DNA, donde la incorporación de un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena naciente impide que esta siga creciendo. Después de detectar la señal fluorescente se elimina el grupo protector que puede incorporar otro nucleótido marcado e inicial un nuevo ciclo.

Ion-Torrent: Se basa en una secuenciación con “chips” semiconductores. Detecta iones H^+ liberados por la polimerasa tras la incorporación de un nucleótido.

Tercera generación

Estas técnicas aplican la tecnología SMRT (single molecule real time sequencing) basada en la lectura de la hebra molde del DNA, llevando al límite los avances de la nanotecnología de las pequeñas moléculas. Las principales plataformas son:

HeliScope: desarrollada por Heliscos BioScience Corporation, está basada en la secuenciación a tiempo real de miles de millones de pequeñas moléculas únicas de DNA adheridas a una superficie sólida.

PacBio (Pacific Biosciences): Se basa en la detección de una sola molécula de DNA polimerasa trabajando de manera continua para obtener mayor velocidad. Con esta estrategia el equipo es tan sensible que es capaz de detectar la fluorescencia pegada a un solo nucleótido.

Mini ON (Oxford Nanopore): Es una de las más recientes tecnologías que permite secuenciar DNA y proteínas específicas por electricidad. Mide el cambio en la corriente resultante de las cadenas de DNA que interactúan con un nanoporo de proteína cargada.

La elección del método de análisis depende de la complejidad de la comunidad, la experiencia de personal en el laboratorio, la profundidad de análisis requerida, disponibilidad de instrumentación y limitaciones presupuestarias y de tiempo. Muchas técnicas de creación de perfiles comunitarios se utilizan junto con la secuenciación. Los métodos de perfil a menudo se usan para seleccionar y comparar rápidamente comunidades, pero la necesidad de identificar filogenéticamente a los miembros de la comunidad hace que la secuencia de señales individuales o de una biblioteca de clones sea inevitable (Nocker y col., 2007).

La recomendación general para "un buen análisis del rDNA 16S mediado por PCR a partir de muestras ambientales" consiste en estudios comparativos que incorporan diferentes estrategias de extracción de ADN, amplificación por PCR y clonación, con condiciones de replicación y PCR controlada. Para el refinamiento del protocolo se recomienda realizar la técnica por triplicado, que implica alícuota la muestra (McCartney, 2002). En esta investigación se utilizó la secuenciación de la región ITS 16S-23S, esta técnica ha sido útil para la identificación rápida para el estudio de cambios generales en la diversidad y adecuada para el análisis de estructuras de comunidades microbianas (Leblond-Bourget y col., 1996; Cardinale y Inchausti, 2004; Popa y col., 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

La FCL de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) presenta efecto citotóxico diferencial sobre líneas celulares de cáncer de colon, mientras que en pruebas *in vivo* ha mostrado efecto antitumorogénico temprano en ratas. Sin embargo, se ha encontrado que también se presentan efectos adversos como son la pérdida de la ganancia de peso corporal, la disminución en el consumo de alimentos en las primeras etapas de la administración, atrofia intestinal e hipertrofia pancreática, además de generar cambios en la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal genera metabolitos implicados en la regulación de la integridad intestinal, así como de protección. Se sabe que la administración de prebióticos en la dieta modifica la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta. Las agavinas, prebiótico clasificado como fructano tipo inulina, ha demostrado que al ser incluidas en la dieta aumenta la producción de ácidos grasos de cadena corta en todas las porciones del tracto digestivo, principalmente en la porción distal.

Por lo anterior, resulta importante estudiar el uso de agavinas para disminuir los efectos adversos causados por la administración de la FCL en ratas Sprague Dawley.

IV. HIPÓTESIS

La administración de agavinas disminuye los efectos adversos como pérdida de la ganancia de peso, disminución del consumo de alimento, atrofia intestinal y cambios de la microbiota intestinal provocados por la administración intragástrica de la FCL Tépari en tracto digestivo de ratas Sprague Dawley

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el uso de agavinas sobre los efectos adversos provocados por la FCL de frijol Tépari.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la administración de agavinas sobre el peso corporal y consumo de alimento en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari.
- Determinar el efecto de las agavinas sobre histología en intestino delgado y grueso en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari.
- Analizar los cambios en la microbiota fecal a partir de diferencias en regiones intergénicas ribosomales tras la administración de agavinas posterior al tratamiento de FCL en ratas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño de estudio

El diseño de estudio fue longitudinal, experimental y comparativo.

6.2. Obtención de la fracción concentrada en lectinas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*)

La semilla del frijol Tépari se obtuvo de la central de abastos de Hermosillo, Sonora. La fracción concentrada en lectinas obtenida del frijol Tépari se purificó en el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas del CINVESTAV Unidad Irapuato, mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. Los solventes empleados fueron de J.T. Baker. Las matrices para cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-75 fueron de Pharmacia.

Se obtuvo la FCL de acuerdo al método desarrollado por García-Gasca y col. (2012). Brevemente, se obtuvo la harina de frijol utilizando un molino Tekmar A-10, la cual fue desgrasada utilizando cloroformo y a una proporción 4:1 p/v 3 veces. Se pesaron 100 g de harina y se obtuvo el extracto crudo de proteína en 500 mL de agua desionizada agitado durante 12 h a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 32,000 g's durante 30 min. Se realizó precipitación al 40% de saturación de sulfato de amonio con agitación magnética lenta. El resultado se equilibró por 30 min a 4°C enseguida se centrifugó a 32,000 g's durante 1 h. Se obtuvo el sobrenadante y se llevó al 60% de saturación con sulfato de amonio que se centrifugó a 32,000 g's por 1 h. El precipitado se recuperó y se descartó el sobrenadante que fue disuelto en un volumen mínimo de agua desionizada y se dializó para eliminar total de sales presentes; posteriormente fue liofilizada y almacenada a -20°C hasta su uso. La FCL se obtuvo mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-75, fue liofilizada y almacenada a -20°C hasta su uso.

Utilizando una muestra de 1 mg de liofilizado/mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), se cuantificó el contenido de proteínas (Bradford, 1976) y se

determinó la actividad aglutinante (Jaffé, 1980). Brevemente, en una placa de 96 pozos se distribuyó muestra de la siguiente manera: en el pozo 1A se colocaron 100 µL de PBS; en el pozo 1B se colocaron 100 µL de una muestra de FCL con la concentración de proteína previamente conocida. A partir del pozo 2 hasta el pozo 12 de toda la placa se colocaron 50 µL de PBS. Posteriormente se realizaron las diluciones dobles seriadas. Finalmente se agregaron 50 µL de eritrocitos tipo A+ fijados en glutaraldehído en una concentración al 1% en cada pozo. Las placas se dejaron incubando durante 2 h a 37°C y se almacenaron en refrigeración durante 24 h para posterior observación al microscopio invertido al 10X. Se estableció la zona del centro y la parte inferior de cada pozo como punto de observación, con el fin de estandarizar y así evitar sub o sobre estimaciones. La actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa: alta actividad (+++), media (++) , baja (+) y nula (-). Estos resultados se cuantificaron mediante la ecuación:

$$AE = \frac{2^n}{mg}$$

Donde:

AE= Actividad específica aglutinante expresada en unidades por mg de proteína (U/mg)

n= Última dilución con aglutinación apreciable al microscopio

mg= Cantidad de proteína inicial.

Para poder obtener resultados más seguros, esta técnica cualitativa se repitió 5 veces por duplicado y se eliminaron valores extremos.

6.3. Obtención del agavinas

Las agavinas de alto grado de polimerización fueron donadas por el Laboratorio de Química y Productos Naturales del CINVESTAV Unidad Irapuato quien es responsable Dra. Mercedes López Pérez. Se prepararon en agua al 10%.

6.4. Modelo experimental *in vivo*

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 5 semanas de edad que se obtuvieron del Bioterio del INB-UNAM, Juriquilla. Se colocaron en jaulas individuales con ciclos de luz oscuridad 12 h por 12 h a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa entre 45% y 60% (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO, 1999; Protocolo de uso de animales de laboratorio FCN, 2015) y se les dio una semana de aclimatación. Se alimentaron con dieta para roedores de marca Rodent Lab Chow 5001 y agua *ad libidum*. Los animales fueron aleatorizados por peso en 4 grupos y se trataron según el grupo de estudio al que pertenecían, con la finalidad de evaluar la administración subcrónica de la FCL. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

Grupo control (n=6): Se les administró solución salina mediante cánula intragástrica cada tercer día durante 6 semanas a partir de la semana 3 del experimento, posteriormente fueron sacrificados.

Grupo FCL (n=6): Se les administró la FCL por vía intragástrica con dosis ajustada a 50 mg/kg de peso cada tercer día durante 6 semanas a partir de la semana 3 del experimento, posteriormente fueron sacrificados.

Grupo agavinas/FCL (Ag/FCL) (n=6): A partir de la semana 1 del experimento se les adicionó agavinas al 10% en agua solo durante 2 semanas, enseguida fueron administradas con FCL por vía intragástrica con dosis ajustada a 50 mg/kg de peso durante 6 semanas. Posteriormente fueron sacrificadas.

Grupo agavinas + FCL (Ag/Ag-FCL) (n=6): Se les adicionó agavinas al 10% en agua a partir de la semana 1 del experimento durante 2 semanas. Posteriormente se les administró la FCL por vía intragástrica con dosis ajustada a 50 mg/kg de peso cada tercer día, la suplementación de las agavinas continuó hasta el final del tratamiento y fueron sacrificados.

Cada grupo de estudio contuvo el número mínimo de animales para alcanzar significancia, el planteamiento de la metodología se diseñó de tal manera que no existiera duplicación innecesaria de experimentos. Los animales se sacrificaron por decapitación causando el dolor mínimo, este procedimiento fue realizado por personal capacitado bajo los procedimientos del protocolo de uso de animales de laboratorio FCN, 2015 y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.5. Evaluación de los efectos de la administración subcrónica de cada tratamiento

Las ratas fueron pesadas semanalmente durante el transcurso del experimento. El alimento se pesó una vez a la semana. Se colectaron las heces semanalmente y se almacenaron en tubos libres de nucleasas a -80°C para posterior análisis por PCR.

Después del sacrificio, las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos BD vacutainer® con EDTAK2, posteriormente se determinaron marcadores hematológicos en el analizador Sysmex modelo KX-21N. Los órganos fueron pesados y medidos, enseguida se fijaron en formaldehído al 10% para posterior análisis.

6.5.1. Análisis histológicos

En los intestinos (grueso y delgado) perfundidos con formaldehído al 10% se realizaron cortes macroscópicos de 1 cm aproximadamente. Posteriormente se realizaron cortes finos de grosor aproximado de 5 µm con un equipo micrótopo marca Leica. A continuación, la muestra fue montada en un portaobjetos adherido utilizando gelatina en agua caliente, se llevó a cabo la rehidratación y la tinción con hematoxilina-eosina y se llevó a cabo la medición, el análisis y la obtención de fotografías de las vellosidades intestinales utilizando un microscopio óptico VE-BC3 PLUS.

6.5.2. Análisis de cambios en la microbiota

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante un kit comercial de extracción (QIAamp DNA mini kit) con columnas de sílice, pero con algunas modificaciones que se mencionan a continuación. En un tubo eppendorf se pesaron 0.200 g de muestra, cada tubo contenía materia fecal de dos ratas (pool). La homogeneización y lisis celular de las muestras se realizó mediante acción química agregando 1 mL de buffer inhibitEX. Se agitó en vórtex hasta que la muestra se homogeneizó. En seguida se hizo una incubación a 70°C por 5 min. Posteriormente se centrifugó la muestra 1 min a 16,770 g's a temperatura ambiente. Se tomaron 600 µL del sobrenadante y se vertieron en un tubo eppendorf que contenía 15 µL de proteinasa K, para digerir las proteínas. Se añadieron 200 µL de buffer AL y se agitó en vórtex por 15 s, después se incubó la muestra a 70°C por 10 min, en este paso el DNA se unió a la membrana de sílica. A continuación se agregaron 200 µL de etanol, para purificar el DNA de cualquier proteína o compuesto fenólico que estuviera adherido al DNA. Se tomaron 600 µL de muestra y se realizó doble centrifugación 1 min a 16,770 g's a temperatura ambiente para quitar el etanol de la columna, ya que los residuos de etanol pueden inhibir la PCR. En seguida se llevaron a cabo dos lavados con buffer AW1 y AW2 del kit, se agregaron 500 µL de cada buffer. Se centrifugó la muestra 1 min con el buffer AW1 y con el buffer AW2 se realizó doble centrifugación de 1 y 3 min. Para finalizar, se agregaron 50 µL de buffer AE (solución de elución). Se centrifugó 1 min a 16,770 g's. El DNA pasó a través de la columna, obteniendo la muestra en un tubo eppendorf. Se realizaron pruebas de pureza e integridad mediante geles de agarosa al 0.7% y usando un espectrofotómetro NANODROP 2000c. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal a un voltaje constante de 70 V durante 45 min. Se colocaron 2 µL de cada muestra con 1 µL de buffer de carga (Red gel, marca Biotium). La visualización de los geles se llevó a cabo con luz UV mediante un foto documentador (Gel doc XR System, BioRad, Singapore).

La identificación de la diversidad microbiana se realizó mediante una modificación de la técnica molecular de RISA-PCR (Ribosomal InterSpace Analysis). Cada

reacción contenía un total de 10 μL , compuesta por los siguientes elementos: 4.38 μL de agua, 1 μL de buffer (10X), 1 μL de BSA (Albúmina de suero bovino) a 0.2% p/v, 0.8 μL de dNTP's (nucleótidos), 0.4 μL de oligonucleótidos ITSf sentido (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3), 0.4 μL de ITS ReubAntisentido (5'-GCCAAGGCATCCACC-3), 0.06 μL de enzima Taq (TAKARA) y 2 μL de DNA previamente extraído de cada muestra, a una concentración de 5 ng/ μL . El ciclo de amplificación se realizó en un termociclador punto final (Bio Rad c1000, singapore) de acuerdo a lo descrito por Cardinale y col (2004). La desnaturalización inicial fue de 94° C por 3 min, con 35 ciclos de desnaturalización de 94° C por 45 s, alineación de 55° C por 1 min y extensión de 72° C por 2 min, la extensión final fue a 72° C durante 7 min.

La visualización de los productos de la PCR se realizó en geles de agarosa al 3%. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal a un voltaje contante de 70 V durante 90 min. Se colocaron 5 μL de cada muestra con 2 μL de buffer de carga (Red gel, marca Biotium). La visualización de los geles se llevó a cabo con luz UV mediante un foto documentador (Gel doc XR System, BioRad, Singapore). El análisis de las bandas de los geles fue con el programa Quantity One, en el cual se obtuvo un perfil de bandas y una matriz binaria la cual se analizó en el software Phylip versión 3.6 para hacer la comparación entre tratamientos.

6.6. Análisis estadístico

Se realizaron ANOVA de medidas repetidas para las variables continuas (consumo de alimento, ganancia de peso, altura de vellosidades) por tratamiento, con una significancia estadística de $p \leq 0.05$ mediante el programa SPSS versión 23. El análisis para los cambios de microbiota fue mediante árbol filogenético y se utilizó el software Quantity One y Phylip versión 3.6.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Determinación de la actividad aglutinante

Se utilizó una curva patrón con albúmina ($y = 1405x + 15.915$) para determinar la concentración de proteína de la una muestra de FCL 1:1 en PBS. El resultado fue 321.3 μg de proteína/mL. La actividad aglutinante promedio fue de 4,000 UA/mg de proteína.

7.2. Experimento *in vivo*.

7.2.1. Peso y consumo de alimento

Los cambios para la ganancia de peso corporal se muestran en la Figura 5. No se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre grupo control y el tratado con la FCL. Alatorre-Cruz y col. (2017) observó que en ratas jóvenes administradas con FCL no hay pérdida de la ganancia de peso, en contraste con lo reportado por Ferriz-Martínez y col. (2015), quienes encontraron un 10% de pérdida en la ganancia de peso. Los grupos que consumieron agavinas presentaron menor ganancia de peso en comparación con el grupo control y el tratado con FCL, principalmente en las últimas semanas. El cambio en el peso puede estar relacionado con la disminución del consumo de alimento (Figura 6), el consumo de agua no se vio afectado (Figura 7). Se ha observado que las agavinas disminuyeron la ganancia de peso en un modelo de osteoporosis y promovieron la pérdida de peso corporal en ratones con sobrepeso (García-Vieyra y col., 2014; Huazano y López, 2015). Lo anterior se sugiere esté relacionado con la inducción de hormonas implicadas en la regulación del apetito, lo que sugiere que en las ratas estudiadas pudo provocar el mismo efecto.

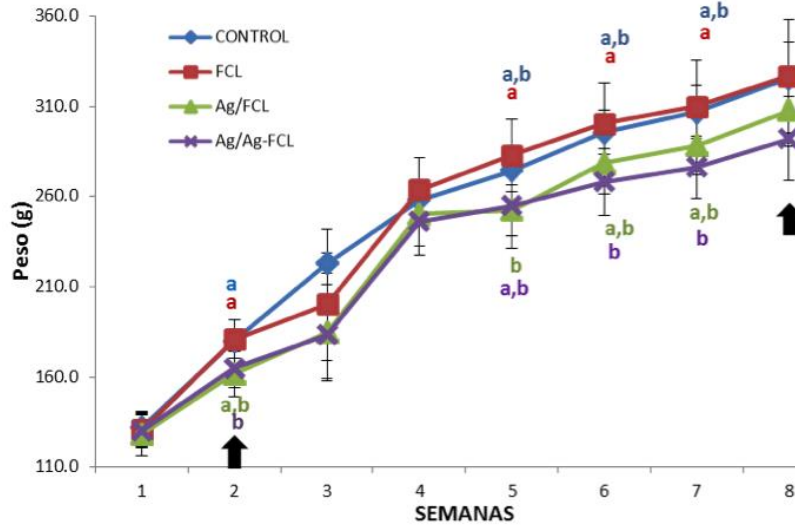


Figura 5. Efecto de la administración de agavinas sobre el peso corporal en ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. Las fechas negras indican el inicio y final del tratamiento con FCL o sus vehículos. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

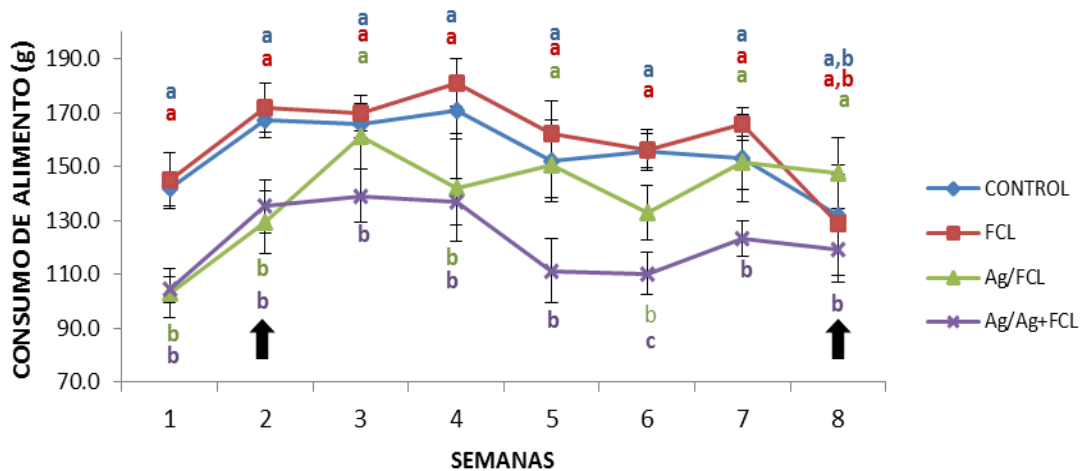


Figura 6. Efecto de la administración de agavinas sobre el consumo de alimento en ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. Las fechas negras indican el inicio y final del tratamiento con FCL o sus vehículos. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

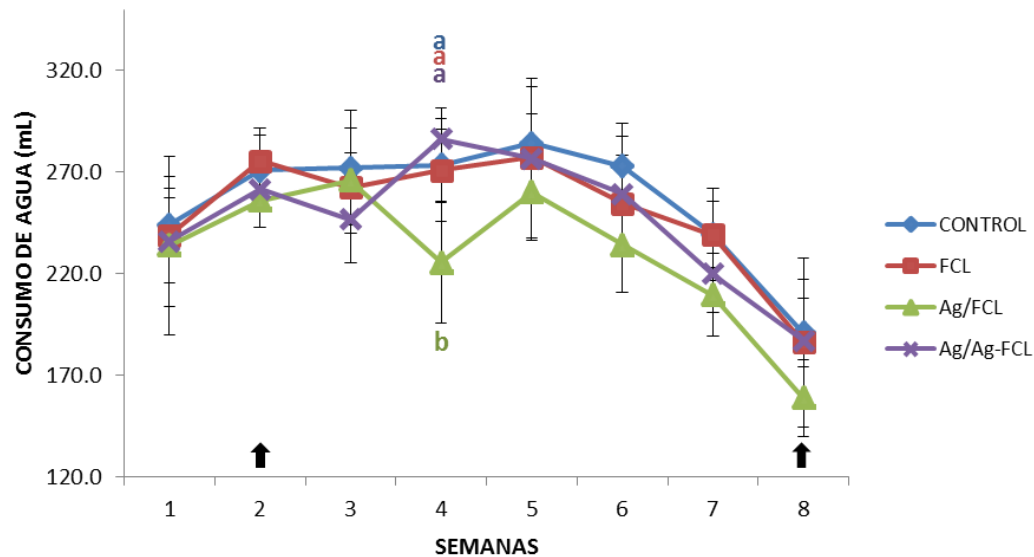


Figura 7. Efecto de la administración de agavinas sobre el consumo de agua en ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. Las flechas negras indican el inicio y final del tratamiento con FCL o sus vehículos. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

En el caso del peso y longitud de los órganos de las ratas del grupo administrado con FCL, se observó aumento no significativo del peso del intestino delgado (Figura 8). Alatorre-Cruz y col. (2018) reportaron que el intestino delgado aumentó de peso debido a un posible mecanismo de compensación que se activa por la atrofia intestinal causada por la FCL. Este aumento de peso también se ha reportado tras la administración de lectinas de leguminosas en ratas (Leiner, 1994). En el grupo que consumió agavinas durante todo el experimento se observó menor peso del intestino delgado ($p < 0.05$) pero mayor longitud, lo que sugiere que las agavinas causan este efecto considerando que la producción de metabolitos generados por la fermentación de prebióticos participa en el mantenimiento de la integridad epitelial (Xiao y col., 2015).

Resultados previos han mostrado que la administración de FCL provoca aumento en el peso e hipertrofia del páncreas, dado que la atrofia intestinal anteriormente

reportada pudiera aumentar el tamaño del páncreas y a su vez el peso (Alatorre-cruz y col., 2018). Las lectinas de leguminosas aumentan la secreción exógena pancreática, resultando en aumento de tamaño del páncreas (Leiner, 1994; Bardocz y col., 1995; Li y col., 2003). En el hígado se presentó aumento de peso en el grupo tratado con la FCL, pero no se encontró diferencia significativa (datos no publicados). Las lectinas de leguminosas aumentan el peso del hígado como consecuencias de la hiperactividad metabólica en el tracto intestinal, dependiendo del tiempo de exposición y la dosis (Bardocz y col., 1995). Por otra parte, en los grupos que consumieron agavinas se observó menor peso del hígado. Se sabe que las agavinas disminuyen la producción de triglicéridos y colesterol en hígado (Huazano-García y López, 2015) lo cual puede disminuir su peso.

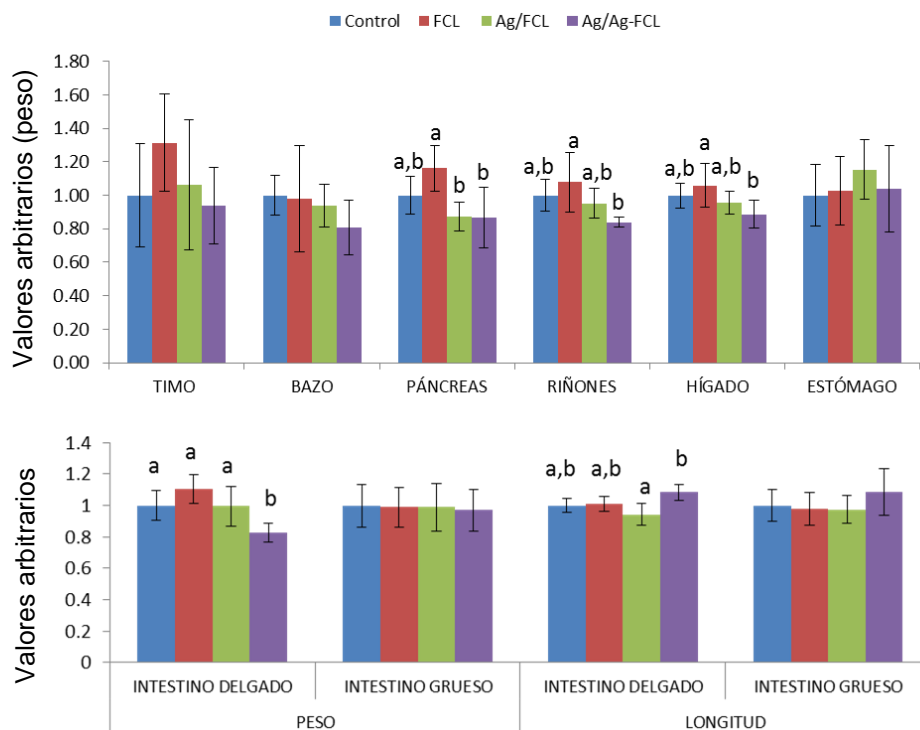


Figura 8. Efecto de la administración de agavinas sobre peso y longitud de los órganos de ratas tratadas con la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. El peso y longitud de los órganos se ajustaron al peso corporal individualmente y se normalizaron con respecto a la media del grupo control. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

En cuanto a los marcadores hematológicos (Cuadro 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre grupos. Estos resultados concuerdan con los datos reportados al evaluar la tolerancia de la FCL en ratas (Ferriz-Martínez y col., 2015).

Cuadro 3. Marcadores hematológicos después del tratamiento con fracción concentrada en lectinas

Parámetro en sangre	CONTROL	FCL	Ag/FCL	Ag/Ag-FCL
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.4 ± 1.2	8.2 ± 2.2	8 ± 1.5	8.74 ± 2.8
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.2 ± 0.4	8.3 ± 0.3	8.5 ± 0.3	8.5 ± 0.3
Hemoglobina (g/dL)	16 ± 0.7	16 ± 0.6	16.5 ± 0.6	16.4 ± 0.5
Hematocrito (%)	44.7 ± 1.9	45 ± 1.8	47 ± 1.4	47 ± 1.3
VCM (fL)	54.7 ± 1.8	54.3 ± 0.8	55.5 ± 1.1	55.3 ± 1.4
HbCM (pg)	19.5 ± 0.5	19.1 ± 0.3	19.5 ± 0.4	19.3 ± 0.6
CHbCM (g/dL)	35.8 ± 0.3	35.2 ± 0.3	35.1 ± 0.7	35 ± 0.6
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	687 ± 167.7	727 ± 167.7	794.5 ± 100.3	855.4 ± 72.5
Linfocitos (%)	83.9 ± 4.4	85.7 ± 1.8	84.3 ± 4.9	83.46 ± 1.5
# Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.3 ± 1.2	7 ± 1.9	6.8 ± 1.4	7.3 ± 2.5

No se encontró diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $p < 0.05$).

VCM, volumen corpuscular medio; HbCM, hemoglobina corpuscular media; CHbCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL.

7.2.2. Histología en intestino delgado y grueso

En el análisis realizado en cortes de intestino delgado mostró disminución de la altura de las vellosidades y aumento de la profundidad de las criptas en el grupo tratado con FCL en duodeno. Los grupos que consumieron agavinas mostraron menor daño (Tukey, $p < 0.05$). El grupo que consumió agavinas previamente al tratamiento de la FCL presentó recuperación en la altura de vellosidades, mientras

que el grupo que consumió agavinas durante todo el tratamiento con FCL mostró recuperación en la profundidad de las criptas (Figura 9). En el análisis histológico del yeyuno (Figura 10) e íleon (Figura 11) se encontró el mismo patrón. El daño ocasionado por la FCL en el intestino delgado ha sido reportado anteriormente y es reversible al suspender el tratamiento de la FCL (Alatorre-Cruz y col., 2018) así como con otras lectinas de leguminosa (Bardocz y col., 1995).

En el caso de los grupos que fueron tratados con FCL, la arquitectura del intestino delgado en sus diferentes secciones (duodeno, yeyuno e íleon) se vio comprometida debido a la atrofia caracterizada por vellosidades ensanchadas y fusionadas. Se observó infiltración leve de células inflamatorias y leucocitos en la capa de la mucosa. Es importante mencionar que la presencia de leucocitos fue local, ya que en marcadores hematológicos no se encontraron cambios significativos. No se encontró pérdida de células caliciformes, lo que indicaría gravedad de la inflamación intestinal (Erben y col., 2014). La importancia de las células caliciformes radica en que son encargadas de generar moco y glicoproteínas conocidas como mucinas. Las mucinas ayudan a neutralizar los ácidos producidos por el estómago y lubrican el epitelio para facilitar el paso de los alimentos (Kim y Ho, 2010). Esta es una respuesta descrita por lectinas de leguminosas que reconocen carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos de la membrana del intestino a los cuales se adhieren, lo que genera hiperplasia de las células de las criptas, por tanto, pueden unirse a las células caliciformes e inducir sobreproducción del moco. Estos cambios son dependientes de la dosis y tiempo de exposición a las lectinas (Leiner, 1994; Bardocz y col., 1995; Li y col., 2003).

En cuanto a los grupos que consumieron agavinas, también se encontró atrofia intestinal, sin embargo, en menor grado. Se ha reportado que el consumo de prebióticos aumenta poblaciones bacterianas específicas, generalmente *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* ssp, que generan metabolitos encargados del mantenimiento de la integridad intestinal, principalmente ácido butírico que actúa como un combustible respiratorio y regulador del crecimiento celular (Wang y Gibson, 1993; García-Curbelo y col., 2015)

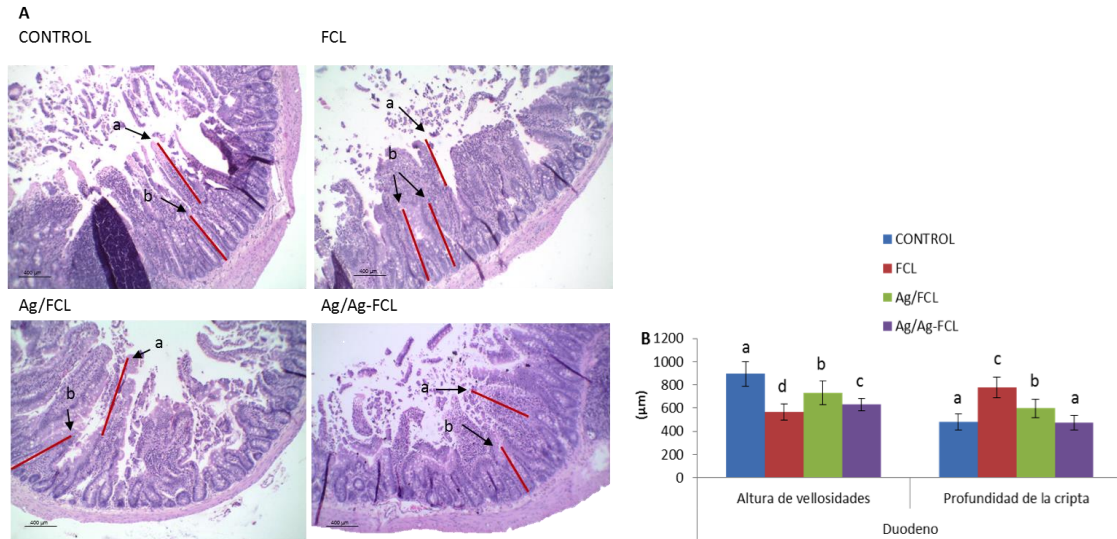


Figura 9. Análisis histológico del duodeno. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. A) Micrografías de duodeno 10x de ratas con los diferentes tratamientos que muestran (a) altura de vellosidades y (b) profundidad de criptas. B) Análisis cuantitativo de altura de vellosidades y profundidad de las criptas. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

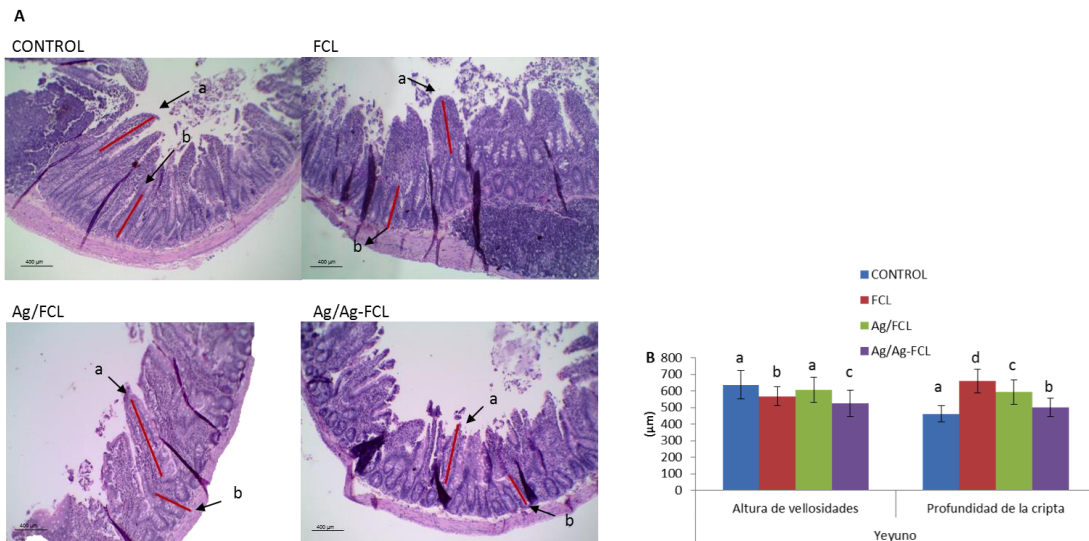


Figura 10. Análisis histológico del yeyuno. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. A) Micrografías de yeyuno 10x de ratas con los diferentes tratamientos que muestran (a) altura de vellosidades y (b) profundidad de criptas. B) Análisis cuantitativo de altura de vellosidades y profundidad de las criptas. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

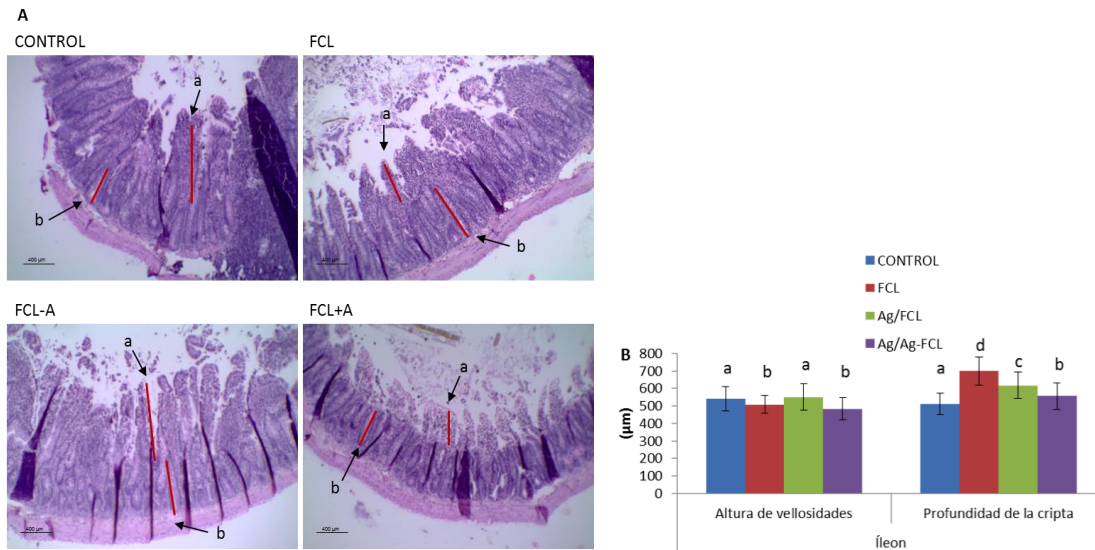


Figura 11. Análisis histológico del íleon. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. A) Micrografías de íleon 10x de ratas con los diferentes tratamientos que muestran (a) altura de vellosidades y (b) profundidad de criptas. B) Análisis cuantitativo de altura de vellosidades y profundidad de las criptas. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

El análisis histológico del intestino grueso mostró que la FCL generó disminución de la profundidad de las criptas en comparación con el grupo control (Tukey, $p < 0.05$). El grupo que consumió agavinas previamente al tratamiento con lectinas y el grupo que consumió agavinas durante el tratamiento con lectinas en colon ascendente no mostraron diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$) respecto al control, lo que sugiere que el consumo de agavinas disminuyó el daño. En el colon transversal los tres grupos tratados de la FCL mostraron disminución de la profundidad de las criptas respecto al grupo control. En el colon descendente, el grupo tratado con la FCL también mostró daño sin que se viera revertido por el consumo de agavinas. Únicamente se observó aumento de la profundidad de las criptas en el grupo que consumió agavinas antes del tratamiento con la FCL sin ser estadísticamente significativo respecto al grupo control (Figura 12).

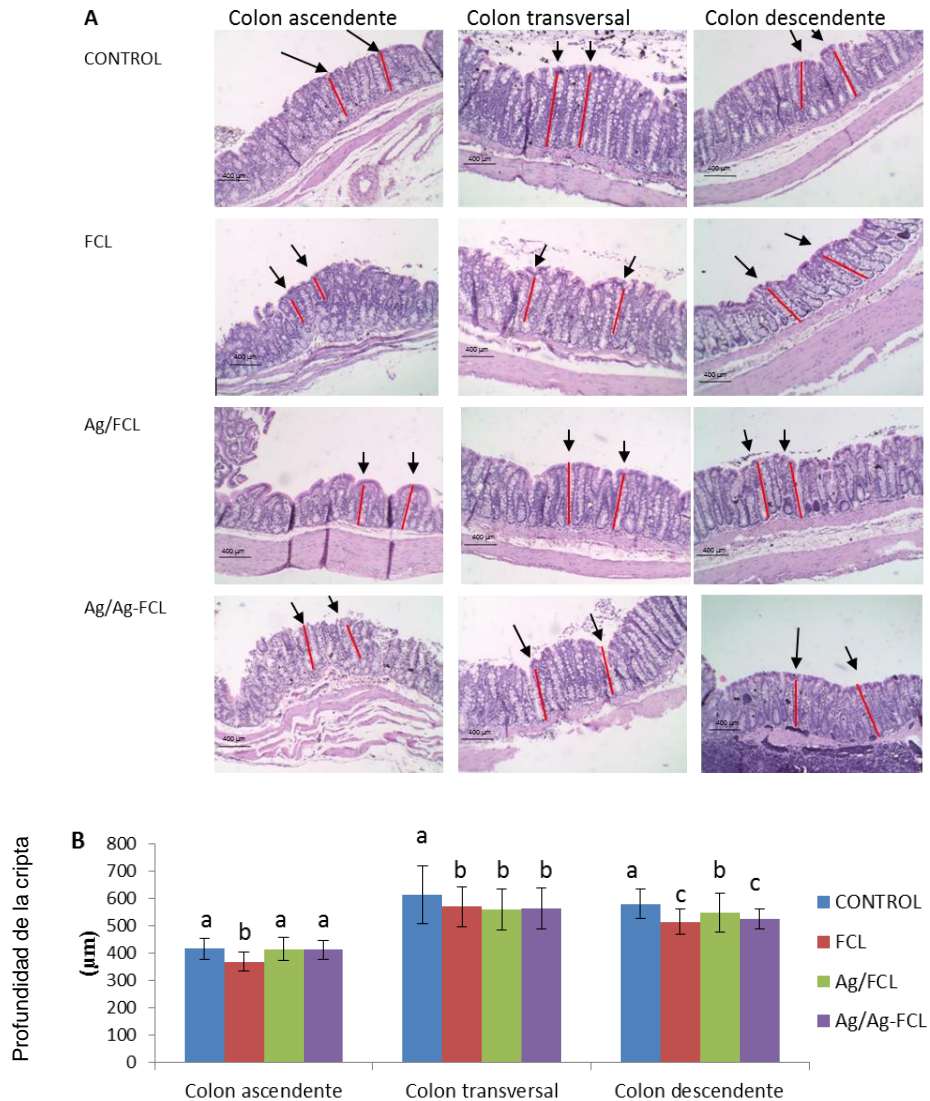


Figura 12. Análisis histológico del intestino grueso. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. A) Micrografías de las diferentes secciones del intestino grueso 10x de ratas con los diferentes tratamientos. Las flechas indican la profundidad de la cripta. B) Análisis cuantitativo de la profundidad de las criptas. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey, $p < 0.05$).

Un aumento en la profundidad de las criptas es característico de hiperplasia moderada debido a un aumento de células epiteliales en inflamación intestinal grave (Erben y col., 2014). En las porciones estudiadas del colon todos los grupos tratados con FCL no se observó aumento en la profundidad de las criptas por lo que fue importante analizar la arquitectura del tejido. En los cortes histológicos se

observó infiltración mínima de células inflamatorias en el área de la lámina propia, esto se podría describir como respuesta a la inflamación reportada previamente por la FCL (Ferriz-Martínez y col., 2015). También se encontró hiperplasia mínima, se observó un ligero aumento de células caliciformes, lo que podría aumentar la secreción de moco como mecanismo compensatorio para mantener la integridad de las capas protectoras. Se ha descrito que la inducción de células caliciformes, así como la síntesis y secreción de mucina son característicos de infección intestinal aguda (Kim y Ho, 2010). La administración de FCL generó un cambio en la estructura celular epitelial del intestino más no en la capa submucosa ni en la muscular. Es importante mencionar que, aunque se presentó atrofia intestinal por el tratamiento con la FCL, no se reflejó en la ganancia de peso de las ratas. Lo que supone que, en edades tempranas, si bien podría disminuir la absorción de nutrientes, la tasa de crecimiento de las ratas no se ve afectada.

Por otra parte, en los grupos que consumieron agavinas se encontró disminución parcial del daño causado por la FCL. Es probable que las agavinas hayan sido metabolizadas en su totalidad en porciones anteriores al colon, por lo que ya no alcanzaron a llegar a porciones distales o probablemente la microbiota presente en el intestino grueso no esté lo suficientemente desarrollada para aprovechar las agavinas que alcanzan a llegar a la porción distal del intestino grueso y, por lo tanto, no se generaron los metabolitos necesarios para mantener la integridad intestinal. Particularmente se esperaba mayor recuperación en el grupo que consumió agavinas antes y durante el tratamiento con la FCL, posiblemente se necesite más tiempo de acondicionamiento a las agavinas. Si bien no se ha reportado toxicidad al consumir fructooligosacáridos, se sabe que pueden provocar síntomas gastrointestinales que van desde flatulencias, distensión abdominal hasta diarreas que son dependientes de la dosis y microbiota intestinal presente al inicio de la exposición (Roberfroid, 2000). Estos mecanismos deben ser estudiados en futuras investigaciones.

7.2.3. Cambios en la microbiota

La microbiota puede ser modificada por diferentes factores entre ellos la edad. Este cambio se observó en el grupo control entre las diferentes semanas de experimentación. El tratamiento con FCL disminuyó notablemente las bandas en el perfil bacteriano (Figura 13). Durante las dos semanas de consumo de agavinas se encontró aumento la diversidad de la microbiota sin embargo, una vez que comenzó el tratamiento con FCL, la diversidad bacteriana disminuyó (Cuadro 4).

Cuadro 4. Reporte total de bandas del perfil bacteriano por semanas de tratamiento con la FCL (Quantity One).

	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6
Control	13	12	10	10
FCL	13	8	8	7
Ag/FCL	15	14	13	9
Ag/Ag-FCL	15	15	13	11

FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL.

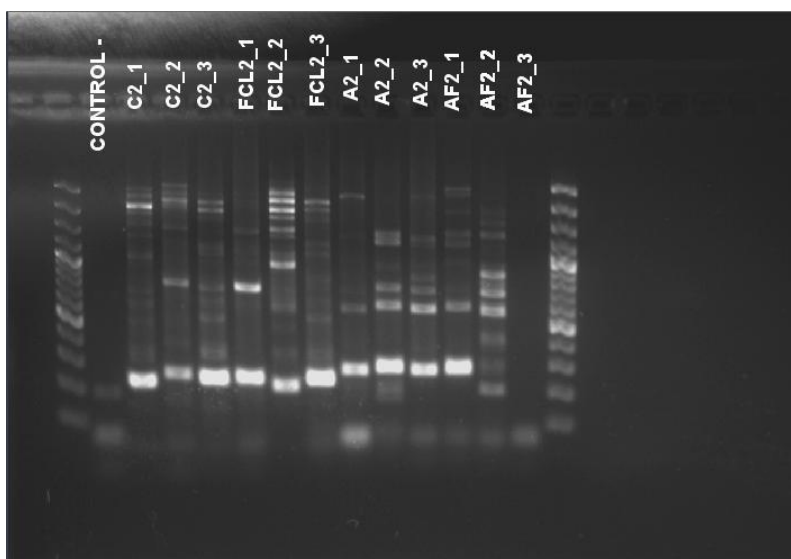


Figura 13. Perfil electroforético de DNA bacteriano de los pools de ratas por semanas. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL.

Los cambios de los perfiles bacterianos fueron dependientes de la dieta de las ratas, dado que el grupo control y el grupo tratado con la FCL presentan cambios agrupados durante las semanas de experimentación (Figura 14). Los cambios de la microbiota en los grupos que consumieron agavinas se encontraron agrupados independientemente si consumieron agavinas antes del tratamiento con la FCL o antes y durante el tratamiento con la FCL. Se encontró que el perfil bacteriano se mantuvo por tratamiento a lo largo del tiempo de experimentación, si bien se encontraron pequeños cambios entre semanas, se atribuye a la edad del animal. Estas modificaciones pueden estar relacionadas con los efectos adversos generados por la FCL en la estructura del epitelio intestinal.

Se ha observado que lectinas de frijol común inducen el crecimiento de *Escherichia coli*, bacteria que al aumentar su población puede ser perjudicial para la salud del huésped. El aumento de *Escherichia coli* fue suprimido al administrar lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa sin embargo, los efectos adversos en el epitelio del intestino delgado no se modificaron (Pusztai y col., 1993). Bacterias lácticas, consideradas probióticos, pueden unirse a lectinas de leguminosas disminuyendo sus efectos adversos (Badot y col., 2016). Debido a sus características estructurales, muchos oligosacáridos de cadena ramificada pueden unirse a lectinas de leguminosas (Pan y col., 2018). Si bien puede haber interacción entre lectinas, agavinas y poblaciones bacterianas, la atrofia intestinal presente en los grupos administrados con la FCL en esta investigación, podría sugerir que la afinidad de las lectinas de frijol Tépari es mayor por sus sitios de unión en las células epiteliales intestinales que la afinidad a las agavinas. Sin embargo, en el presente estudio no se revisó ningún sitio de unión de alguna bacteria con lectinas o agavinas por lo que se propone analizarlo en futuras investigaciones.

Las agavinas, así como otros fructooligosacáridos, estimulan selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas en la microbiota intestinal, principalmente de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. A su vez, reducen los niveles de poblaciones bacterianas que al aumentar drásticamente pueden resultar

perjudiciales, en ello reside su importancia como prebióticos (Gomez y col., 2010; Moreno-Vilet y col., 2014; Pan y col., 2018). Los oligosacáridos, en general, se describen por mejorar la estructura y función de la mucosa, así como proteger la integridad de la estructura intestinal, modular la inmunidad y moderar la microbiota intestinal (Pan y col., 2018). El consumo de agavinas puede propiciar estas funciones benéficas para la salud del huésped, mecanismo que sugiere la disminución del daño causado por la administración de FCL. No obstante la técnica de RISA-PCR realizada no es específica para familias y grupos de bacterias, por lo que se propone realizar PCR-cuantitativo de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* para analizar los cambios al adicionar agavinas y/o lectinas de frijol Tépari. También se puede realizar secuenciación masiva para analizar otros cambios en géneros y familias de bacterias que pudieran dar mayor explicación a los resultados aquí reportados.

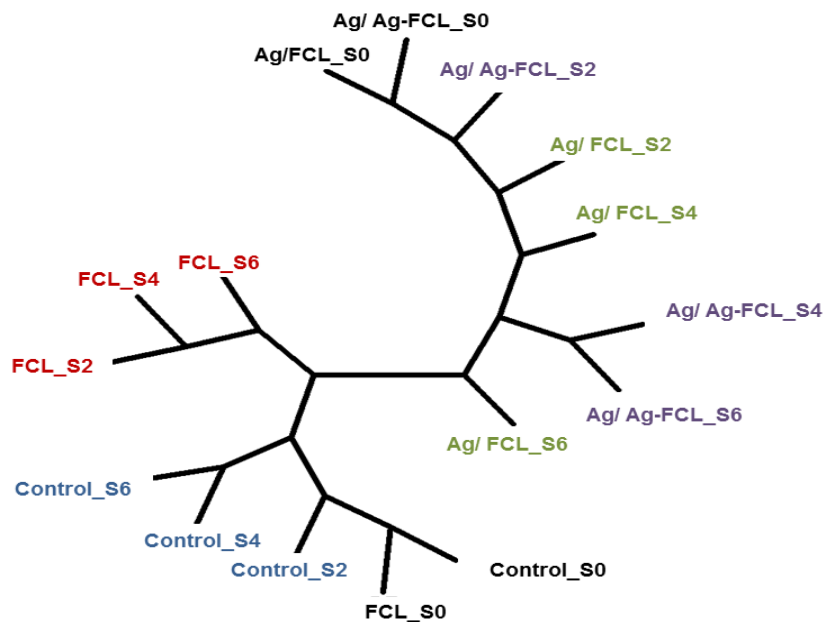


Figura 14. Dendrograma (UPGMA) de los perfiles de bandas bacterianas de los pools de ratas, por semanas. FCL, Fracción concentrada en lectinas; Ag/FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas y posteriormente tratadas con FCL; Ag/Ag-FCL, Grupo administrado previamente con agavinas durante 2 semanas sin suspender administración durante el tratamiento con FCL. Los números seguidos del nombre grupo indican la semana evaluada con base al tratamiento con la FCL (PHYILIP 3.6).

Otro mecanismo que puede explicar los cambios en la microbiota, es la producción de ácidos grasos de cadena corta. Dietas suplementadas con lectinas de leguminosas aumentan el contenido de ácidos volátiles en intestino, lo que indica aumento de la actividad microbiana intestinal (Schulze y col., 1995). Por su parte, los fructooligosacaridos aumentan especialmente la producción de ácido butírico, el cual es la principal fuente de energía de los colonocitos, regula el crecimiento y diferenciación celular (Wang y Gibson, 1993). En ratas que consumieron fructanos de agave de alto grado de polimerización se encontró un aumento en la concentración de ácido acético y butírico. El ácido butírico también es utilizado por las células encardas de liberar GLP-1 además, disminuye la producción de leptina, hormona que regulan la ingesta de alimentos (García-Curbelo y col., 2015; Huazano-García y López, 2015). El resultado de la fermentación de carbohidratos depende de varios factores como su estructura, composición química y microbiota presente en el intestino. Será importante caracterizar los géneros de microbiota intestinal y la producción de ácidos grasos de cadena corta en el presente modelo de estudio.

VIII. CONCLUSIONES

Las agavinas disminuyeron la ganancia de peso como consecuencia de la disminución del consumo de alimento, mientras que en las ratas tratadas con FCL no hubo disminución en la ganancia de peso, sin embargo, se encontró atrofia intestinal.

Los cambios en los perfiles bacterianos fueron dependientes de la edad y el tratamiento. El perfil bacteriano cambió tras la administración de la FCL, observado como una reducción de bandas electroforéticas, así como un perfil distinto en el dendograma. Por su parte, la administración de agavinas cambió el perfil bacteriano respecto al control y al tratamiento con la FCL.

La atrofia intestinal, caracterizada por la disminución en la altura de vellosidades y aumento de la profundidad de las criptas en intestino delgado y disminución de la profundidad de las criptas en intestino grueso, fue menor en los grupos que consumieron agavinas, principalmente antes del tratamiento con la FCL. Se sugiere que este resultado está relacionado con los cambios en la microbiota y posiblemente a un aumento en la producción de metabolitos. Por lo que, los efectos adversos generados en el intestino por el tratamiento de la FCL disminuyeron con las agavinas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón-Cavero T, D'Auria G, Delgado-Palacios S, Del Campo Moreno R, Ferrer-Martínez M. 2016. Microbiota. S9. Del Campo Moreno R (Coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Alatorre-Cruz JM, Pita-López W, López-Reyes RG, Ferriz-Martínez RA, Cervantes-Jiménez R, de Jesús Guerrero Carrillo M, Vargas PJA, López-Herrera G, Rodríguez-Méndez AJ, Zamora-Arroyo A, Gutiérrez-Sánchez H, de Souza TR, Blanco Labra A, García-Gasca T. 2018. Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical Evaluation. *Toxicology Reports*. 5: 56-64.
- Atlas de histología vegetal y animal de la universidad de Vigo. España. 2016. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-delgado.php>
- Bäckhed F, Ley R, Sonnenburh J, Peterson D, Gordon J. 2005. Host-Bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307(5717): 1915-1920.
- Badot JD, Argañaraz-Martínez E, Lorenzo-Pisarello MJ, Apella MC, Perez Chaia A. 2016. Cytotoxic damage of soybean agglutinin on intestinal epithelial cell of broiler chicks: *in vitro* protection by *Bifidobacterium infantis* CRL1395. *FEMS Microbiology Letters*. 363(12): 1-7.
- Bardocz G, Grant G, Pusztai A. 1996. The effect of phyhaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. *British Journal of Nutrition*. 76: 613-626.
- Bardocz S, Grant G, Ewen SWB, Duguid TJ, Brown DS, Englyst K, Pusztai A. 1995. Reversible effect of phytohemagglutinin on the grow and mechanism of rat gastrointestinal tract. *Gut*. 37(3):353-360.

- Barker N. 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15 (1): 19-33.
- Blaut M, Clavel T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*. 137: 751S- 755S.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brooks SPJ, McAllister M, Sandoz M, Kalmokoff ML. 2003. Culture-independent phylogenetic analysis of the feed flora of the rat. *Canadian Journal of Microbiology*. 49(10): 589-601.
- Cardinale B, Inchausti P. 2004. Effects of species diversity on the primary productivity of ecosystems: extending our spatial and temporal scales of inference. *Oikos*. 104: 437-450.
- Castillo A, Abdullaev F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica*. 57(1): 55–64.
- Cerqueda-García D, Falcón LI. 2016. The niche construction and the holobiont concept, toward the restructuring of a paradigm. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87: 239-241.
- Chassard C, Lacroix C. 2013. Carbohydrates and the human gut microbiota. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 16(4): 453-460.
- Cigarran S, González E, Cases A. 2017. Microbiota Intestinal en la enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 37(1): 9-19.
- Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaching for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69(5):1052S-1057S.

- Czerwinski J, Leontowicz H, Leontowicz M, Gralak MA. 2005. Response of rats to a moderate intake of soyabean lectin. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 14: 537- 540.
- De Vrese M, Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 111:1-66.
- Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M. 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports*. 35(2): 265-274.
- Díaz-Ruiz, Wacher-Rodarte. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana de Microbiología*. 45(1-2): 30-40.
- Domínguez-Vergara AM, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont Montfort. 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59 (4): 358-368.
- Dorigo U, Volatier L, Humbert JF. 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*. 39(11): 2207-2218.
- Elizalde AD, Porrilla YP, Chaparro DC. 2009. Factores antinutricionales en semillas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 7(1): 45-54.
- Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spiecker mann S, Haller D, Heimesoat MM, Zeitz M, Siegmund B, Köhl AA. 2014. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 7(8): 4557-4576.
- Ferriz-Martínez R, García-García K, Torres-Arteaga I, Rodríguez-Mendez A J, Guerrero-Carrillo M de J, Moreno-Celis U, Ángeles-Zaragoza MV, Blanco-Labra A, Gallegos-Corona MA, García OP, García-Gasca T. 2015. Tolerability assessment of a lectin

fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. Toxicology Reports. 2: 63–69.

Ferriz-Martínez RA, Torres-Arreaga IC, Blanco-Labra A, Garcia-Gasca T. 2010. New Approaches in the Treatment of Cancer, Mejia Vazquez C. (editora). Nova Science Publisher, inc. México, pp.71-89.

Ferriz-Martínez RA. 2015. Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol Tépari (*phaseolus acutifolius*) sobre cáncer de colon. Tesis para obtener grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

García-Curbelo Y, Bocourt R, Savón LL, García-Vieyra MI, López MG. 2015. Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: An animal model. Food & Function. 6: 3177-3182.

García-Gasca T, García-Cruz M, Hernandez-Rivera E, López-Matínez J, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Rodríguez-Mendez AJ, Mendiola-Olaya E, Castro-Guilén JL, Blanco-Labra A. 2012. Effects of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and semipure lectin fractions on cancer cells. Nutrition and Cancer. 64(8): 1269–78.

García-Vieyra MI, Del Real A, López MG: 2014. Agave fructans: Their effect on mineral absorption and bone mineral content. Journal of Medicinal Food. 17(11): 1247-1255

Gill SP, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI; Relman DA, Fraser-Lingget CM, Nelson KE: 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science. 312: 1355-1359.

Gomez E, Tuohy KM, Gibson GR, Klinder A, Costabile A. 2010. *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. Journal of Applied Microbiology. 108(6): 2114-2121.

- González de Mejía E, Prisecaru VI. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Food Science and Nutrition*. 45 (6): 425-445.
- González de Mejía E, Hankins C, Paredes O, Shannon M. 1989. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *Journal of Food Biochemistry*. 14: 117-126.
- Greer J, O'Keefe S. 2011. Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Frontiers in Physiology*. 1: 1-8.
- Guarner F. 2011. Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterología y Hepatología*. 34(3): 147-154.
- Guerrero R, Margulis L, Berlanga M. 2013. Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology*. 16(3):133-143.
- Gupta YP. 1987. Anti-nutritional and toxic factors in food legumes: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 37(3): 201-228.
- Hara T, Mukonoki Y, Tsukamoto I, Miyoshi M, Hasegawa K. 1984. Susceptibility of kintoki bean lectin to digestive enzymes *in vitro* and its behavior in the digestive organs of mouse *in vivo*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 30: 381-394.
- Hernandez-Cruz P, Pérez-Campos E, Martínez-Martínez L, Ortiz B, Martínez G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica*. 24(1): 21-27.
- Hernández- Hernández A, Coronel-Rodríguez, Monge-Zamorano M, Herrera-Quintana C. 2015. Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatría Integral*. 11 (5): 337-354.
- Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. 2017. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and Environments*. 32(4):300-313.

- Holscher H, Bauer L, Gourineni V, Pelkman C, Fahey G, Swanson K. 2015. Agave inulin supplementation affects the fecal microbiota of healthy adults participating in a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *The Journal of Nutrition*. 145 (9): 2025-2032.
- Huazano-García A, Lopez M. 2015. Agavins reverse the metabolic disorders in overweight mice through the increment of short chain fatty acids and hormones. *Food & Function*. 6: 3720-3727.
- Jaffé W G. 1980. Hemagglutinins (Lectins). In: *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press. 3: 73–102.
- Jiménez-Galindo JC, Acosta Gallegos JA. 2013. Rendimiento de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y Tépari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) bajo el método riego-sequia en Chihuahua. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(4): 557-567.
- Kim YS, Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*. 12(5): 319-330.
- Kleesen B, Hartmann L, Blaut M. 2003. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*. 89: 597-606.
- Lajolo FM, Genovese MI. 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6592-6598.
- Leblond-Bourget N, Philippe H, Margin I, Decaris B. 1996. 16 rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46(1):102-111.
- Leiner IE. 1994. Implications of antinutrition components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34(1): 31-67.

- Li Z, Li D, Qiao S, Zhu X, Huang C. 2003. Anti-nutritional effect of a moderate dose of soybean agglutinin in the rat. *Archives of Animal Nutrition*. 57(4): 267-277.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*. 637-674.
- López-Sánchez C, López-Martínez FJ, Castañeda-Cuevas A, Yllescas-Gasca L, Ferriz-Martínez R, Torres-Arteaga I, Gallegos-Corona MA, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2010. Evaluación de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de lectinas de frijol Tépari. *CIENCIA@UAQ*. 3(1):3-13.
- López-Soto JL, Ruiz-Corral JA, Sánchez-González JJ, Lépiz-Ildefonso R. 2005. Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*phaseolus* ssp) en la República Mexicana. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28(3): 221-230.
- Louis P, Hold G, Flint H. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*. 12(10): 661-672.
- Macfarlane S, Macfarlane G. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 67-71.
- Mancilla-Margalli A, Lopez MG. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from agave and dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 7832-7839.
- Marchesi JR, Ravel J. 2015. The vocabulary of microbiome research; a proposal. *Microbiome*. 3:31.
- McCartney AL. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*. 88: 529-537.
- Moreno-Vilet L, García-Hernández MH, Delgado-Portales RE, Corral-Fernández NE, Cortez-Espinosa N, Ruiz-Cabrera MA, Portales-Pérez DP. 2014. *In vitro*

assessment of agave fructans (*Agave Salmiana*) as prebiotic and immune system activators. International Journal of Biological Macromolecules. 63: 181-187.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2017. Microbiología médica. Editorial Elsevier. 8ª edición. España. pp 6-7.

Nakata S, Kimura T. 1985. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. The Journal of Nutrition. 115: 1621-1629.

Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. 2012. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. Science. 336: 1262-1267.

Nikolaki S, Tsiamis G. 2013. Microbial diversity in the era of omic technologies. BioMed Research International. 1-15.

Nocker A, Burr M, Camper A. 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. Microbial Ecology. 54(2): 276-289.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Disponible en: <http://148.243.71.63/default.asp?doc=743>

O'Hara AM, Shanahan F. 2006. The gut as a forgotten organ. European Molecular Biology Organization Reports. 7(7): 688-693.

Osman MA, Reid PM, Weber CW. 2003. The effect of feeding Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth and pancreas of young mice. Pakistan Journal of Nutrition. 2(3): 111-115

Pan L, Farouk MH, Qin G, Zhao Y, Bao N. 2018. The influences of soybean agglutinin and functional oligosaccharides on the intestinal tract of monogastric animals. International Journal of Molecular Sciences. 19(2): E554.

- Pattananandecha T, Sirilun S, Duangjitcharoen Y, Sivamaruthi B S, Suwannalert P, Peerajan S, Chaiyasut C. 2016. Hydrolysed inulin alleviates the azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci by altering selected intestinal microbiota in Sprague-Dawley rats. *Pharmaceutical Biology*. 54(9): 1596-1605.
- Pereira FC, Berry D: 2017. Microbial nutrient niches in the gut. *Environmental Microbiology*. 19(4): 1366-1378.
- Pita-López W. 2015. Efecto de una fracción de lectinas e inhibidor de proteasas de frijol Tépari sobre la digestibilidad proteica y morfología de las vellosidades intestinales en ratas. Tesis para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Popa R, Popa R, Marshall MJ, Nguyen H, Tebo BM, Brauer S. 2009. Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. *Journal Microbiological Methods*. 78(2):111-118.
- Puertollano E, Kolida S, Yaqoob P. 2014. Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 17(2):139-144.
- Pusztai A, Bardocz S. 1996. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: Metabolic consequences and applications. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 8(41): 149-165.
- Pusztai A, de Grant G, Spencer RJ, Duguid TJ, Brown DS, Ewen SWB, Peumans WJ, Van Damme EJM, Bardocz. 1993. Kidney bean lectin-induced *Escherichia coli* overgrowth in the small intestine is blocked by GNA, a mannose-specific lectin. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(4): 360-368.
- Reddy BS, Hamid R, Rao CV. 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*. 18(7): 1374-1374.
- Rhodes JM.1999. Beans means lectins. *Gut*. 44(5): 593-594.

- Ritsema T, Smeekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 223-230.
- Roberfroid MB. 2000. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition*. 16 (7-8): 677-679.
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. 2011. Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth Defects Research*. 93(1): 56-66.
- Schiffrin EJ, Blum S. 2002. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56 Suppl 3:S60-4.
- Schrezenmeir J, de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2 suppl): 361S-364S.
- Schulze H, Saini HS, Huisman J, Hessing M, Van Den Berg W, Verstegen MWA. 1995. Increased nitrogen secretion by inclusion of soya lectin in the diets of pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 69(4): 501-510.
- Shanahan F. 2002. The host-microbe interface within the gut. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*. 16(6): 915-931.
- Sharon N. 2008. Lectins: past, present and future. *Biochemical Society Transactions*. 36(6): 1457–1460. <https://doi.org/10.1042/BST0361457>
- Suárez-Moya A. 2017. Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*. 30(5): 305-311.
- Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. 2014. Diet, Metabolites, and “Western-Lifestyle” Inflammatory Diseases. *Immunity*. 40(6): 833-842.
- Wang X, Gibson GR. 1993. Effect of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(373-380).

- Washburne AD, Morton JT, Sanders J, McDonal D, Zhu Q, Oliverio AM, Knight R. 2018. Methods for phylogenetic analysis of microbiome data. *Nature Microbiology*. 3: 652-661.
- Whittaker RH, Levin SA, Root RB. 1973. Niche, habitat and ecotope. *The American Naturalist*. 107(955): 321-338.
- Xiao J, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q. 2015. Gut fuction-enhancing properties and metabolic effects of dietary indigestible sugars in rodents and rabbits. *Nutrients*. 7: 8348-8365.
- Zoentandol ER, Vaughan EC, Vos WM. 2006. A microbial world within us. *Molecular Microbiology*. 59(6): 1693-1650

X. ANEXOS

ANEXO 1. Histología del intestino

Intestino delgado

El intestino delgado se encuentra después del estómago, y comprende desde el orificio pilórico hasta la unión íleocecal, y es seguido por el intestino grueso. Está compuesto por tres zonas: duodeno, yeyuno e íleon. La principal función es digestión y absorción de nutrientes, así como reabsorción de líquidos. Está conformado por mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figura 15).

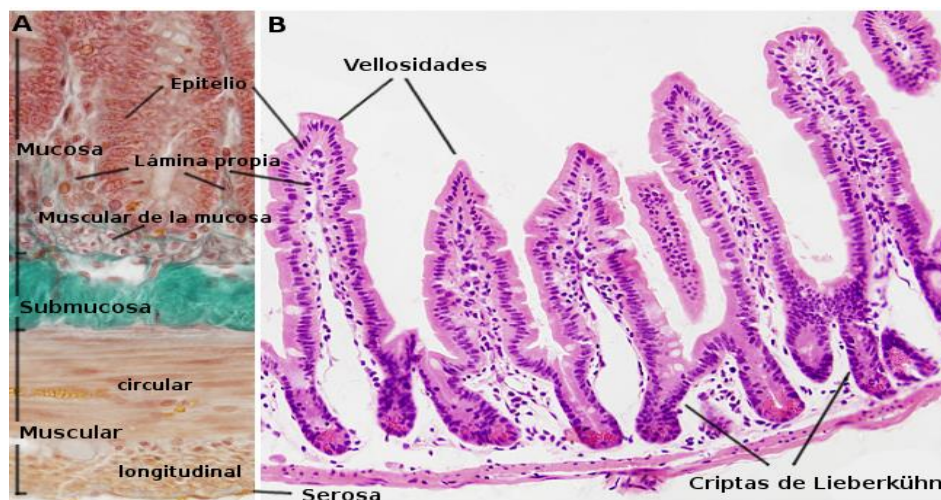


Figura 15. Capas de intestino delgado de rata. Secciones teñidas con A) Tricrómico de Masson, B) Hematoxilina-eosina (Atlas de histología vegetal y animal, 2016)

- Mucosa: Su principal función es aumentar la superficie interna del intestino, asegurando el mantenimiento de la absorción de nutrientes. Presenta tres capas diferenciadas: epitelio, lámina propia y muscular de la mucosa. La mucosa se expande en porciones pequeñas en la superficie del intestino, llamadas vellosidades formadas a su vez por epitelio cilíndrico simple en la parte externa, mientras que la interna tejido conectivo laxo. Este tejido es irrigado por capilares sanguíneos y vasos linfáticos. En la base de las vellosidades se ubican las criptas de Lieberkühn (Figura 16). Las células del

epitelio encargadas directamente de la absorción de nutrientes son los enterocitos, células más frecuentes y encargadas del paso selectivo de moléculas desde la luz intestinal hasta los vasos sanguíneos; células caliciformes, cumplen con el proceso de producción de moco a lo largo del tracto digestivo; células de Paneth, situadas en la base de las vellosidades, producen variados tipos de enzimas y mantienen la microbiota intestinal; células enteroendocrinas, encargadas de la liberación de hormonas intestinales; y células M, interactúan con las células del sistema inmune, presentando microorganismos y moléculas no propias

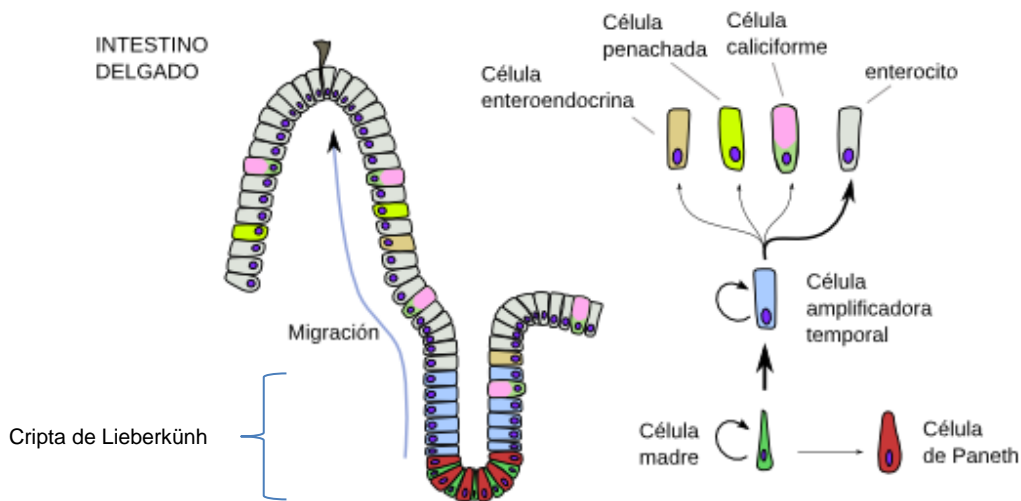


Figura 16. Esquema de los principales linajes celulares del intestino delgado. La maduración celular fluye hacia la parte superior de la vellosidad intestinal. Hay una mayor proporción de enterocitos (modificado Barker, 2014).

- Submucosa: Compuesta por el tejido conectivo denso, pueden presentarse adipocitos. En la primera porción del intestino delgado están presentes las glándulas de Brunner encargadas de la producción de sustancias muy alcalinas, con la finalidad de disminuir la acides del quimo.
- Muscular externa: El músculo liso está presente en dos capas, innervadas con plexos de terminales nerviosas; la interna, donde las células orientadas circularmente, provocan desplazamiento hacia delante y hacia atrás con la

finalidad de mezclar el contenido intestinal con sustancias digestivas. La externa, aquí las células están orientadas longitudinalmente y permiten el flujo del contenido gástrico a través del intestino.

- Serosa: Constituida por el tejido conectivo que en algunas porciones se puede encontrar revestido por el peritoneo.

Intestino grueso

El intestino grueso es la parte final del tracto digestivo, está constituido por ciego, colon (ascendente, transverso y descendente) y recto. Lleva a cabo las funciones de absorción de agua y electrolitos, compactación y eliminación de materia fecal. Este órgano no cuenta con vellosidades ni pliegues circulares, como las demás porciones del tracto digestivo. En la pared del intestino grueso se pueden distinguir 4 capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figura 16).

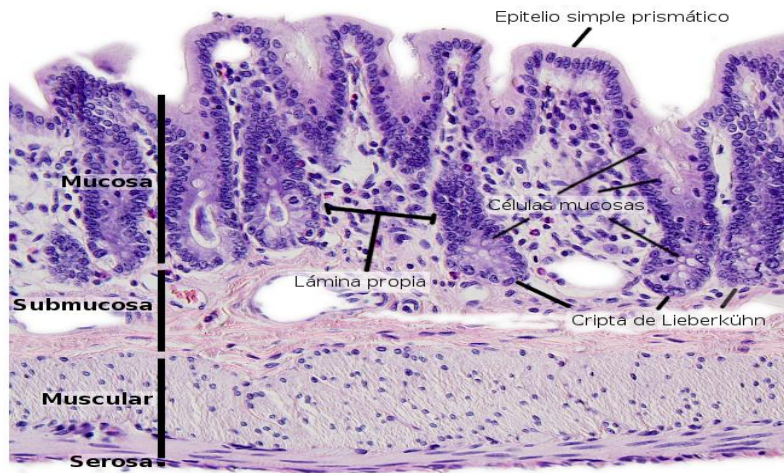


Figura 17. Capas del intestino grueso de rata. Secciones teñidas con hematoxilina-eosina (Atlas de histología vegetal y animal, 2016).

Mucosa: Constituida por un epitelio simple cilíndrico, se forman invaginaciones en la superficie epitelial, llamadas criptas de Lieberkühn. El linaje celular es igual que en el intestino delgado y cumplen las mismas funciones, solo existe una diferencia en cuanto a las cantidades de los tipos de células. Hay una mayor proporción de

células mucosas que en el intestino delgado, esto ayuda al transporte del material intestinal. El recambio de las células epiteliales va de la base de las criptas de Lieberkühn y en dirección de la superficie intestinal (Figura 17). La lámina propia del intestino grueso, a diferencia de otras porciones del tracto digestivo, no posee de vasos linfáticos o una capa gruesa de colágeno entre la membrana basal del epitelio y los vasos sanguíneos próximos. La mucosa está constituida por dos capas con diferente orientación y en algunas zonas es delgada. Las células epiteliales intestinales además de ser la primera línea de defensa contra bacterias patógenas, reconocen bacterias comensales por lo que desarrollan la capacidad de detectar cambios ambientales y reacciona a ellos, por ejemplo activando la reacción inflamatoria en la lámina propia (Schiffrin y Blum, 2002).

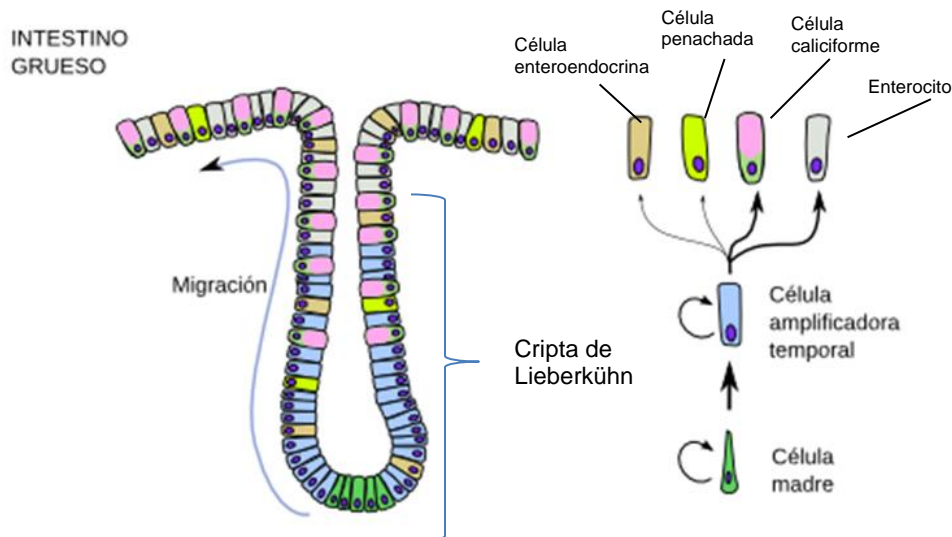


Figura 18. Esquema de los principales linajes celulares del intestino grueso. La renovación celular inicia en la base de la cripta y va en dirección a la superficie intestinal. Hay una mayor proporción de células caliciformes (modificado Barker, 2014).

- Submucosa: está constituida por tejido conectivo muy denso. Los vasos sanguíneos son de gran calibre y en algunas zonas se observa tejido adiposo.
- Muscular: La capa longitudinal del músculo liso es más delgada que la capa circular.
- Serosa: Se caracteriza por ser una capa muy delgada de conectivo y en algunos puntos se extiende con el peritoneo.

Anexo 2. Análisis de pureza e integridad de DNA en NANODROP 2000c

Muestra	260/280	260/230	Concentración	Muestra	260/280	260/230	Concentración
C_S0_9/18	1.87	1.4	55.2 ng/mL	Ag/FCL_S0_15/20	1.95	1.41	91.1 ng/mL
C_S0_25/26	1.84	1.16	78.1 ng/mL	Ag/FCL_S0_21/22	1.92	1.19	65.9 ng/mL
C_S0_27/30	1.93	1.50	81.1 ng/mL	Ag/FCL_S0_31/33	1.84	1.07	72.1 ng/mL
C2_9/18	1.91	1.42	65 ng/mL	Ag/FCL 2_15/20	1.90	1.54	83.3 ng/mL
C2_25/26	1.82	1.32	70.1 ng/mL	Ag/FCL 2_21/22	1.85	1.53	103.5 ng/mL
C2_27/30	1.89	1.54	67 ng/mL	Ag/FCL 2_31/33	1.80	1.08	63.8 ng/mL
C4_9/18	1.86	2.24	113.4 ng/mL	Ag/FCL 4_15/20	1.87	1.88	75.1 ng/mL
C4_25/26	1.82	1.17	96.8 ng/mL	Ag/FCL 4_21/22	1.94	1.53	63 ng/mL
C4_27/30	1.88	1.79	56.5 ng/mL	Ag/FCL 4_31/33	1.87	1.35	59.9 ng/mL
C6_9/18	1.95	1.66	134.0 ng/mL	Ag/FCL 6_15/20	1.85	1.25	41.6 ng/mL
C6_25/26	1.93	1.45	149.6 ng/mL	Ag/FCL 6_21/22	1.80	1.27	35.4 ng/mL
C6_27/30	1.78	.98	63.5 ng/mL	Ag/FCL 6_31/33	1.80	0.95	31.2 ng/mL
FCL_S0_4/8	1.94	1.55	99.4 ng/mL	Ag/Ag-FCL_S0_2/5	1.94	0.95	37.7 ng/mL
FCL_S0_13/16	1.89	1.34	86.3 ng/mL	Ag/Ag-FCL_S0_6/7	1.94	0.92	48.8 ng/mL
FCL_S0_35/36	2.06	2.36	113.9 ng/mL	Ag/Ag-FCL_S0_17/23	1.97	1.14	62.6 ng/ml
FCL2_4/8	2.01	1.94	16.5 ng/mL	Ag/Ag-FCL 2_5	1.87	0.99	68.5 ng/mL
FCL2_13/16	2.00	2.5	75.9 ng/mL	Ag/Ag-FCL 2_6/7	1.87	0.91	43.5 ng/mL
FCL2_35/36	2.06	1.83	21.3 ng/mL	Ag/Ag-FCL 2_17/23	1.88	1.23	74.8 ng/mL
FCL4_4/8	1.82	1.19	80.9 ng/mL	Ag/Ag-FCL 4_5	1.90	1.30	67.1 ng/mL
FCL4_13/16	1.89	1.36	63.1 ng/mL	Ag/Ag-FCL 4_6/7	1.87	1.10	43.1 ng/mL
FCL4_35/36	1.98	1.64	81.8 ng/mL	Ag/Ag-FCL 4_17/23	1.90	1.28	78.5 ng/mL
FCL6_4/8	2.00	1.94	112.1 ng/mL	Ag/Ag-FCL 6_5	1.90	1.35	79.8 ng/mL
FCL6_13/16	1.94	1.51	75.5 ng/mL	Ag/Ag-FCL 6_6/7	1.87	1.49	86.8 n/mL
FCL6_35/36	1.97	1.65	67.8 ng/mL	Ag/Ag-FCL 6_17/23	1.84	1.84	82.8 ng/mL

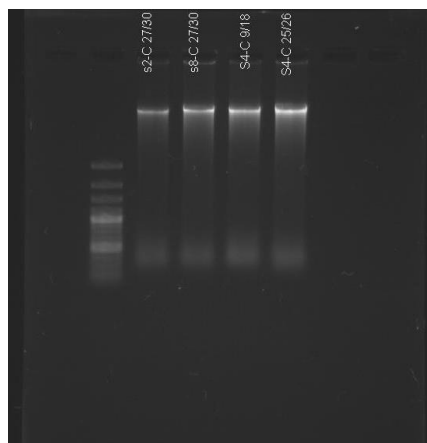


Figura 19. Prueba de integridad mediante electroforesis (gel agarosa 0.7%).

Anexo 3. Preparación de muestra para PCR

#	Muestra	CODIGO	C1 (ng/μL)	C2 (ng/μL)	V2 (μL)	V1 (μL)	AGUA DEST
1	C_S0_9/18	C2_1	55.2	5	20	1.8115942	18.1884058
2	C_S0_25/26	C2_2	78.1	5	20	1.28040973	18.7195903
3	C_S0_27/30	C2_3	81.1	5	20	1.23304562	18.7669544
4	C_S2_9/18	C4_1	65	5	20	1.53846154	18.4615385
5	C_S2_25/26	C4_2	70.1	5	20	1.42653352	18.5734665
6	C_S2_27/30	C4_3	67	5	20	1.49253731	18.5074627
7	C_S4_9/18	C6_1	113.4	5	20	0.88183422	19.1181658
8	C_S4_25/26	C6_2	96.8	5	20	1.03305785	18.9669421
9	C_S4_27/30	C6_3	56.5	5	20	1.7699115	18.2300885
10	C_S6_9/18	C8_1	78.1	5	20	1.28040973	18.7195903
11	C_S6_25/26	C8_2	98.8	5	20	1.01214575	18.9878543
12	C_S6_27/30	C8_3	63.5	5	20	1.57480315	18.4251969
13	FCL_S0_4/8	FCL2_1	99.4	5	20	1.00603622	18.9939638
14	FCL_S0_13/16	FCL2_2	86.3	5	20	1.15874855	18.8412514
15	FCL_S0_35/36	FCL2_3	113.9	5	20	0.87796313	19.1220369
16	FCL_S2_4/8	FCL4_1	16.5	5	20	6.06060606	13.9393939
17	FCL_S2_13/16	FCL4_2	75.9	5	20	1.31752306	18.6824769
18	FCL_S2_35/36	FCL4_3	21.3	5	20	4.69483568	15.3051643
19	FCL_S4_4/8	FCL6_1	80.9	5	20	1.23609394	18.7639061
20	FCL_S4_13/16	FCL6_2	63.1	5	20	1.58478605	18.4152139
21	FCL_S4_35/36	FCL6_3	81.8	5	20	1.22249389	18.7775061
22	FCL_S6_4/8	FCL8_1	112.1	5	20	0.89206066	19.1079393
23	FCL_S6_13/16	FCL8_2	75.5	5	20	1.32450331	18.6754967
24	FCL_S6_35/36	FCL8_3	67.8	5	20	1.47492625	18.5250737
25	Ag/FCL_S0_15/20	AF2_1	91.1	5	20	1.09769484	18.9023052
26	Ag/FCL_S0_21/22	AF2_2	65.9	5	20	1.51745068	18.4825493
27	Ag/FCL_S0_31/33	AF2_3	72.1	5	20	1.38696255	18.6130374
28	Ag/FCL_S2_15/20	AF4_1	83.3	5	20	1.20048019	18.7995198
29	Ag/FCL_S2_21/22	AF4_2	103.5	5	20	0.96618357	19.0338164
30	Ag/FCL_S2_31/33	AF4_3	63.8	5	20	1.56739812	18.4326019
31	Ag/FCL_S4_15/20	AF6_1	75.1	5	20	1.33155792	18.6684421
32	Ag/FCL_S4_21/22	AF6_2	63	5	20	1.58730159	18.4126984
33	Ag/FCL_S4_31/33	AF6_3	59.9	5	20	1.66944908	18.3305509
34	Ag/FCL_S6_15/20	AF8_1	41.6	5	20	2.40384615	17.5961538
35	Ag/FCL_S6_21/22	AF8_2	35.4	5	20	2.82485876	17.1751412
36	Ag/FCL_S6_31/33	AF8_3	31.2	5	20	3.20512821	16.7948718
37	Ag/Ag-FCL_S0_2/5	AFA2_1	37.7	5	20	2.65251989	17.3474801
38	Ag/Ag-FCL_S0_6/7	AFA2_2	48.8	5	20	2.04918033	17.9508197
39	Ag/Ag-FCL_S0_17/23	AFA2_3	62.6	5	20	1.59744409	18.4025559
40	Ag/Ag-FCL_S2_5	AFA4_1	68.5	5	20	1.45985401	18.540146
41	Ag/Ag-FCL_S2_6/7	AFA4_2	43.5	5	20	2.29885057	17.7011494
42	Ag/Ag-FCL_S2_17/23	AFA4_3	74.8	5	20	1.3368984	18.6631016
43	Ag/Ag-FCL_S4_5	AFA6_1	67.1	5	20	1.49031297	18.509687
44	Ag/Ag-FCL_S4_6/7	AFA6_2	43.1	5	20	2.32018561	17.6798144
45	Ag/Ag-FCL_S4_17/23	AFA6_3	78.5	5	20	1.27388535	18.7261146
46	Ag/Ag-FCL_S6_5	AFA8_1	79.8	5	20	1.25313283	18.7468672
47	Ag/Ag-FCL_S6_6/7	AFA8_2	86.8	5	20	1.15207373	18.8479263
48	Ag/Ag-FCL_S6_17/23	AFA8_3	82.8	5	20	1.20772947	18.7922705

Anexo 4. Dendograma de los cambios en la microbiota con pruebas por triplicado

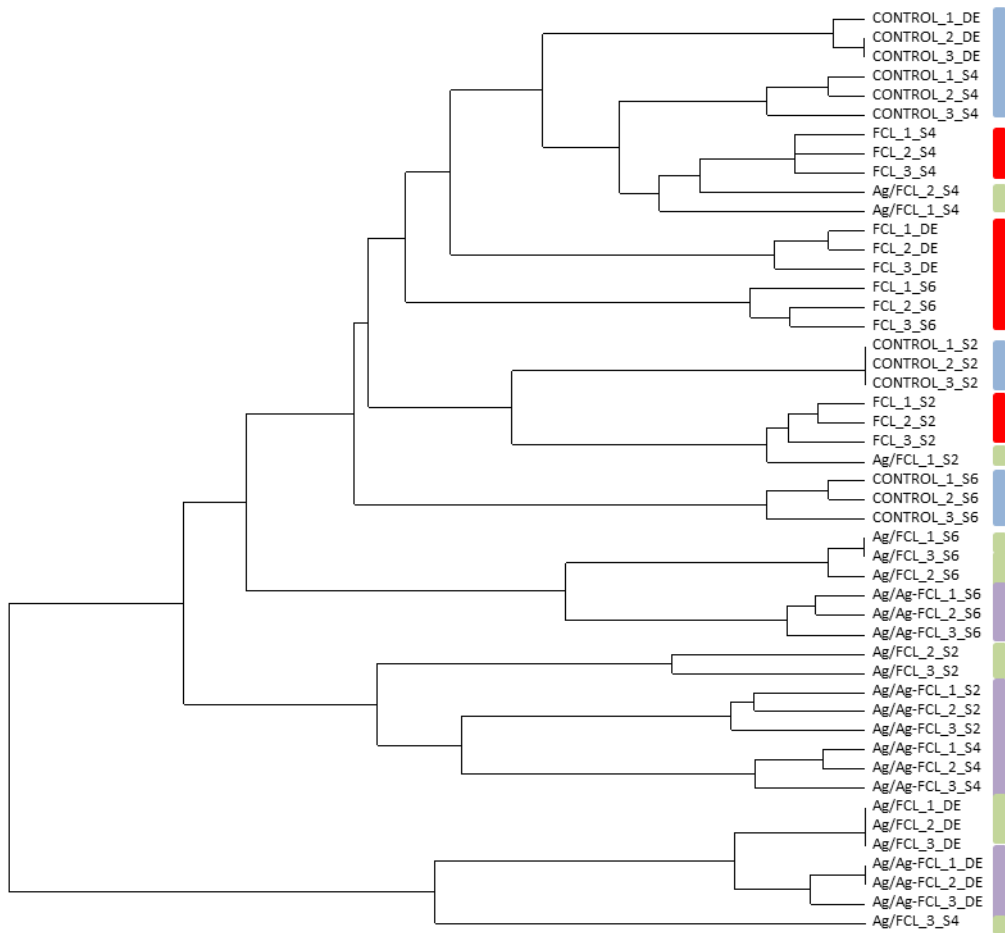


Figura 20. Dendograma de los cambios de la microbiota con pruebas por triplicado.