

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD IRAPUATO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

Estudio de la Ingesta de Fructanos de *Agave* en la Modulación  
de la Microbiota Intestinal y Hormonas Involucradas en la  
Regulación del Apetito

Tesis que presenta

**M. en C. Alicia Huazano García**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias**

En la especialidad de Biotecnología de Plantas

Directora de tesis

**Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez**

Este trabajo, cuyo título es: “**Estudio de la Ingesta de Fructanos de *Agave* en la Modulación de la Microbiota Intestinal y Hormonas Involucradas en la Reguación del Apetito**”, fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la asesoría de la Dra. Mercedes G. López y con el apoyo del CONACYT.

## *Agradecimientos*

A la Dra. Mercedes G. López por haberme aceptado en su grupo de investigación, su constante apoyo, paciencia y valiosos consejos; pero sobre todo, por compartir y transmitirme sus conocimientos.

A los miembros de mi comité: Dr. Alejandro Blanco, Dr. Edmundo Lozoya, Dra. Laila Partida, Dra. Judith Urías y Dr. Robert Winkler por sus preciadas aportaciones, las cuales enriquecieron y contribuyeron a la mejora del presente trabajo.

A la Dra. Maria Gloria Domínguez de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio, así como su apoyo y guía para llevar a cabo el análisis de la microbiota. También quiero agradecer al Dr. Hakdong Shin por su ayuda técnica y enseñanza para el análisis de secuencias en QIIME.

Al CONACYT por la beca nacional y mixta que me otorgó para realizar el doctorado, así como al CINVESTAV (Unidad Irapuato) por la beca terminal que me brindó.

A la fructan family por su amistad y cariño.

A mis papás y hermanos por su constante apoyo. De manera especial a mi esposo e hijo, porque son mi aliciente para seguir adelante.

# Índice general

Resumen . . . . .	VIII
Abstract . . . . .	x
Introducción . . . . .	1
1. Antecedentes . . . . .	3
1.1 El problema del sobrepeso y la obesidad en México . . . . .	3
1.1.1 Estrategias para disminuir el sobrepeso u obesidad . . . . .	4
1.1.1.1 Ejercicio físico . . . . .	4
1.1.1.2 Cambio de dieta . . . . .	5
1.1.1.3 Fructanos . . . . .	5
1.2 ¿Qué son los fructanos? . . . . .	5
1.2.1 Fuentes naturales de fructanos . . . . .	7
1.2.2 Fructanos de <i>Agave</i> . . . . .	8
1.2.2.1 Metabolismo de los fructanos en el <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul . . . . .	12
1.2.3 Proceso de extracción de fructanos de <i>Agave</i> . . . . .	13
1.2.4 Métodos de caracterización de fructanos de <i>Agave</i> . . . . .	14
1.3 Efecto prebiótico de los fructanos tipo inulina . . . . .	16
1.3.1 Efectos sistémicos de los fructanos (peso corporal, glucosa, triglicéridos y colesterol) . . . . .	16
1.3.2 Modulación de la microbiota intestinal . . . . .	17
1.3.2.1 Secuenciación de alto rendimiento para el estudio de la microbiota . . . . .	18

1.3.3	Producción de ácidos grasos de cadena corta en el contenido colónico . . . . .	20
1.3.4	Modulación de hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito . . . . .	23
1.3.4.1	Efecto del grado de polimerización sobre la modulación de las hormonas GLP-1 y grelina . . . . .	26
1.4	Efecto prebiótico de los fructanos de <i>Agave</i> . . . . .	27
1.4.1	Impacto en la ganancia de peso corporal y niveles de glucosa y colesterol en sangre . . . . .	27
1.4.2	Incremento en la concentración de ácidos grasos de cadena corta y disminución del pH en el contenido colónico . . . . .	30
1.4.3	Cambios en la microbiota intestinal y modulación de las hormonas grelina y <i>GLP-1</i> . . . . .	30
1.5	Los fructanos como una alternativa para el manejo de sobrepeso . . . . .	32
1.5.1	Mejora de parámetros metabólicos y modulación de hormonas involucradas con saciedad . . . . .	33
1.5.2	La microbiota intestinal como un factor clave en el desarrollo de sobrepeso u obesidad y su modulación con fructanos . . . . .	35
2.	Justificación . . . . .	39
3.	Hipótesis . . . . .	40
4.	Objetivo general . . . . .	41
4.1	Objetivos específicos . . . . .	41
5.	Estrategia experimental . . . . .	42
5.1	Extracción y purificación de fructanos de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de bajo grado de polimerización . . . . .	42
5.1.1	Análisis de proteínas, saponinas y presencia de bacterias . . . . .	44
5.1.2	Caracterización de los fructanos extraídos de plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de 4 años de edad . . . . .	45

---

5.1.2.1	Cuantificación de fructanos (análisis enzimático/ espectrofotométrico) . . . . .	45
5.1.3	Cromatografía en capa fina (TLC) . . . . .	47
5.1.4	Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso amperométrico ( <i>HPAEC-PAD</i> ) . . . . .	47
5.2	Estudio <i>in vivo</i> del efecto del consumo de fructanos de <i>Agave</i> de bajo grado de polimerización en ratones con sobrepeso . . . . .	48
5.2.1	Ingesta de alimento y evolución del peso corporal de los ratones . . . . .	50
5.2.2	Análisis de la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre . . . . .	50
5.2.3	Análisis de la microbiota del ciego de los ratones . . . . .	51
5.2.3.1	Extracción de ADN genómico . . . . .	51
5.2.3.2	Amplificación de la región V4 del gen 16S ARNr . . . . .	51
5.2.3.3	Cuantificación, mezclado y secuenciación de los amplicones . . . . .	52
5.2.3.4	Análisis de las secuencias . . . . .	52
5.2.3.5	Evaluación de las taxas enriquecidas mediante el análisis lineal discriminante por efecto de tamaño ( <i>LEfSe</i> ) . . . . .	53
5.2.4	pH y ácidos grasos de cadena corta en el contenido del ciego y colon de los ratones . . . . .	53
5.2.5	Análisis de las hormonas grelina, <i>GLP-1</i> , insulina y leptina . . . . .	54
6.	Resultados y discusión . . . . .	56
6.1	Extracción y purificación de los fructanos de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de bajo grado de polimerización . . . . .	56
6.1.1	Remoción de proteínas, saponinas y bacterias del jugo de <i>Agave</i> . . . . .	57
6.1.2	Caracterización de los fructanos de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de 4 años de edad . . . . .	59
6.1.2.1	Pureza de los fructanos extraídos de plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de 4 años de edad . . . . .	60

---

6.1.2.2	Complejidad estructural de los fructanos de <i>Agave</i>	60
6.1.2.3	Grado de polimerización de los fructanos extraídos de plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de 4 años de edad	62
6.2	Estudio <i>in vivo</i> del efecto del consumo de fructanos de <i>Agave</i> de bajo grado de polimerización en ratones con sobrepeso	64
6.2.1	Efecto del consumo de una dieta alta en grasa	64
6.2.1.1	Evolución del peso corporal de los ratones	64
6.2.1.2	Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre	65
6.2.1.3	Cambios en la microbiota del ciego de los ratones después del consumo de la dieta alta en grasa	65
6.2.1.4	pH y ácidos grasos de cadena corta en contenido del ciego	69
6.2.2	Efecto del cambio de dieta y la suplementación con fructanos de <i>Agave</i> en los ratones con sobrepeso	70
6.2.2.1	Ingesta de alimento y disminución del peso corporal de los ratones	70
6.2.2.2	Efecto en los parámetros metabólicos (glucosa, triglicéridos y colesterol)	72
6.2.3	Cambios en la microbiota del ciego de los ratones después de la ingesta de fructanos	73
6.2.4	pH y concentración de los ácidos grasos de cadena corta en el contenido colónico de los ratones	81
6.2.4.1	Análisis del contenido del ciego de los ratones	81
6.2.4.2	Análisis del contenido colónico de los ratones	82
6.2.5	Efecto sobre las hormonas grelina, <i>GLP-1</i> , insulina y leptina	85
6.2.6	Análisis de componentes principales (PCA)	87
Conclusiones		90

Perspectivas . . . . .	92
Bibliografía . . . . .	93
Índice de figuras . . . . .	107
Índice de tablas . . . . .	111
Lista de abreviaturas . . . . .	113
Producción y logros científicos . . . . .	115
Artículos . . . . .	115
Capítulos en libros . . . . .	116
Participación en congresos . . . . .	116
Estancia de investigación . . . . .	117

## *Resumen*

El constante incremento en la prevalencia del sobrepeso y obesidad en nuestro país, requiere de forma urgente el desarrollo de estrategias para la prevención y reducción de estos problemas. Una opción viable y con mucho potencial es el consumo de fructanos tipo inulina, los cuales a través de la modulación de la microbiota intestinal y hormonas involucradas en la regulación del apetito, tienen la capacidad de inducir una mejora en la salud, así como una pérdida de peso corporal, en individuos con sobrepeso y obesidad.

Las plantas de *Agave* (endémicas de México) tienen la capacidad de sintetizar fructanos ramificados, difiriendo estructuralmente de los fructanos tipo inulina, estos últimos son lineales. Investigaciones previas, evidencian que los fructanos de *Agave* generan un efecto benéfico en la salud de ratones sanos. Sin embargo, a la fecha no hay un estudio integral que demuestre que los fructanos de *Agave* ejercen un efecto positivo en la salud de individuos con sobrepeso u obesidad. Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluó el efecto de un cambio de dieta suplementada con fructanos de *Agave* sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en ratones con sobrepeso. Así mismo, se determinaron los cambios en la microbiota del ciego, la producción de ácidos grasos de cadena corta (*SCFA*) y hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito; debido a que estas variables desempeñan un rol muy importante en los efectos sistémicos de los individuos.

Ratones machos de la línea C57BL/6 fueron sometidos a dos etapas experimentales; en la primera, los ratones fueron alimentados con una dieta estándar (ST) o una alta en grasa (HF) durante 5 semanas, con la finalidad de inducir sobrepeso en los animales. En la segunda etapa, los ratones control (ST) continuaron alimentándose con

la dieta estándar (ST-ST), mientras que los ratones con sobrepeso fueron cambiados a la dieta estándar (HF-ST), suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas más.

Al término de la primer etapa experimental, el grupo HF mostró un incremento de peso corporal de  $\approx 30\%$  (alcanzando niveles de sobrepeso), así como un aumento en los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de  $9\%$ ,  $79\%$  y  $38\%$  respectivamente, en comparación al grupo ST; lo cual fue asociado con la pérdida substancial en la diversidad de la microbiota en el grupo HF.

En la segunda etapa, el grupo de ratones con sobrepeso que se cambio a la dieta estándar suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) mostró una pérdida de peso corporal de más del doble, en comparación al grupo que solo cambio de dieta (HF-ST); alcanzando pesos muy cercanos a los que presentaron los animales del grupo control (ST-ST). Más aún, la dieta suplementada con fructanos de *Agave* logró revertir los desórdenes metabólicos (aumento en los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol) derivados del consumo de la dieta alta en grasa. La mejora tanto en peso como en los desórdenes metabólicos se asoció a una restauración parcial de la microbiota, donde se observó principalmente un enriquecimiento de los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter* (los cuales seguramente tienen un efecto probiótico). La microbiota que fermentó a los fructanos, produjo un incremento significativo en la concentración de SCFA (acético, propiónico y butírico). Estos ácidos a su vez influyeron en la modulación de las hormonas involucradas en la regulación del apetito, así como en la reversión de los parámetros metabólicos. Además, el grupo HF-ST+A mostró efectos similares al grupo que recibió el suplemento con inulina (HF-ST+O), a pesar de las enormes diferencias estructurales entre ambos fructanos.

Por lo tanto, estos hallazgos demuestran que el cambio de dieta aunado al suplemento con fructanos de *Agave*, es una opción viable para el manejo de sobrepeso, así como de los desórdenes metabólicos inducidos por el consumo de una dieta rica en grasa.

## ***Abstract***

The steady increase in the prevalence of overweight and obesity in our country, demands the development of strategies for prevention and reduction of these conditions. A viable option with a high potential is the consumption of inulin type fructans, which through gut microbiota modulation and hormones involved in appetite regulation, are capable of inducing an improvement in health as well as body weight lost in overweight individuals.

*Agave* plants (endemic to Mexico) have the capacity to synthesize branched fructans, differing structurally from inulin type fructans which are linear. Previous investigations have shown that *Agave* fructans induce beneficial effect on the health of mice. However, up to date an integral study demonstrating that *Agave* fructans have a positive effect on the health of overweight individuals is not known. Therefore in the present work, the effect of a diet shift along with *Agave* fructans supplementation was evaluated on glucose, triglycerides and cholesterol levels in overweight mice. Likewise, changes in the cecum microbiota, short chain fatty acids (*SCFA*) production and gastrointestinal hormones involved in appetite regulation were determined; since it is known that these variables play a relevant role in the individual systemic effects.

Male C57BL/6 mice were subjected to 2-phase trial; in the first, mice were fed with standard diet (ST) or a high fat diet (HF) for 5 weeks, with the objective to induce overweight animals. In the second phase, the control mice were kept with the standard diet (ST-ST) and the overweight mice were shifted to the standard diet (HF-ST) along with *Agave* fructans (HF-ST+A) or inulin (HF-ST+O) supplement for 5 more weeks.

At the end of the first experimental phase, the HF group showed a body weight increase of  $\approx 30\%$  (reaching overweight levels), as well as an increment on glucose, triglyceride and cholesterol levels of 9%, 79%, and 38% respectively in relation to ST group; these increments were associated with a substantial microbiota diversity lost in the HF group.

In the second phase, the overweight mice group that were shifted to the standard diet supplemented with *Agave* fructans (HF-ST+A) showed a loss of body weight more than double in comparison to the group that only changed the diet (HF-ST); reaching body weights very close to those presented by animals in the control group (ST-ST). Moreover, the diet supplemented with *Agave* fructans was able to revert the metabolic disorders (increase in the glucose, triglycerides and cholesterol levels) derived from the high fat diet consumption. The improvement on body weight and metabolic disorders were associated with a partial microbiota restoration, where the enrichment of *Klebsiella* and *Citrobacter* genera (which probably have a probiotic effect) was observed. The microbiota that fermented fructans produced a significant increment on SCFA (acetic, propionic and butyric) concentration. These acids influenced hormones modulation involved in appetite regulation, as well as in the metabolic parameters reversion. In addition, HF-ST+A group showed similar effects with the inulin group (HF-ST+O), despite the great structural differences among fructan supplements.

These findings demonstrate that a diet change along with *Agave* fructans intake is a viable option for the management of overweight and metabolic disorders induced by a high fat diet.

## *Introducción*

El panorama de sobrepeso y obesidad que se tiene en nuestro país es inquietante y representa un problema de salud pública bastante serio. Hoy en día, México ocupa el primer lugar en obesidad a nivel mundial. No obstante, el incremento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en nuestro país, no solo se observa en la población adulta, sino que por desgracia, también en la población infantil.

De manera simple, los individuos con sobrepeso presentan un aumento en exceso del tejido adiposo, de tal manera que la salud del individuo pueda verse comprometida. Comúnmente, la principal causa de que el individuo presente una ganancia de peso corporal se asocia con el consumo de una alta cantidad de grasas o azúcares aunado a un estilo de vida sedentario.

El problema fundamental de que un individuo presente sobrepeso se basa en el hecho de que éste, puede promover la prevalencia del síndrome metabólico; lo que a su vez podría desencadenar en el desarrollo de enfermedades (cardíacas, diabetes tipo II y ciertos tipos de cáncer) las cuales pueden conducir al individuo a su muerte.

El drástico incremento del sobrepeso y la obesidad a nivel nacional, demanda cada vez más, la necesidad de desarrollar estrategias para la prevención e intervenciones que sean accesibles para las personas de todas las edades y niveles socioeconómicos. El cambio hacia una dieta saludable aunado a alguna actividad física, parece ser una opción viable para reducir estos padecimientos. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que el suplementar la dieta con fructanos tipo inulina (prebióticos) podría ser otra opción con mayor potencial para el manejo del sobrepeso. Esto debido a que este tipo de suplementos no solo tienen la capacidad de inducir en el individuo con sobrepeso, una pérdida de peso corporal sino que también mitigan

las comorbilidades asociadas a este padecimiento, a través de la modulación de la microbiota intestinal y hormonas involucradas en la regulación del apetito, por lo que el individuo presenta una mejora en su salud.

En este trabajo se muestra el uso de fructanos de *Agave* como una alternativa para el manejo de sobrepeso en ratones. Para llevar a cabo esto, los ratones fueron alimentados primeramente con una dieta alta en grasa para inducir sobrepeso. Posteriormente, los animales se sometieron a un cambio de dieta aunado a un suplemento con fructanos de *Agave* con el objetivo de investigar el efecto de éstos sobre la microbiota intestinal, hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito así como la capacidad de los fructanos de *Agave* para revertir los desórdenes metabólicos originados en los ratones debido a la ingesta de la dieta alta en grasa. Este es el primer estudio en el que los fructanos no solamente se suplementaron en la dieta del ratón, sino que también se hizo un cambio de dieta. Entonces, el cambio a la dieta estándar (baja en grasas) aunado a la adición de fructanos de *Agave*, promete cambiar en un tiempo más corto los efectos dañinos del consumo de la dieta alta en grasa.

Los fructanos de *Agave* son estructuralmente diferentes con respecto a los fructanos tipo inulina. Los fructanos de *Agave* son ramificados mientras que los tipo inulina son lineales, por lo que se espera que estas diferencias estructurales tengan un impacto positivo en la disminución del peso corporal y en los desórdenes metabólicos causados por el consumo de la dieta rica en grasa, a través de la modulación de la microbiota intestinal y hormonas involucradas en la regulación del apetito.

## ***1. Antecedentes***

### ***1.1. El problema del sobrepeso y la obesidad en México***

El sobrepeso y obesidad en México van en aumento y representan un problema de salud pública considerable. Diversos estudios evidencian que el consumo de una dieta rica en grasa, es una de las causas principales, por las cuales el individuo presenta una ganancia de peso corporal, que con frecuencia desencadena en el desarrollo de sobrepeso y obesidad. Aunque, también se ha identificado una correlación positiva entre la ingesta de una dieta rica en grasa y la incidencia del síndrome metabólico, el cual se caracteriza por un aumento en los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, leptina e insulina en sangre así como mayor cantidad de tejido adiposo, hipertensión arterial y esteatosis hepática [1–4], lo cual aumenta el riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca o diabetes tipo II, afectando drásticamente la salud y bienestar del individuo.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso es la condición de poseer más grasa corporal de la que se considera saludable, en relación con la estatura del individuo y se diferencia de la obesidad, ya que esta última es una enfermedad crónica de origen multifactorial, que se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo. En este sentido, se considera que una persona tiene sobrepeso si su índice de masa corporal (IMC) es  $\geq 25$  y presenta obesidad si su  $IMC \geq 30$ .

Los niveles de sobrepeso y obesidad en México son alarmantes, actualmente ocupamos el primer lugar a nivel mundial en el número de personas que presentan sobrepeso u obesidad, y es debido a que el 69% de los hombres adultos (en un rango de 30-69 años de edad) de nuestro país, muestran alguno de estos dos pa-

decimientos. La perspectiva para las mujeres, es incluso más preocupante, ya que aproximadamente el 73 % de la población femenil presenta sobrepeso u obesidad; y más impresionante es el caso de los niños, ya que el 34 % de los infantes en un rango de 5-11 años, muestran la presencia de sobrepeso u obesidad (Figura 1.1) [5].

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el principal problema de que un individuo presente sobrepeso radica en el hecho de que el sobrepeso puede promover desórdenes metabólicos bastantes serios que podrían llevar al individuo incluso a la muerte [6, 7].

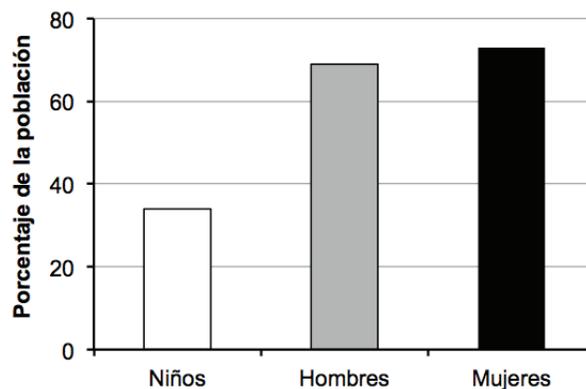


Figura 1.1: Prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población mexicana [5].

### 1.1.1. Estrategias para disminuir el sobrepeso u obesidad

México presenta niveles de sobrepeso y obesidad alarmantes, que necesitan ser reducidos y revertidos con urgencia. Actualmente, el realizar alguna actividad física y el consumo de una dieta saludable, continúa siendo el enfoque de las alternativas para la disminución de estos padecimientos [8].

#### 1.1.1.1. Ejercicio físico

El ejercicio físico por sí solo tiene un efecto limitado sobre el peso corporal [9], sin embargo, el llevar a cabo alguna actividad física aunado a un cambio de dieta, incrementa las probabilidades de mantener una pérdida de peso corporal exitosa

a largo plazo [10, 11]. Además, incluso un modesto aumento en la actividad física puede producir efectos favorables sobre la capacidad cardiorrespiratoria y esto parece abolir algunos de los efectos adversos del sobrepeso [12].

### **1.1.1.2. Cambio de dieta**

Con respecto al consumo de una dieta saludable, existen varias opciones que el individuo puede elegir, aunque el tratamiento comúnmente empleado, es la ingesta de una dieta restringida en carbohidratos y grasas, lo cual induce una pérdida de peso corporal en un lapso de tiempo corto, sin embargo, la efectividad de este tratamiento disminuye en un período de tiempo largo (debido a que la mayoría de las veces resulta difícil el apearse a un régimen muy estricto); por lo que, la ingesta *ad libitum* de una dieta baja en grasas y carbohidratos parece tener mejores resultados a largo plazo [13].

### **1.1.1.3. Fructanos**

El sobrepeso y la obesidad están claramente relacionadas con alteraciones en la ingesta de energía; por lo tanto, el mejorar la calidad de una dieta baja en grasa o en carbohidratos, mediante el consumo de suplementos prebióticos (por ejemplo: fructanos) los cuáles tienen un aporte calórico bajo y promueven la saciedad en el individuo, es otra opción viable para el tratamiento del sobrepeso y sus comorbilidades asociadas [14].

## **1.2. ¿Qué son los fructanos?**

Los fructanos son polisacáridos constituidos por moléculas de fructosa unidas entre sí mediante un enlace glicosídico del tipo  $\beta(2-1)$  y/o  $\beta(2-6)$ , los cuales pueden presentar en su estructura una molécula de glucosa terminal o interna y ser lineales o ramificados. En las plantas, estos carbohidratos son almacenados y sintetizados en la vacuola a partir de sacarosa por acción de enzimas denominadas fructosiltransferasas. La síntesis de fructanos requiere al menos la participación de dos enzimas: 1) Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) y 2) Fructano:fructano

1-fructosiltransferasa (1-FFT). La enzima 1-SST sintetiza el trisacárido 1-kestosa a partir de dos moléculas de sacarosa (el cual es la unidad básica en la síntesis de fructanos tipo inulina) y la enzima 1-FFT es la responsable de la elongación de la cadena de los fructanos, tomando a la 1-kestosa o fructanos con un grado de polimerización ( $DP$ ) mayor, como moléculas donadoras de fructosa. Los fructanos en las plantas cumplen la función de ser carbohidratos de reserva, participan en el proceso de desarrollo vegetativo y actúan como protectores contra la deshidratación impuesta por factores como sequía o congelación [15]. Por lo tanto, la capacidad de las plantas para sintetizar fructanos, está correlacionada con su supervivencia en climas muy fríos o calurosos [16]. En la naturaleza existen cuatro diferentes grupos de fructanos, los cuales pueden ser distinguidos de acuerdo al tipo de enlace que presentan las moléculas de fructosa entre sí y a la posición de la molécula de glucosa presente en la estructura, que es externa en el caso de la inulina, levanos y graminanos o interna como se presenta en las inulinas y levanos neoserie [16]. Las principales características de estas moléculas son las siguientes:

- A. Inulinas: Consisten de cadenas lineales que contienen unidades fructosil unidas entre sí mediante enlaces  $\beta(2-1)$ . La inulina más pequeña es el trisacárido denominado 1-kestosa.
- B. Levanos: Presentan una estructura lineal en la cual las unidades fructosil poseen enlaces  $\beta(2-6)$ .
- C. Graminanos: Poseen enlaces tipo  $\beta(2-1)$  y  $\beta(2-6)$  entre las unidades fructosil y la molécula base o más pequeña de este tipo de fructanos se denomina bifurcosa.
- D. Inulinas y levanos neoserie: Se caracterizan por presentar una molécula de glucosa interna, a la cual se agregan unidades fructosil con enlaces  $\beta(2-1)$  al carbono 1 y al carbono 6 de la glucosa. La inulina neoserie más pequeña, recibe el nombre de neokestosa.

Las estructuras características de estos fructanos se muestran en la Figura 1.2. Es importante mencionar que las plantas de *Agave* además de presentar estas cuatro

estructuras, sintetiza otra más compleja, la cual se denominó agavina [17, 18] y se abordará en el apartado 1.2.2.1.

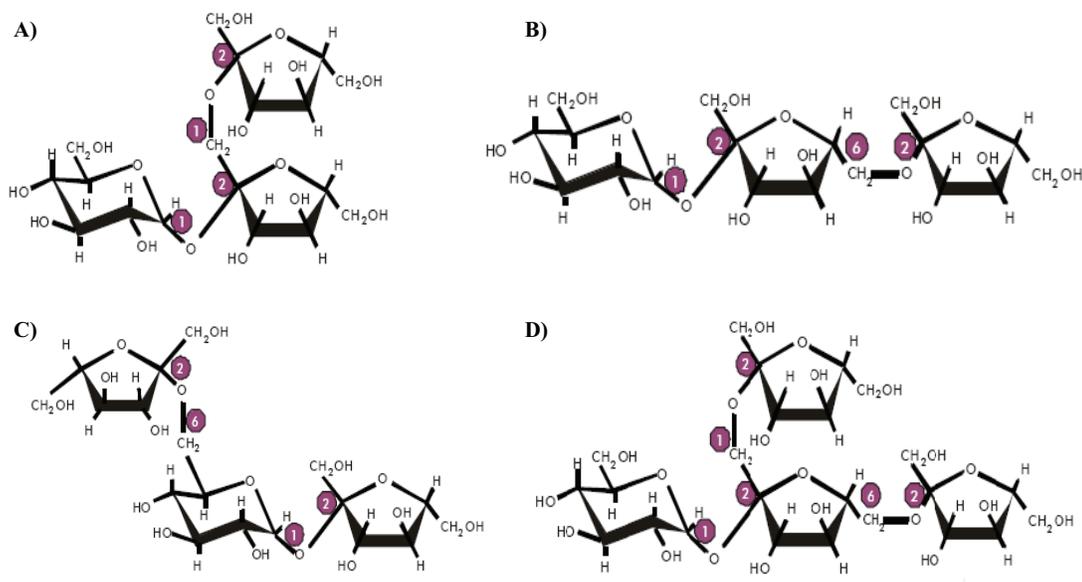


Figura 1.2: Estructuras de los fructanos. A) Fructano tipo inulina; B) Fructano tipo levano; C) Fructano tipo graminano y D) Fructano tipo neoserie. Adaptada de la referencia [19].

Por otra parte, los fructanos también pueden ser clasificados en dos grandes grupos en función al  $DP$  que presentan. Fructanos que contienen de 3 a 10 moléculas en su estructura se denominan fructooligosacáridos (FOS) y aquellos que exhiben un mayor número de moléculas ( $DP > 10$ ) son conocidos como inulinas.

### 1.2.1. Fuentes naturales de fructanos

La mayoría de las plantas almacenan almidón o sacarosa como carbohidratos de reserva, pero aproximadamente del 12-15 % de las plantas superiores (representando más de 40,000 especies) sintetizan fructanos, como su principal fuente de carbohidratos [20]. Los fructanos se encuentran de manera natural en las plantas como una mezcla polidispersa con diferentes estructuras y grados de polimerización. Entre las plantas que almacenan fructanos (Tabla 1.1) muchas son de importancia económica debido a su contenido de este carbohidrato, como es el caso de achicoria (*Cichorium*

*intybus*), alcachofa (*Cynara scolymus*) y plantas del género *Agave* (*Agave* spp.). Hoy en día, la principal fuente comercial de fructanos es la raíz de achicoria seguida por la alcachofa de Jerusalén. En la Tabla 1.1 se puede observar que el contenido de fructanos presentes en la raíz de achicoria es muy similar al que se reporta para el *Agave*. Sin embargo, existe una diferencia muy importante en cuanto a las estructuras de los fructanos de *Agave*, ya que en el caso de la achicoria, esta planta únicamente sintetiza fructanos tipo inulina. Los *Agaves* por su parte, también sintetizan este tipo de fructanos, pero además tienen la capacidad de producir fructanos tipo levano, neofructanos, graminanos y agavinas. Por lo tanto, los *Agaves* podrían ser una fuente alterna para la obtención de fructanos y su aplicación.

Tabla 1.1: Fuentes naturales de fructanos y contenido.

Fuente	Porcentaje de fructanos (peso fresco)
Plátano <sup>a,b</sup>	0.3-0.7
Cebolla <sup>b</sup>	2-6
Alcachofa <sup>b</sup>	3-10
Puerro <sup>b</sup>	3-10
Dalia <sup>b</sup>	10-12
Ajo <sup>b,c</sup>	9-17
Diente de león <sup>b</sup>	12-15
Alcachofa de Jerusalén <sup>b,c</sup>	12-18
Achicoria <sup>b,e</sup>	15-20
Agave <sup>d</sup>	15-22

Datos tomados de las referencias: <sup>a</sup>[21]; <sup>b</sup>[22]; <sup>c</sup>[23]; <sup>d</sup>[17]; <sup>e</sup>[24].

### 1.2.2. Fructanos de *Agave*

México es considerado el centro de origen, evolución y diversificación del género *Agave*, por lo tanto un gran número de especies se encuentran en su territorio. El género *Agave* es el más amplio dentro de la familia *Agavaceae*, el cuál consta de 9 géneros y aproximadamente 293 especies [25, 26]. Las plantas de *Agave* emplean el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), el cual les permite fijar el CO<sub>2</sub> por la noche evitando la pérdida de agua debida a la evapotranspiración. Los *Agaves* sintetizan

fructanos como su principal producto fotosintético [18]. En 1953 Sánchez-Marroquín & Hope fueron los primeros en señalar que el *Agave tequilana* contenía fructanos tipo inulina como su principal fuente de carbohidratos [27]. Posteriormente, en 1976, Satyanarayana reportó la presencia de una mezcla de FOS en *Agave vera cruz* [28], más tarde, en 1998 Wang & Nobel encontraron la presencia de 1-kestosa, neokestosa, 1-nistosa y DP5 en *Agave deserti* [29]. Pero, fue hasta el 2006 que Mancilla-Margalli & López, elucidaron las estructuras para fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul, reportando que esta planta contenía principalmente fructanos tipo graminano y otra molécula muy compleja y distinta a las que se tenían reportadas hasta ese momento, a la cual denominaron agavina [17]. Ambas estructuras poseen moléculas de fructosas unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos  $\beta(2-1)$  y  $\beta(2-6)$ , además de que se encuentran altamente ramificadas. La estructura tipo graminano y agavina difieren únicamente en la posición de la molécula de glucosa presente en éstas, la cual se encuentra de forma externa en los graminanos, y de manera interna en las agavinas (Figura 1.3 A y B respectivamente).

Por otra parte, con el objetivo de determinar el porcentaje y la estructura de los fructanos presentes en diversas especies de *Agave*, Mancilla-Margalli & López [17] analizaron el contenido total de carbohidratos solubles (fructanos, glucosa, fructosa y sacarosa) y las estructuras de los fructanos presentes en cinco diferentes especies de *Agave*, las cuales crecieron en distintas regiones de México. Las especies de *Agave* analizadas fueron: *A. tequilana* (de Jalisco y Guanajuato), *A. angustifolia* (de Sonora y Oaxaca), *A. potatorum* y *A. cantala* (de Oaxaca) y *A. fourcroydes* (de Yucatán). Concluyendo que los fructanos representan entre el 60-85 % de los carbohidratos solubles presentes en las especies de *Agave* estudiadas y que esta variación en el porcentaje se encuentra influenciada por las características ambientales del lugar en donde crece la planta. El porcentaje restante (15-40 %) estuvo constituido por los carbohidratos: glucosa, fructosa y sacarosa. Los autores destacaron que dentro de las cinco especies de *Agave* examinadas, el *A. tequilana* de Jalisco, fue el que mostró la mayor concentración de fructanos con respecto a las demás (Figura 1.4).

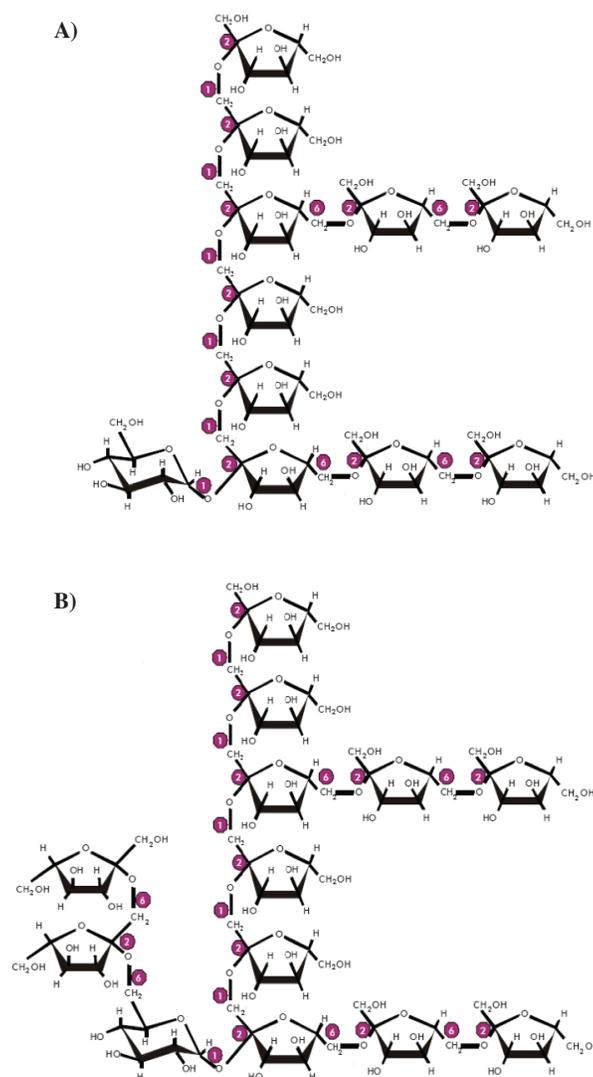


Figura 1.3: Estructuras de los principales fructanos sintetizados por plantas de *Agave*. A) Estructura tipo graminano y B) Estructura tipo agavina (neofructano).

En este mismo estudio los investigadores determinaron el *DP* promedio así como la abundancia de la estructura tipo agavina en relación a la estructura tipo graminano, para cada una de las especies de *Agave*. Así que, tomando en cuenta estas características, las cinco especies de *Agave* fueron divididas en tres 3 grandes grupos (Tabla 1.2); donde el grupo I contiene las especies de *Agave* con los *DP* más altos (en comparación a los grupos II y III) así como la mayor cantidad de moléculas tipo agavina con respecto a la tipo graminano (4:1), mientras que en el grupo II esta relación disminuye a (2:1) y por último, el grupo III exhibe cantidades equimolares de

estas estructuras. Como se puede apreciar en la Tabla 1.2, el *A. tequilana* de Jalisco (6 años de edad) se encuentra dentro del grupo I (por lo que contiene más moléculas del tipo agavina en relación al tipo graminano) y presenta un  $DP$  promedio de 18.

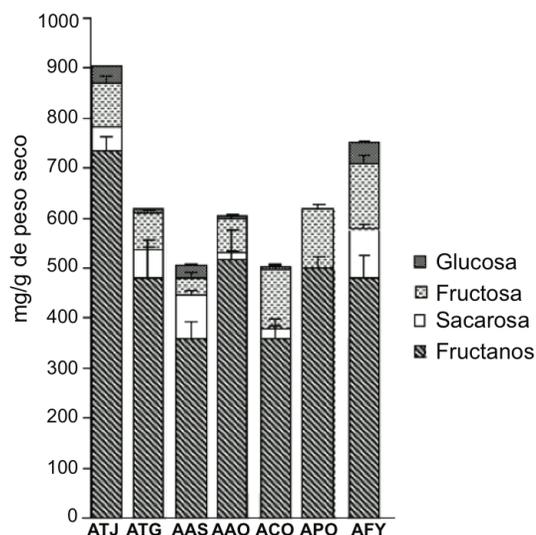


Figura 1.4: Contenido de fructanos y carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) en cinco especies de *Agave* creciendo en distintas regiones de México. ATJ (*Agave tequilana* Jalisco); ATG (*A. tequilana* Guanajuato); AAS y AAO (*A. angustifolia* de Sonora y Oaxaca, respectivamente); ACO (*A. cantala* Oaxaca) y AFY (*A. fourcroydes* Yucatán) [17].

Tabla 1.2: Agrupación de las especies de *Agave* en función a la relación agavinas/graminanos y su grado de polimerización promedio.

Grupo	Especie	Moléculas tipo (agavina/graminano)	$DP_{promedio}$
I	<i>A. potatotum</i> Oaxaca	4.88	15
	<i>A. angustifolia</i> Sonora	4.56	13
	<i>A. tequilana</i> Jalisco	3.95	18
	<i>A. angustifolia</i> Oaxaca	3.76	32
II	<i>A. fourcroydes</i> Yucatán	2.23	7
	<i>A. cantala</i> Oaxaca	2.03	11
III	<i>A. tequilana</i> Guanajuato	0.92	7

Datos tomados de la referencia [17].

### 1.2.2.1. Metabolismo de los fructanos en el *Agave tequilana* Weber var. azul

Mellado-Mojica & López [30] estudiaron el metabolismo de los fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul con la finalidad de conocer las variaciones en el contenido de carbohidratos, así como el tipo de estructura presentes en las plantas a lo largo de su ciclo biológico en campo, encontrando diferencias en el contenido, tipo, grado de polimerización y estructuras moleculares de los fructanos almacenados en plantas de 2 a 7 años de edad. Los autores establecieron que la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa que son almacenadas en el mesontle (piña) de *Agave*, disminuye con la edad de la planta, mientras que la concentración de fructanos incrementa con la madurez de la misma (Figura 1.5).

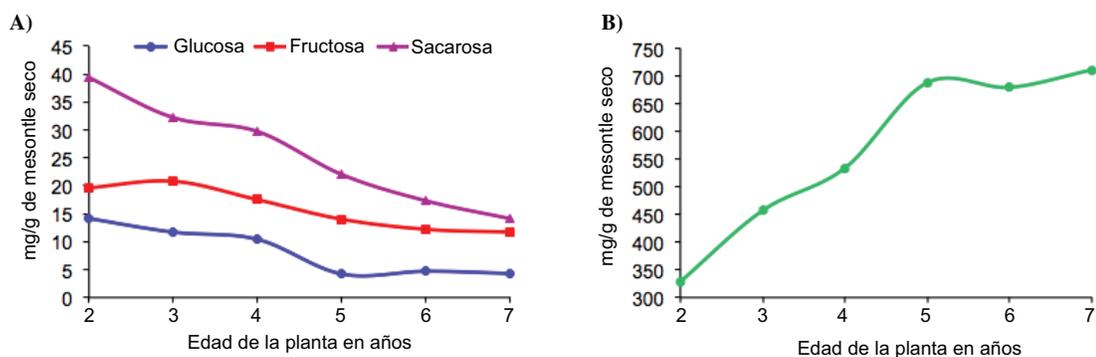


Figura 1.5: Contenido de carbohidratos y fructanos en plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul a lo largo de su ciclo biológico en campo. A) Contenido de carbohidratos y B) Contenido de fructanos [30].

En este mismo estudio, los autores reportaron que el *DP* mostró un incremento en un rango de 6 a 23 en plantas de 2 a 7 años de edad y que las estructuras moleculares de los fructanos de *Agave* se vuelven más complejas y ramificadas conforme la planta envejece. De manera que, las plantas jóvenes (2-4 años) almacenan principalmente fructanos de bajo *DP* con pocas ramificaciones, mientras que las plantas cercanas a la madurez, almacenan principalmente agavinas de alto *DP* con abundantes ramificaciones. En la Tabla 1.3 se muestra como varía el *DP* promedio de los fructanos

de *Agave*, así como la proporción de las moléculas tipo agavina y graminano con respecto a la edad de la planta. Como se observa en la Tabla 1.3, la proporción de agavinas/graminanos aumenta con la edad de la planta; específicamente, en las plantas de *Agave* de 4 años de edad, se encuentra la presencia de 2 moléculas del tipo agavina por cada molécula del tipo graminano con un  $DP$  promedio de 8.

Tabla 1.3: Variación del grado de polimerización y proporción de agavinas/graminanos en plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul de 2-7 años de edad.

Edad de la planta de <i>Agave</i> (años)	$DP_{promedio}$	Proporción de moléculas (agavinas/graminanos)
2	$6 \pm 1$	1
3	$7 \pm 1$	2
4	$8 \pm 1$	2
5	$10 \pm 2$	3
6	$16 \pm 6$	3
7	$23 \pm 2$	4

Datos tomados de la referencia [30].

### 1.2.3. Proceso de extracción de fructanos de *Agave*

Uno de los primeros protocolos establecidos para la extracción de fructanos de *Agave* y el uso posterior de éstos como prebióticos en estudios *in vitro* o *in vivo*, fue el de López *et al.* [18]. Este protocolo de extracción consta de tres etapas; en la primera, la piña de *Agave* se parte en trozos pequeños a los cuales se les adiciona una solución etanol-agua al 80 % en una proporción 1:3 (peso/volumen). Posteriormente, esta solución se mantiene en agitación continua por 1 h a una temperatura de 75 °C. Al término de este proceso, el sobrenadante se filtra y la piña es sometida a dos extracciones consecutivas (segunda y tercera etapa respectivamente), empleando 50 mL de agua a 70 °C por 30 min. Los tres sobrenadantes se mezclan y se agrega cloroformo con la finalidad de retirar la fracción lipídica de éstos. La fase acuosa se separa y se coloca en un rotavapor con el objetivo de concentrar la solución. Finalmente, el extracto de *Agave* es liofilizado para obtener los fructanos en polvo. No obstante, el uso de cloroformo en este protocolo no era muy bien aceptado, debido

a que los fructanos eran destinados para estudios con ratones. Por lo que, se optó por realizar la extracción de fructanos empleando únicamente agua caliente (60 °C) [30]. Sin embargo, este proceso (a nivel laboratorio) consume mucho tiempo, sobre todo al momento de concentrar la solución de *Agave* en el rotavapor (lo cual toma incluso semanas, por la cantidad de agua que se tiene que evaporar). Además, otro cuello de botella importante es el secado del extracto de *Agave* mediante liofilización, por lo que se han utilizado otras alternativas como el secado en horno al vacío. Sin embargo, se ha reportado que durante el proceso de secado en horno, existe una hidrólisis de los fructanos, incrementando el contenido de fructosa [31].

Por otra parte, a nivel semi industrial o industrial, la extracción de fructanos de *Agave* comúnmente se lleva a cabo con agua caliente (70-99 °C), con objeto de inactivar las enzimas hidrolíticas presentes en la piña de *Agave* y debido a que la solubilidad de los fructanos disminuye con el agua fría. El proceso continúa con la separación de la pulpa de *Agave* de la solución, mediante filtración o centrifugación. El extracto obtenido se somete a un cambio de pH (neutro) para evitar la hidrólisis ácida de los fructanos y llevar a cabo la precipitación de algunas proteínas y coloides. Luego, el extracto de *Agave* es filtrado, clarificado, concentrado y posteriormente se seca mediante un secador por aspersion para la obtención del producto final [32–36].

#### ***1.2.4. Métodos de caracterización de fructanos de Agave***

Aunque existen varias técnicas disponibles para el análisis de los fructanos de *Agave*, ningún método proporciona su análisis completo, por lo tanto, a menudo es necesario una combinación de diferentes técnicas para su caracterización. Una de las técnicas cualitativas frecuentemente utilizada para caracterizar fructanos de manera fácil, económica y rápida, es la cromatografía en capa fina (*TLC*), la cual permite trabajar varias muestras a la vez; la separación de los fructanos se lleva a cabo en función del *DP* [37, 38], y dependiendo de la fase estacionaria (la cual generalmente es silica gel), así como de la fase móvil empleada, es posible separar los isómeros de un solo *DP*; sin embargo, solo se han logrado separar los isómeros presentes en fructanos con un  $DP < 5$  [39–41].

El uso de la *TLC* puede ser combinado con el método enzimático/espectrofotométrico con el objetivo de tener una caracterización más completa de los fructanos que se están analizando. El método enzimático/espectrofotométrico determina el porcentaje de fructanos presente en una muestra. Este método es muy preciso, reproducible, se realiza fácilmente y se puede trabajar con varias muestras a la vez. El ensayo consiste en hidrolizar la sacarosa que se encuentra en la muestra a glucosa y fructosa mediante sacarasa. Después, la glucosa y fructosa se reducen a polioles. Posteriormente, los fructanos presentes en la muestra son hidrolizados a glucosa y fructosa empleando una fructanasa (exo-inulinasa). Los azúcares reductores producidos, se determinan en un espectrofotómetro, después de la reacción con hidrazida de ácido *p*-hidroxibenzoico [42]. Sin embargo, la cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, acoplada a un detector de pulso amperométrico (*HPAEC-PAD*) es la herramienta analítica usada hoy en día para la caracterización de fructanos de *Agave* [17, 30, 32]. Mediante *HPAEC-PAD* se puede analizar los fructanos directamente sin necesidad de derivatizarlos y cuantificar hasta en un nivel de picomoles [43]. Además, este tipo de cromatografía permite diferenciar algunos de los isómeros presentes en un mismo *DP* [30]. El principio de esta técnica radica en el hecho de que los carbohidratos son ácidos débiles con un valor de  $pK_a$  en un rango de 12-14, y en consecuencia, a un pH alto éstos pueden ser transformados a oxi-aniones, pudiéndose separar fácilmente utilizando columnas de intercambio aniónico de alta eficiencia [23, 44, 45]. Durante el análisis, los fructanos son eluidos empleando un gradiente de NaOH/CH<sub>3</sub>COONa. El elevado pH del NaOH (13-14), convierte los grupos hidroxilo en oxi-aniones. El grado de interacción del oxi-anión con la resina de intercambio aniónico determina los tiempos de retención de los fructanos. El sistema *PAD* oxida y detecta al fructano cuando éste pasa a través del detector. No obstante, esta herramienta muestra una reducción en la sensibilidad del detector *PAD* en la separación de fructanos con alto *DP*, debido a que el detector en sí, mide los electrones liberados durante la oxidación de los carbohidratos en el electrodo de oro. Por lo que se ha sugerido que sí los fructanos son de *DP* grande habrá menos electrones liberados por unidad fructosil, por lo que el rendimiento del *PAD* por  $\mu\text{g}$

de fructano disminuye [43].

### ***1.3. Efecto prebiótico de los fructanos tipo inulina***

Un prebiótico es un ingrediente alimenticio que afecta benéficamente al hospedero por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, promoviendo una mejora en la salud del hospedero [46, 47]. Todos los fructanos son considerados prebióticos, los cuales inducen cambios específicos en la composición de la microbiota intestinal; pero, para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico debe de cumplir con tres criterios: 1) No debe ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal, 2) Ser fermentado por la microbiota intestinal y 3) Estimular el crecimiento de bacterias intestinales asociadas con la salud del hospedero [48, 49]. Por lo tanto, el enfoque de los prebióticos es hacia la administración de compuestos alimenticios que no se degraden en la parte superior del tracto gastrointestinal, considerando que muchos microorganismos positivos para la salud del huésped ya residen en el colon. El efecto prebiótico de los fructanos tipo inulina se ha confirmado en estudios previos (*in vitro* e *in vivo*), en los cuáles muestran que estos fructanos inducen un incremento significativo de las bacterias probióticas *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (bacterias consideradas promotoras de la salud) [50–53].

#### ***1.3.1. Efectos sistémicos de los fructanos (peso corporal, glucosa, triglicéridos y colesterol)***

Numerosos trabajos apuntan hacia la posibilidad de que los fructanos tipo inulina a través de la modulación de la microbiota intestinal y a los ácidos grasos de cadena corta (*SCFA*; productos de la fermentación de los fructanos en el colon), específicamente el ácido butírico, puedan ejercer acciones fisiológicas a nivel sistémico, relacionadas con una disminución de peso corporal, así como en la concentración de glucosa en sangre [54–57] (una explicación con más detalle sobre el mecanismo se abordará en la sección 1.3.4). En modelos animales, el consumo de fructanos también muestra efectos benéficos sobre el metabolismo lipídico, a través de una disminución

en los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma sanguíneo [58–63], lo cual ha sido atribuido a los *SCFA*, de manera puntual a los ácidos acético y propiónico, los cuales tienen fuertes implicaciones en la salud del individuo [64]. El ácido propiónico inhibe la colesterogénesis y lipogénesis en el hígado, mientras que el ácido acético las estimula [64–67]; por lo que, un aumento en la proporción (propiónico/acético) que alcance el hígado, tendrá mayor potencial en la disminución de triglicéridos y colesterol en el individuo.

### ***1.3.2. Modulación de la microbiota intestinal***

El intestino de un humano adulto puede albergar un número casi inconcebible de microorganismos. El tamaño de la población puede alcanzar cerca de los 100 trillones de bacterias [68]. Esta gran población de microorganismos juega un rol muy importante en la salud y nutrición del huésped, no obstante, las especies de bacterias que componen la microbiota intestinal responden a los cambios de dieta determinada por la competencia de sustratos y por la tolerancia a las condiciones del intestino [69]. En la sección 1.3 se mencionó que los fructanos tipo inulina estimulan el crecimiento de las bacterias probióticas *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, las cuales ejercen un efecto benéfico en la salud del hospedero. Pero, un reciente estudio realizado por Everard *et al.* [70] mediante el análisis de secuenciación de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal, mostró que la ingesta de una dieta suplementada al 10 % con fructanos tipo inulina por 8 semanas, no solamente estimula el crecimiento de *Bifidobacterium* spp. en ratones sanos, sino que también se incrementan otros géneros de bacterias tales como *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Dehalobacterium* y *Sutterella* en el ciego de los animales, con respecto a los ratones que solo consumen la dieta estándar sin suplementar. Interesantemente, dentro de estos nuevos géneros de bacterias que son enriquecidos bajo una dieta suplementada con fructanos, la abundancia de *Akkermansia muciniphila* ha sido correlacionada con mejoras metabólicas en el hospedero [71, 72].

Por otra parte, Mao *et al.* [73] alimentaron ratones sanos con una dieta estándar suplementada al 5 % con fructanos tipo inulina por 3 semanas, mostrando que estos

prebióticos tienen la capacidad de modular la microbiota de las heces de los roedores, a pesar de que el porcentaje de fructanos suplementado fue más pequeño así como el tiempo de ingesta, con respecto al trabajo de Everard *et al.* [70]. Los autores observaron que además del incremento significativo del género *Bifidobacterium*, la abundancia relativa del género *Olsenella* aumentó de manera significativa (incluso más que *Bifidobacterium*) en las heces de los animales que recibieron la dieta suplementada con fructanos con respecto a los ratones control (Figura 1.6). Pero, debido a que no hay reportes previos del enriquecimiento de *Olsenella* bajo un tratamiento con fructanos, los investigadores concluyen que es necesaria más investigación al respecto para conocer el papel que está desempeñando este género en la salud del hospedero.

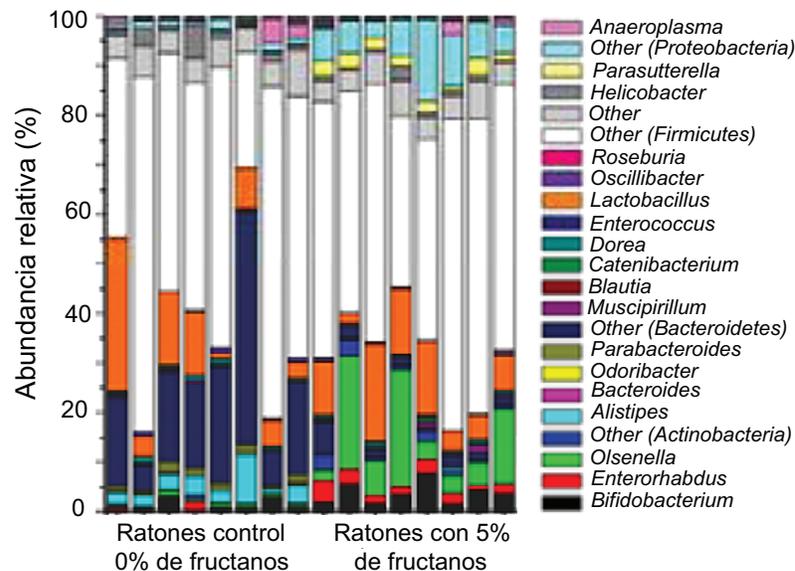


Figura 1.6: Cambios en la microbiota de las heces de ratones alimentados por 3 semanas con una dieta estándar suplementada al 5% con fructanos tipo inulina [73].

### 1.3.2.1. Secuenciación de alto rendimiento para el estudio de la microbiota

Los fructanos tienen la capacidad de inducir cambios específicos en la composición de la microbiota intestinal del individuo, por lo que es importante conocer cuáles fueron

los cambios en la microbiota intestinal derivados del consumo de estos prebióticos. La aparición de las denominadas técnicas de secuenciación de alto rendimiento (*high-throughput sequencing technologies*) marcaron un punto de inflexión en el estudio de la microbiota intestinal. Antes de la llegada de estas técnicas de secuenciación, el estudio de la diversidad bacteriana se realizaba aislando y cultivando en medios de crecimiento selectivo los distintos miembros de la comunidad microbiana, lo cual aportaba una visión sesgada de la composición bacteriana de la microbiota, debido al desconocimiento de los requerimientos nutricionales de determinados subgrupos de bacterias y por ende a la dificultad de cultivarlos en medios habituales. La ventaja de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento es su independencia del cultivo en medios biológicos, permitiendo una visión global a través del análisis del material genético presente en el medio que se quiera estudiar [74]. Esta visión más amplia permite una descripción detallada de los diferentes miembros que forman la comunidad bacteriana y de su abundancia relativa. De manera general, estas técnicas consisten en la extracción del ADN de una muestra biológica, seguido de la amplificación y secuenciación de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal. El gen 16S está presente en todas las bacterias y contiene regiones constantes y variables, por lo tanto, las similitudes y diferencias en la secuencia de nucleótidos de este gen, permiten la caracterización taxonómica precisa de las bacterias que componen una comunidad, pudiendo discernir entre estratos de phylum hasta nivel de género y especie. El análisis de las secuencias del gen 16S puede ser realizado mediante programas estadísticos tal como *QIIME* (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) [75, 76]. Este software puede ser instalado y ejecutado en una laptop para analizar millones de secuencias provenientes de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal de la comunidad microbiana a estudiar. Las secuencias sin procesar (generadas por el secuenciador) se ingresan en *QIIME* y mediante comandos (*scripts*) se obtiene el perfil taxonómico de las muestras. Además, también se puede calcular y comparar la diversidad microbiana presente en los diferentes grupos de muestras. El análisis de las secuencias en *QIIME* puede ser realizado de dos maneras; de forma cerrada, en la cual las secuencias del gen 16S de la muestra a estudiar,

se comparan con las secuencias de referencia de bases de datos o de forma abierta (*de novo*) para secuencias que no están presentes en las bases de datos. Hoy en día, la secuenciación del gen 16S es empleada enormemente como una herramienta para explorar el contenido microbial de una muestra, debido a su costo relativamente bajo y al desarrollo de software especializado para el análisis de estas secuencias. Esta tecnología es capaz de responder cuáles microorganismos están presentes en una muestra así como la abundancia relativa de éstos.

### ***1.3.3. Producción de ácidos grasos de cadena corta en el contenido colónico***

Los fructanos son prebióticos resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas, debido a la configuración  $\beta$  del carbono 2 anomérico del carbohidrato en sus moléculas de fructosa; por lo tanto, los fructanos se consideran como carbohidratos no digeribles [77]. La microbiota colónica fermenta materia orgánica que no puede ser digerida por el hospedero en la parte superior del tracto gastrointestinal. Los principales productos del metabolismo de los fructanos son *SCFA* lineales, principalmente acético, propiónico y butírico [78] en una proporción aproximada de 3:1:1 [79]. Sin embargo, también se producen otros productos de fermentación tales como lactato, succinato y etanol, los cuales son intermediarios en el proceso de la fermentación global de la microbiota y son en diverso grado metabolizados a *SCFA* por interacciones y/o colaboración de las especies presentes en el ecosistema, por lo que generalmente no se acumulan en gran medida en el intestino [80]. La fermentación de los carbohidratos también genera algunos gases como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2$ , además de calor [78, 81].

La producción de *SCFA* es determinada por muchos factores, incluyendo la composición química de los sustratos fermentables, la cantidad de sustrato disponible, su forma física (tamaño de partícula, solubilidad, asociación con otros complejos no digeribles), las especies bacterianas que componen la microbiota, así como factores ecológicos (competitividad e interacciones entre diferentes grupos de bacterias) y el tiempo de tránsito intestinal [82–87].

La presencia de los carbohidratos y sus productos de fermentación, pueden alterar

la fisiología colónica. El primer efecto de los *SCFA* sobre la función colónica es el resultado de su absorción y metabolismo por los colonocitos, aunque los *SCFA* son también sustratos metabólicos para otros tejidos del hospedero [88].

Por otra parte, la microbiota y sus productos metabólicos (*SCFA*) interactúan con el hospedero en diferentes maneras, influenciando la homeostasis y resultados en la salud. Por ejemplo, la caída de pH debido a la fermentación de los fructanos crea un ambiente más ácido en el ciego y colon del individuo, lo cual favorece la proliferación de ciertas bacterias benéficas tales como *Bifodobacteria* y *Lactobacilli* e inhibe el crecimiento de bacterias patogénicas sensibles al pH tales como *E. coli* y *Salmonella* [89, 90].

La mayoría de las bacterias intestinales utilizan la ruta glicolítica para obtener energía de los fructanos, los cuales son inicialmente convertidos a piruvato y acetil-CoA (Figura 1.7). Estos metabolitos son los puntos de control clave en el metabolismo de la fermentación, los cuales pueden ser convertidos en un gran número de productos como son: acetato, propionato, butirato y lactato [91]. La Tabla 1.4 muestra los productos metabólicos de los principales grupos de bacterias sacarolíticas presentes en el colon.

Aunque el papel principal de los *SCFA* es como fuente de energía para las células del epitelio intestinal, existen receptores específicos para estos metabolitos presentes en una variedad de tejidos, los cuales sugieren roles fisiológicos adicionales, así como posibles efectos terapéuticos en los trastornos metabólicos e inflamatorios tales como obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes [94]. Los *SCFA* actúan a través de los receptores acoplados a proteínas G (*GPRs*), en particular *GPR43* y *GPR41* denominados también receptores de ácidos grasos libres *FFA2* y *FFA3*, respectivamente. *FFA2* es igualmente sensible a acetato, propionato y butirato mientras que *FFA3* es sensible a los *SCFA* en el siguiente orden: propionato>butirato>acetato. *FFA2* es expresado por los leucocitos, adipocitos, músculo esquelético, corazón, bazo y células L del colon [95–98], mientras que *FFA3* es expresado por el tejido adiposo, células mononucleares de sangre periférica, páncreas, bazo, médula ósea y ganglios

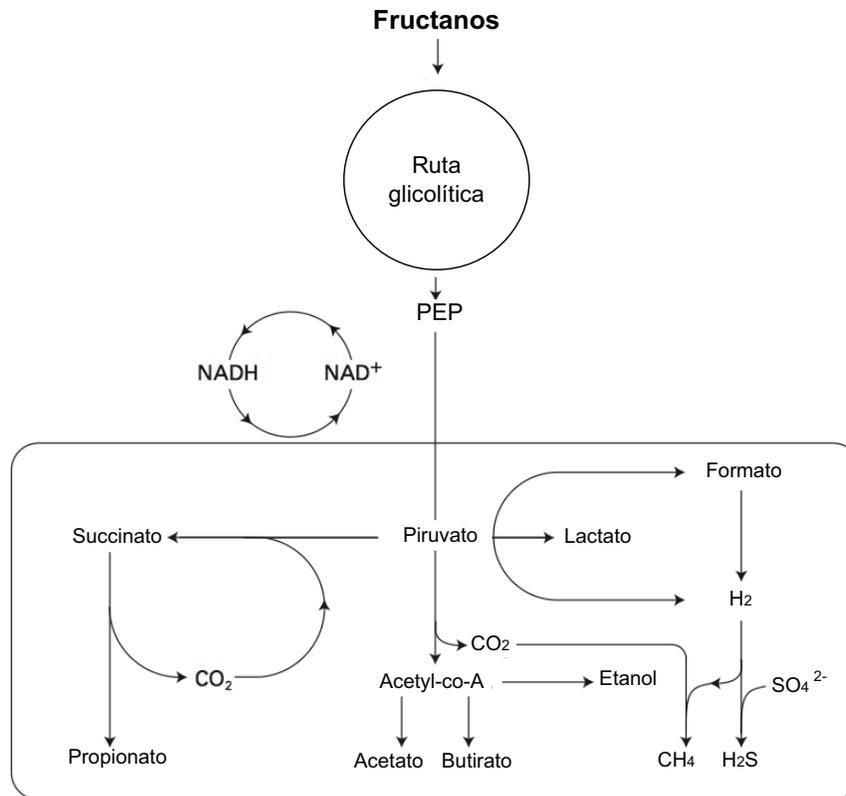


Figura 1.7: Diagrama simplificado de las principales rutas de fermentación de los fructanos en el colon. PEP: Fosfoenolpiruvato; adaptado de la referencia [91].

linfáticos [95, 96, 99, 100] influyendo en una gran variedad de funciones biológicas incluyendo inflamación y la secreción de hormonas involucradas en el control del apetito. Los *SCFA* (acético y propiónico) productos de la fermentación en el ciego y colon del individuo, pasan a través de vena porta hacia el hígado, en donde el incremento en la proporción de propionato/acetato puede potencialmente disminuir la lipogénesis [101–103], y es debido a esto, que el individuo presenta una reducción de triglicéridos y colesterol en sangre. Por otra parte, el ácido butírico es la principal fuente de energía de los colonocitos, por lo cual se tendrá un incremento de células L. Debido a que las células L secretan el péptido similar al glucagón 1 (*GLP-1*), habrá también un aumento de éste en sangre. *GLP-1* activa señales de saciedad en el cerebro del individuo y correlaciona de manera negativa con grelina (la cual envía señales de hambre). Por lo tanto, si hay un aumento en los niveles de *GLP-1* en sangre, grelina va a disminuir; generando en el cerebro mayor saciedad y en conse-

Tabla 1.4: Principales grupos de bacterias sacarolíticas presentes en el colon del individuo y sus productos de fermentación.

Microorganismo	Productos metabólicos
Atopobium	A, L
Bacteroides	A, P
Bifidobacteria	A, L
Butyrivibrio	A, B
Clostridia	A, P, B, L
Enterobacteria	A, L
Eubacteria	A, B, L
Faecalibacteria	B, L
Fusobacteria	A, B, L
Lactobacilli	A, L
Prevotella	P
Propionibacteria	A, P
Roseburia	B
Ruminococci	A, L

A: Acetato; P: Propionato; B: Butirato; L: Lactato.  
 Datos tomados de las referencias [92, 93].

cuencia una disminución en la ingesta de alimento, impactando en la disminución de peso corporal del individuo. Además de activar señales de saciedad en el cerebro, la hormona *GLP-1* es considerada una incretina, es decir, esta hormona tiene la capacidad de inducir la liberación de insulina en el páncreas y entonces, si hay un aumento de insulina, los niveles de glucosa en sangre del individuo muestran una disminución (Figura 1.8).

Los datos anteriores, muestran que un incremento de los *SCFA* debido a la ingesta de fructanos, tiene un gran potencial para la prevención y/o el manejo de algunas enfermedades o padecimientos, tales como sobrepeso, síndrome metabólico, obesidad y diabetes.

#### ***1.3.4. Modulación de hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito***

Las hormonas son fundamentales en la regulación del apetito y el peso corporal. A corto plazo, el control de la ingesta de alimento está principalmente controlado por las vías de señalización que emanan del tracto gastrointestinal, incluido el péptido

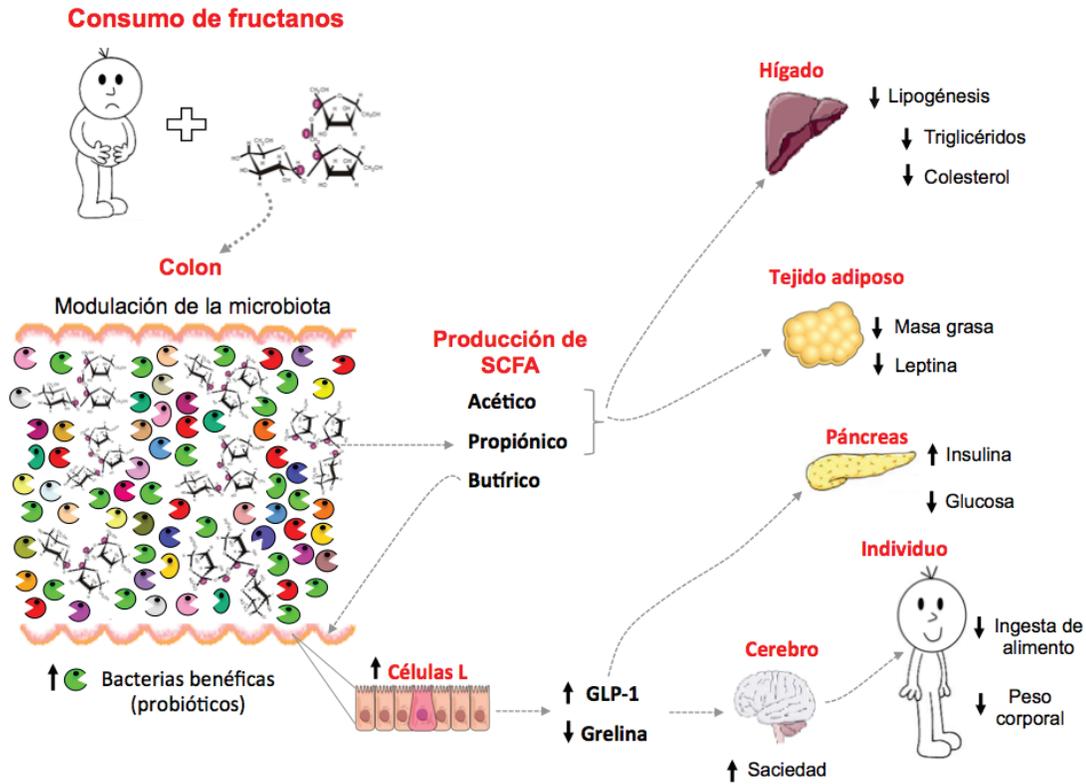


Figura 1.8: Mecanismo propuesto por el cual los fructanos a través de los SCFA inducen un efecto beneficioso en la salud del individuo. Adaptado de la referencia [73].

orexigénico grelina y los péptidos anorexigénicos colecistoquinina (*CCK*), *GLP-1*, el péptido YY (*PYY*), oxintomodulina (*OXM*), entre otros. En la Figura 1.9 se puede observar el sitio donde se están secretando cada una de estas hormonas. Grelina es la única hormona gastrointestinal orexigénica conocida; los niveles de grelina circulante se incrementan en el período de ayuno y caen rápidamente después de ingerir alimento [104, 105]. Los péptidos *PYY* y *GLP-1* son secretados en las células L del intestino (principalmente en el íleon y colon) en respuesta a la ingesta de nutrientes [106, 107]. Los niveles circulantes de estas hormonas se elevan después de una comida y decaen en el estado de ayuno. Estudios en ratones y humanos han demostrado que ambas hormonas están involucradas en la disminución de la ingesta de alimento y por lo tanto, se han convertido en el objetivo de muchas terapias anti-obesidad [108–111]. Por otra parte, en el control de la ingesta a largo plazo, parecen ser primordiales las señales que se emanan del tejido adiposo (leptina) [105]. La leptina es

secretada por adipocitos en niveles circulantes proporcionales a la masa grasa [106]. Interesantemente, los fructanos además de cambiar la microbiota intestinal y de incrementar la concentración de *SCFA* en el colon, también tienen la capacidad de modular algunas de las hormonas involucradas en la regulación del apetito. Estudios realizados en ratas sanas, confirman que el consumo de una dieta estándar suplementada al 10 % con fructanos tipo inulina por un lapso de 3-4 semanas, promueve en los animales un incremento de las hormonas *GLP-1* [55-57, 112] y *PYY* [56] e induce una disminución de grelina [56, 57] en plasma con respecto a las ratas control. Resultados similares han sido obtenidos en investigaciones con humanos sanos; en las cuáles las personas recibieron un suplemento de 16 g de fructanos/día, por un lapso de 2 semanas. Al término del ensayo, las personas que consumieron la dieta suplementada con fructanos, registraron un incremento en la concentración de las hormonas *GLP-1* y *PYY* en plasma (lo cual fue asociado con una mayor sensación de saciedad y menor ingesta de energía) con respecto a los individuos que recibieron un placebo [54, 113].

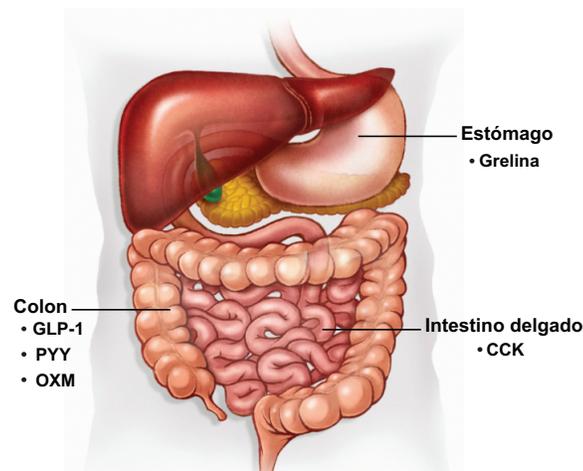


Figura 1.9: Hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito. Adaptado de la referencia [105].

### 1.3.4.1. Efecto del grado de polimerización sobre la modulación de las hormonas *GLP-1* y *grelina*

Con el objetivo de determinar si el *DP* del fructano ejerce un efecto en la ingesta de alimento, así como en la modulación de las hormonas *GLP-1* y *grelina*, Cani *et al.* [57] suplementaron una dieta estándar con tres fructanos tipo inulina de diferente *DP*. Los fructanos empleados fueron: de bajo *DP* (<10), de alto *DP* (>10) y una mezcla 1:1 de fructanos de bajo y alto *DP*, concluyendo que el *DP* del fructano no tiene un impacto sobre la ingesta de alimento, debido a que todas las ratas que consumieron fructanos disminuyen su ingesta de alimento con respecto al grupo control. Sin embargo, observaron que el *DP* impacta en la modulación de *GLP-1* y *grelina*, ya que únicamente los fructanos de bajo *DP* (<10 y la mezcla 1:1) incrementaron de manera significativa la concentración de *GLP-1* en el colon proximal y disminuyen la concentración de *grelina* en sangre, con respecto a las ratas que consumieron la dieta estándar o la suplementada con fructanos de un *DP*>10 (Figura 1.10).

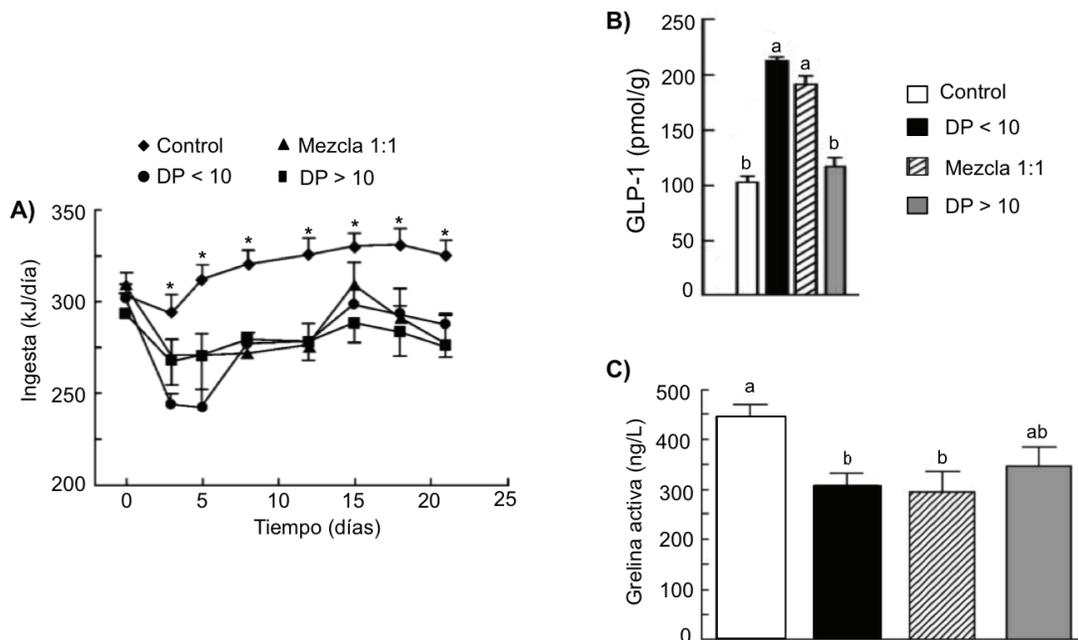


Figura 1.10: Importancia del grado de polimerización del fructano sobre la modulación de las hormonas *GLP-1* y *grelina*, involucradas en la regulación del apetito [57].

#### **1.4. Efecto prebiótico de los fructanos de *Agave***

Urías-Silvas & López [46] analizaron el potencial prebiótico de cinco diferentes especies de *Agave* utilizando bacterias probióticas del género *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*. Las especies de *Agave* analizadas fueron: *A. tequilana* (de Jalisco y Guanajuato), *A. angustifolia* (de Sonora y Oaxaca), *A. potatorum* y *A. cantala* (de Oaxaca) y *A. fourcroydes* (de Yucatán). De los resultados obtenidos, los autores concluyen que los fructanos ramificados de *Agave* favorecen el crecimiento *in vitro* de ambos géneros de bacterias. Se observó que los fructanos de *Agave* de bajo *DP* (tal es el caso de *A. tequilana* de Guanajuato y *A. fourcroydes* de Yucatán [17]) muestran una mayor capacidad prebiótica en comparación a fructanos de alto *DP*. Resultados similares fueron obtenidos por Santiago-García & López [114], utilizando fructanos de *A. angustifolia* de bajo y alto *DP*. Estudios realizados posteriormente, empleando fructanos extraídos de *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. salmiana* confirman lo previamente establecido por Urías-Silvas & López; que los fructanos de *Agave* tienen una alta capacidad prebiótica [34, 114–116].

##### **1.4.1. Impacto en la ganancia de peso corporal y niveles de glucosa y colesterol en sangre**

El primer estudio *in vivo* realizado para investigar el efecto prebiótico de los fructanos de *Agave*, fue realizado por Urías-Silvas *et al.* [117] empleando ratones sanos. Los autores utilizaron fructanos de *Agave tequilana* del estado de Guanajuato (los cuáles se caracterizan por presentar un bajo *DP* [17] y por mostrar un alto potencial prebiótico *in vitro* [46]); y compararon su efecto con respecto a los fructanos tipo inulina de bajo *DP*. Los fructanos de *Agave* y tipo inulina fueron suplementados al 10% en una dieta estándar y administrados por 5 semanas a los animales. Al término de este tiempo, observaron que los ratones que consumieron los fructanos ramificados de *A. tequilana* presentaron una reducción en la ingesta de alimento, así como en la ganancia de peso corporal (similar a la mostrada por los animales que recibieron la dieta suplementada con los fructanos lineales) con respecto al grupo

control (Figura 1.11).

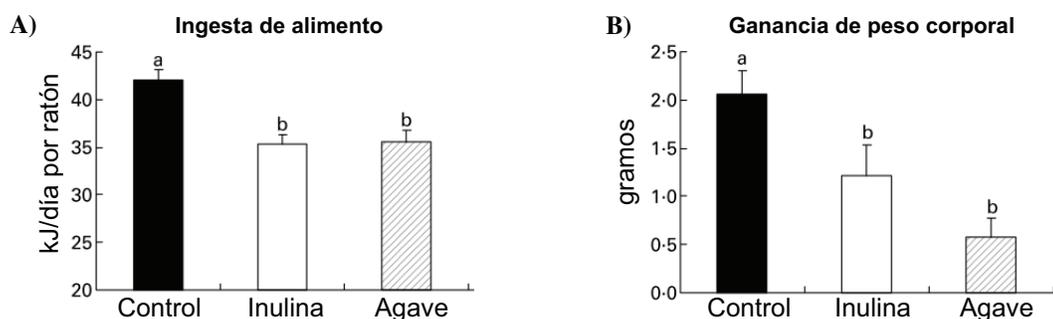


Figura 1.11: Efectos sistémicos de los fructanos ramificados de *Agave tequilana* en ratones sanos. A) Disminución de la ingesta de alimento y B) Ganancia de peso corporal [117].

Sorprendentemente, los fructanos de *Agave* y tipo inulina exhibieron la misma capacidad para disminuir los niveles de glucosa y colesterol en sangre de los ratones, debido a que ambos carbohidratos disminuyeron de manera significativa estos parámetros, con respecto a los ratones control. Únicamente el grupo de ratones que recibió la dieta suplementada con los fructanos lineales, exhibieron la menor concentración de triglicéridos, con relación a los animales alimentados con fructanos de *Agave* y al grupo control (Tabla 1.5).

Tabla 1.5: Efecto del consumo de una dieta suplementada al 10 % con fructanos de *Agave* sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de ratones sanos.

Grupo	Glucosa (mM)	Triglicéridos (mM)	Colesterol (mM)
Control	10.36 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.88 ± 0.12 <sup>a</sup>
Inulina	8.44 ± 0.38 <sup>b</sup>	0.97 ± 0.08 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.04 <sup>b</sup>
<i>Agave</i>	8.76 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.24 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.14 <sup>b</sup>

Datos tomados de la referencia [117].

Resultados similares fueron reportados por Santiago-García & López [118], quienes alimentaron ratones sanos con una dieta suplementada al 10 % con fructanos de 2 especies de *Agave* (*A. angustifolia* Haw. y *A. potatorum* Zucc.; ambos de bajo DP)

por 4 semanas. En este estudio, también se emplearon fructanos tipo inulina de bajo *DP*, como un control positivo. Se observó que no hubo una diferencia significativa en la ingesta de alimento y peso corporal de los roedores que consumieron fructanos, es decir, los fructanos de *A. angustifolia* y *A. potatorum* tienen la misma capacidad que los fructanos tipo inulina, de inducir en el ratón una menor ingesta de alimento y ganancia de peso corporal, con respecto a los animales alimentados solo con dieta estándar. Encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa y triglicéridos determinados en plasma sanguíneo; reportando que, únicamente los animales que consumieron fructanos de *Agave* muestran la menor concentración de glucosa en sangre y solo el grupo de roedores que se alimentó con fructanos de *A. angustifolia* exhiben un decremento significativo en los niveles de triglicéridos, en relación a la dieta estándar (Tabla 1.6).

Tabla 1.6: Efecto del consumo de una dieta suplementada al 10 % con fructanos de *Agave angustifolia* y *potatorum* de bajo grado de polimerización sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y lipoproteínas de baja (*LDL*) y alta (*HDL*) densidad en sangre de ratones sanos.

<b>Dieta</b>	<b>Glucosa</b> (mM)	<b>Triglicéridos</b> (mM)	<b>LDL</b> (mM)	<b>HDL</b> (mM)
Estándar	8.79 ± 0.55 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>
<i>A. angustifolia</i>	7.00 ± 0.35 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.05 <sup>b</sup>
<i>A. potatorum</i>	7.05 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.16 <sup>a,b</sup>	1.33 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.06 <sup>b</sup>
Inulina	7.98 ± 0.24 <sup>a,b</sup>	0.66 ± 0.07 <sup>a,b</sup>	1.16 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>b</sup>

Datos tomados de la referencia [118].

Por último, Santiago-García & López observaron que los fructanos ramificados y lineales, tienen la capacidad de disminuir la concentración de lipoproteínas de baja densidad (*LDL*) e incrementar las de alta densidad (*HDL*) en el plasma sanguíneo de los animales, con respecto a los ratones que consumieron la dieta estándar (Tabla 1.6), lo cual es importante, ya que las *LDL* son los que mayores problemas representan para la salud.

Por otra parte, García-Curbelo *et al.* [119] evaluaron el efecto de los fructanos de *A. fourcroydes* de Cuba, en ratones sanos. Confirmando lo previamente reportado

para las especies de *Agave* mexicanas; es decir, que los fructanos de *A. fourcroydes* de Cuba, disminuyen significativamente los niveles de glucosa y triglicéridos en la sangre de los roedores (incluso, el decremento en estos parámetros fue mayor, al mostrado por los fructanos tipo inulina) con respecto al grupo que se alimentó con dieta estándar.

Estos estudios muestran el enorme potencial de los fructanos de *Agave* de bajo *DP*, en la disminución del peso corporal y en la modulación de algunos parámetros metabólicos (glucosa, triglicéridos y colesterol) en la sangre de los ratones.

#### ***1.4.2. Incremento en la concentración de ácidos grasos de cadena corta y disminución del pH en el contenido colónico***

Los fructanos de *Agave* son fermentados en el ciego y colon por la microbiota sacrolítica presente en estos sitios, siendo sus principales productos de fermentación *SCFA*. Interesantemente, a pesar de las enormes diferencias presentes a nivel estructural entre los fructanos tipo inulina y los fructanos ramificados de *Agave*; ambos prebióticos producen ácido acético, propiónico y butírico en una proporción 3:1:1 como los productos principales de la fermentación [120]. Estudios previos demuestran que el consumo de una dieta suplementada al 10 % con fructanos de *Agave*, incrementa significativamente la concentración de los *SCFA* en el contenido del ciego y colon de ratones saludables [118–120]. Este aumento en los niveles de *SCFA* desempeña un papel muy importante en la determinación del ambiente intestinal, influenciando una caída significativa del pH, en el contenido del ciego y colon de los roedores [118–120] y consecuentemente mejorando la salud del hospedero mediante la estimulación del crecimiento de bacterias benéficas y una disminución en la cantidad de bacterias patogénicas [89, 90].

#### ***1.4.3. Cambios en la microbiota intestinal y modulación de las hormonas grelina y GLP-1***

Los fructanos de *Agave* actúan como prebióticos induciendo beneficios a la salud del hospedero mediante cambios específicos en la composición y/o actividad de la mi-

crobiota [121], sin embargo, existen muy pocos estudios en animales o humanos que muestran el efecto prebiótico de los fructanos de *Agave* en la microbiota intestinal, a través de diferentes técnicas de análisis tal como el método de cultivo tradicional de microbiología [122], PCR cuantitativo en tiempo real [35] e hibridación fluorescente *in situ* [123]. Hasta hace poco tiempo, la mayoría de las investigaciones en esta área se habían enfocado sobre la capacidad que tienen los fructanos de *Agave* para estimular el crecimiento principalmente de las bacterias probióticas (*Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp.), tal vez debido a que estos dos géneros de bacterias son organismos sacarolíticos, no patogénicos, no putrefactos y no tóxicos para el hospedero. Por lo tanto, son candidatos razonables para orientar en cuanto a la restauración de un equilibrio favorable de las especies intestinales [124]. Estudios realizados con fructanos de *Agave*, muestran que el consumo de estos prebióticos, lleva a un incremento de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* en ratas sanas, diabéticas y obesas [122], ratones obesos [35] y humanos saludables [123]. No obstante, la microbiota intestinal comprende trillones de bacterias las cuales influyen en nuestra salud y nutrición a través de múltiples vías. Por lo tanto, estos dos géneros de bacterias no pueden explicar el complejo impacto de la ingesta de prebióticos en la composición de la microbiota intestinal. Actualmente, a través de la tecnología de secuenciación de ADN, otras poblaciones bacterianas que están siendo afectadas por la ingesta de prebióticos están emergiendo.

Una reciente investigación, realizada mediante la secuenciación de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARNr en las heces de humanos saludables; quienes consumieron 5 y 7.5 g/día de fructanos de *Agave* por un lapso de 21 días, muestra que la ingesta de este prebiótico no únicamente estimula el crecimiento selectivo del género *Bifidobacteria*, sino que también hay una disminución significativa de los géneros *Ruminococcus*, *Lachnobacterium* y *Desulfovibrio* [125]. Interessantemente, dentro de los 3 géneros de bacterias que disminuyeron con la ingesta de fructanos de *Agave*, se ha demostrado que algunos miembros del género *Desulfovibrio* son productores de endotoxinas, las cuales han sido vinculadas a algunas enfermedades inflamatorias [126]. Por lo tanto, estos datos sugieren que los cambios específicos

encontrados hasta ahora en la microbiota intestinal debido a la ingesta de fructanos de *Agave*, es solo el comienzo en la comprensión del efecto de este prebiótico en la modulación de la microbiota intestinal y su impacto en la salud del individuo.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, los fructanos a través de su fermentación en el ciego y colon generan *SCFA*, los cuales juegan un papel muy importante (de manera puntual el ácido butírico), debido a que influencia la secreción de las hormonas *GLP-1* y *PYY*, las cuales están involucradas en el control del apetito [127–129]. Investigaciones realizadas con fructanos extraídos de *Agave tequilana*, *A. angustifolia* y *A. potatorum* concluyen que estos prebióticos tienen la capacidad de incrementar los niveles de *GLP-1* (en el colon y vena porta) de ratones sanos [117, 118] e inducir una disminución en la concentración de grelina (en el estómago y vena porta) de los roedores [118, 130]; de forma comparable a los fructanos tipo inulina, a pesar de las enormes diferencias estructurales entre ambos carbohidratos. Además, un trabajo reciente muestra que existe una correlación negativa entre los niveles de las hormonas grelina y *GLP-1* en la sangre de los ratones que consumen fructanos de *Agave* [118], lo cuál previamente había sido determinado para fructanos tipo inulina [57]. El aumento en los niveles de *GLP-1* (hormona involucrada con saciedad) y la reducción en la concentración de grelina (hormona que envía señales de hambre al cerebro), producen un impacto en la reducción de la ingesta de alimento y en consecuencia una pérdida de peso corporal del ratón [117, 118].

### ***1.5. Los fructanos como una alternativa para el manejo de sobrepeso***

Investigaciones previas, realizadas en ratones alimentados con una dieta alta en grasa [131–135] o en ratones genéticamente obesos [72, 136], concluyen que cuando se suplementa la dieta que recibe el animal con fructanos tipo inulina, el individuo muestra una reducción en la ingesta de alimento, disminución en la ganancia de peso corporal y reducción del tejido adiposo en comparación con los animales que solo reciben la dieta alta en grasa sin suplementar (Figura 1.12); por lo que, la ingesta de fructanos podría ser una alternativa para mitigar el desarrollo de sobrepeso u obesidad en el individuo, ocasionado por el consumo de una dieta rica en grasa.

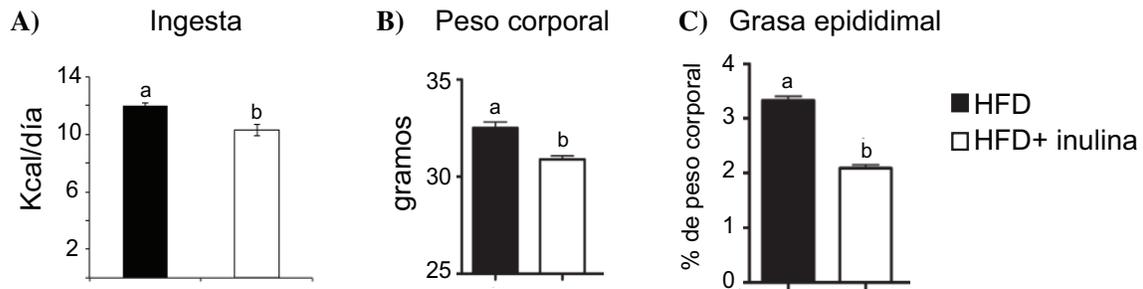


Figura 1.12: Efectos sistémicos de los fructanos tipo inulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa [132]. HFD: Dieta alta en grasa; HFD+inulina: Dieta alta en grasa+10 % de fructanos tipo inulina.

### 1.5.1. Mejora de parámetros metabólicos y modulación de hormonas involucradas con saciedad

Investigaciones realizadas con fructanos tipo inulina, muestran que este prebiótico tiene la capacidad de proteger a los animales de las alteraciones metabólicas inducidas por el consumo de una dieta alta en grasa. Cani *et al.* [135] reportaron que ratas que fueron alimentadas por 5 semanas con una dieta estándar suplementada al 10 % con fructanos tipo inulina y que posteriormente se cambiaron (por 2 semanas) a una dieta alta en grasa suplementada con fructanos, presentaban una disminución significativa en la concentración de triglicéridos en plasma sanguíneo en relación a los animales que inicialmente solo recibieron la dieta estándar y que posteriormente fueron desplazadas a la dieta alta en grasa sin suplementar (Figura 1.13).

Posteriormente, Cani *et al.* [131] alimentaron ratones por 4 semanas con una dieta alta en grasa, suplementada con 10 % de fructanos tipo inulina; observando que la ingesta de este carbohidrato, reduce de manera significativa la concentración de glucosa en el plasma sanguíneo de los animales, en comparación con los ratones que solo consumieron la dieta rica en grasa. Por otra parte, Daubioul *et al.* [101] evaluaron el efecto del consumo de fructanos por 8 semanas, sobre la acumulación de triglicéridos en el hígado, en ratas genéticamente obesas. Los investigadores compararon el efecto de los fructanos (carbohidratos fermentables) con el de la celulosa

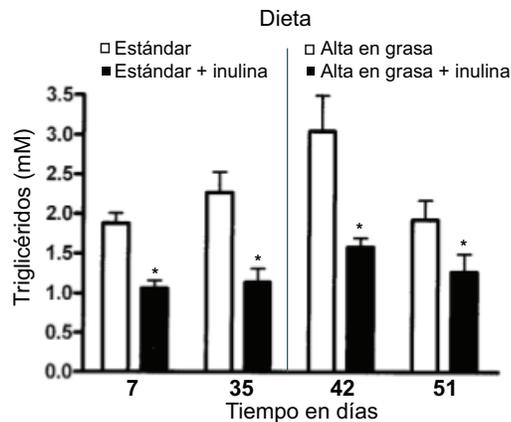


Figura 1.13: Influencia del consumo de fructanos sobre los niveles de triglicéridos en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa [135].

(carbohidrato no fermentable); encontrando que únicamente las ratas que fueron alimentadas con la dieta suplementada con fructanos, exhibieron una menor acumulación de triglicéridos en el hígado, en comparación con aquellas que recibieron el suplemento de celulosa o con respecto a las ratas control (alimentadas exclusivamente con dieta estándar). Los datos anteriores sugieren que el uso de prebióticos (por ejemplo, fructanos) en individuos con sobrepeso, podrían regular el metabolismo de los lípidos y la glucosa, siendo entonces esto una manera para prevenir y manejar el riesgo de enfermedades metabólicas [137].

De forma impresionante, los fructanos además de ejercer una mejora en los parámetros metabólicos en ratones que se alimentan con una dieta rica en grasa, también tienen la capacidad de modular hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito en estos individuos. Estudios previos en ratas y ratones alimentados con una dieta alta en grasa suplementada con fructanos, determinan que estos prebióticos promueven una producción endógena de la hormona sacietogénica (*GLP-1*) en el tejido del colon proximal y plasma sanguíneo de los animales, lo cual es asociado con una disminución en la ingesta de alimento, peso corporal, tejido adiposo, niveles de glucosa en sangre, así como un incremento en la concentración de insulina (derivado de la acción de incretina, de la hormona *GLP-1*) en el roedor (Figura 1.14) [131, 132, 135]. Es decir, los fructanos tipo inulina contrarrestan

los desórdenes metabólicos inducidos por el consumo de una dieta rica en grasa, a través de la modulación de hormonas gastrointestinales asociadas con la regulación del apetito.

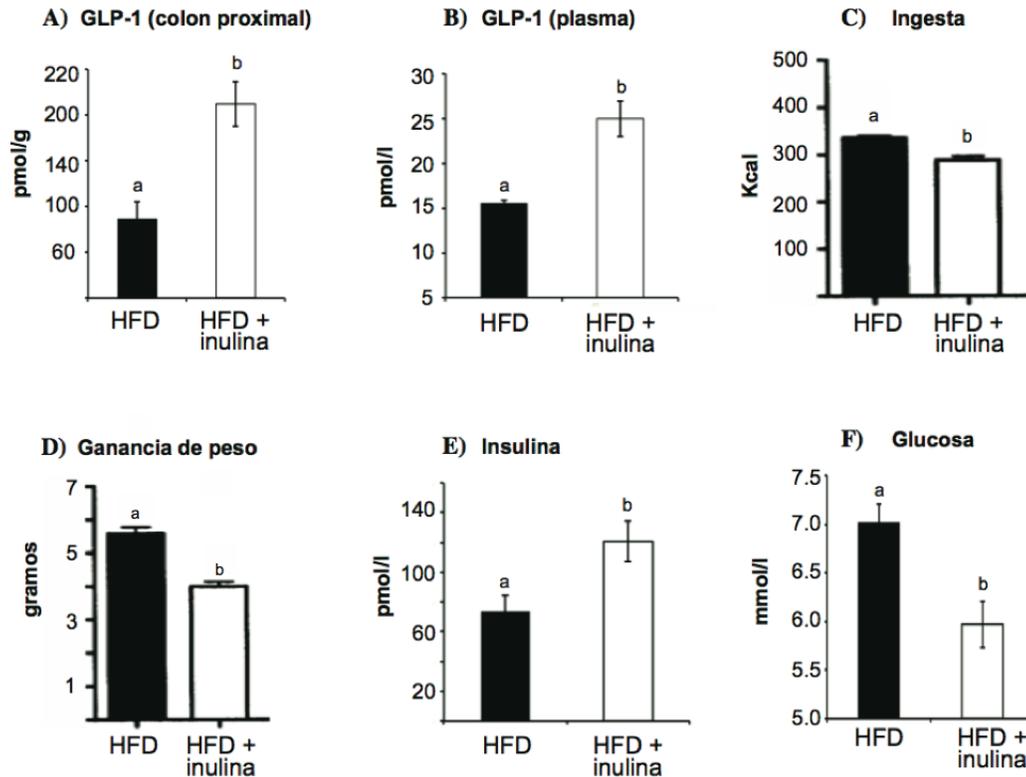


Figura 1.14: Efecto de la ingesta de fructanos en la modulación de *GLP-1* y su impacto sobre la ingesta de alimento, peso corporal, niveles de insulina y glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa [131].

### 1.5.2. La microbiota intestinal como un factor clave en el desarrollo de sobrepeso u obesidad y su modulación con fructanos

En los últimos años se ha observado que el tipo de microbiota presente en el colon del individuo lo puede llevar al desarrollo de masa grasa. Un estudio muy interesante es el realizado por Bäckhed *et al.* [138] en el cuál demuestran que la microbiota juega un papel clave en el desarrollo de masa grasa. En esta investigación utilizaron 3 diferentes ratones (axénicos, con microbiota convencional y ratones axénicos inoculados con microbiota convencional). Los autores observaron que los ratones axénicos

consumieron una mayor cantidad de alimento, pero presentaban un menor porcentaje de grasa corporal. Por el contrario, los ratones con microbiota, consumen una menor cantidad de alimento, pero tienen una mayor cantidad de grasa (Figura 1.15).

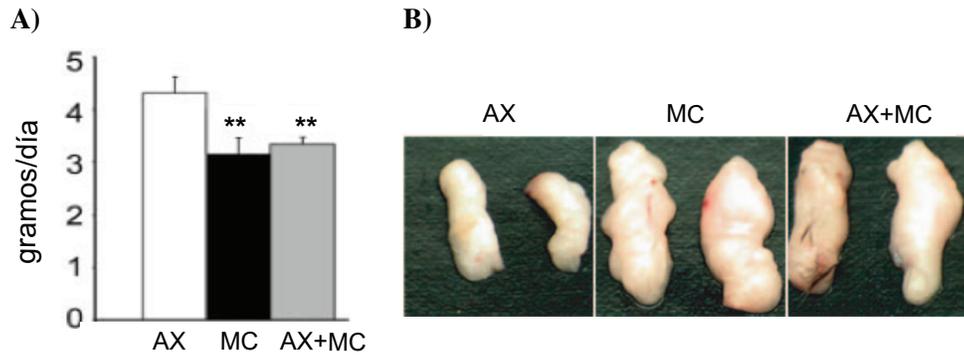


Figura 1.15: Influencia de la microbiota intestinal sobre la ingesta de alimento y el desarrollo de masa grasa. A) Ingesta de alimento y B) Grasa epididimal presente en los ratones axénicos (AX); ratones con microbiota convencional (MC) y animales axénicos inoculados con microbiota convencional (AX+MC) [138].

Por lo tanto, los autores concluyen que el tipo de microbiota presente en el individuo está jugando un rol clave en el desarrollo de masa grasa. Por otra parte, Ley *et al.* [139] analizaron ratones sanos y genéticamente obesos. Como era de esperarse, los ratones obesos mostraron un incremento del 42% en el consumo de alimento, así como en el peso corporal y grasa epididimal. Lo más importante de este estudio fue el resultado que obtuvieron después de analizar la microbiota presente en los ratones sanos y genéticamente obesos. Determinando que los ratones obesos muestran un incremento en la proporción de Firmicutes y un decremento en el grupo de Bacteroidetes (Figura 1.16).

Además de los cambios observados en la proporción de Firmicutes y Bacteroidetes, Turnbaugh *et al.* [140] observaron que la microbiota intestinal de ratones obesos tiene la capacidad de extraer una mayor cantidad de energía de la dieta en forma de *SCFA*, lo cual podría estar implicado en el desarrollo de obesidad en estos animales. Los filos Firmicutes y Bacteroidetes son muy importantes, ya que comúnmente son los miembros más abundantes de la microbiota del ciego (representan aproximada-

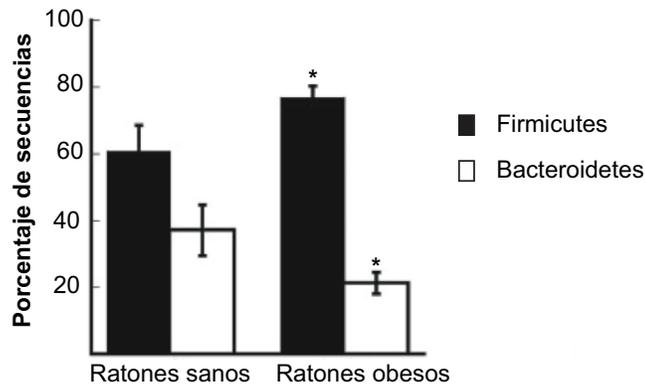


Figura 1.16: Modificación de la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota del ciego de ratones obesos con respecto a ratones sanos [139].

mente el 90 % de ésta), sin embargo, la proporción de estos dos grupos de bacterias puede cambiar con el tiempo o por diferentes factores tales como la edad, el medio ambiente, pero lo que más influye en su variación, es el consumo de una dieta alta en grasa; por lo que, el incremento en la relación de Firmicutes/Bacteroidetes (al menos en ratones), ha sido considerado como un biomarcador de obesidad [87, 139, 141]. Por otra parte, estudios previos demuestran que los fructanos tipo inulina tienen la capacidad de cambiar la microbiota intestinal del individuo (hacia una población más saludable), cuando éstos son incorporados en una dieta rica en grasa. Estudios realizados en ratones alimentados con una dieta alta en grasa suplementada con este prebiótico; muestran un incremento significativo en el número de *Bifidobacterium* spp. presentes en el ciego de los roedores, lo cuál se ha asociado con una reducción en los niveles de endotoxinas y una mejora en la función de barrera de la mucosa, con respecto a los animales que solo consumen la dieta alta en grasa sin suplementar [133, 134]. Un estudio reciente, realizado por Everard *et al.* [70] demuestra que la ingesta por 8 semanas de una dieta alta en grasa suplementada con 10 % de fructanos tipo inulina, cambia drásticamente la microbiota del ciego de los ratones. Un resultado muy sobresaliente observado por los autores en este estudio, fue la disminución en la proporción de Firmicutes/Bacteroidetes (como se mencionó anteriormente, un incremento en la proporción de estos dos filos bacterianos está asociado con obesi-

dad) en los ratones que consumieron la dieta suplementada con fructanos en relación a los animales que recibieron la dieta rica en grasa sin suplementar (Figura 1.17). Interesantemente, los géneros *Akkermansia* y *Bifidobacterium* no se encontraron en los animales que consumieron la dieta alta en grasa, sin embargo, estos dos géneros de bacterias se enriquecieron en el ciego de los ratones que se alimentaron con la dieta suplementada con fructanos. El enriquecimiento de *Akkermansia* y *Bifidobacterium* con el suplemento de fructanos, es muy importante, debido a que algunos miembros de estos dos géneros de bacterias han sido correlacionados con mejoras metabólicas en el hospedero [71, 72].

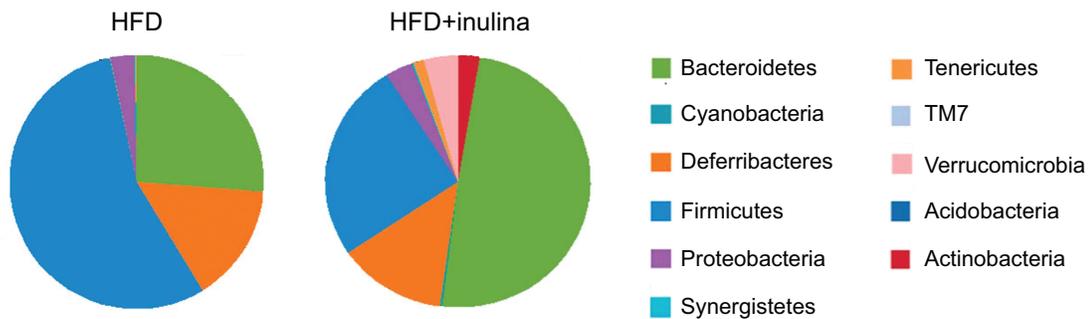


Figura 1.17: Cambios en la microbiota del ciego de ratones alimentados por 8 semanas con una dieta alta en grasa (HFD) suplementada con 10% de fructanos tipo inulina [142].

## ***2. Justificación***

A través de los diferentes estudios realizados con fructanos de *Agave*, se ha observado que éstos tienen la capacidad de incrementar la producción de *SCFA* en el ciego y colon de ratones, generando así un impacto en la reducción de los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de animales sanos. Además, los fructanos de *Agave* también han mostrado tener un potencial en la modulación de hormonas involucradas en la regulación del apetito, tales como grelina y *GLP-1*. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cuales son los cambios producidos en la comunidad de la microbiota intestinal después de la ingesta de fructanos de *Agave*, así como la modulación de hormonas involucradas en la regulación del apetito, en animales que presentan problemas de sobrepeso. Por lo que, se considera importante realizar un estudio integral, en el cual se analice el efecto de los fructanos de *Agave* sobre los cambios poblacionales en la microbiota del ciego, los productos de fermentación de éstos y algunas de las hormonas involucradas en la regulación del apetito, con la finalidad de demostrar que los fructanos de *Agave* pudieran ser una alternativa de carbohidratos funcionales que contribuyan al control de sobrepeso, así como a los desordenes metabólicos asociados a este padecimiento.

### ***3. Hipótesis***

Los fructanos de *Agave* tienen la capacidad de modificar las poblaciones bacterianas en el ciego y colon de ratones con sobrepeso, cambiándola a una microbiota más saludable, con lo cual se espera un incremento en la producción de *SCFA* y una modulación de las hormonas involucradas en la regulación del apetito.

## ***4. Objetivo general***

Evaluar el efecto del consumo de fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul de cuatro años de edad, sobre la microbiota del ciego de ratones con sobrepeso y hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito.

### ***4.1. Objetivos específicos***

- A) Caracterizar los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul de cuatro años de edad.
- B) Estudiar el efecto del consumo de fructanos sobre la ingesta de alimento, ganancia de peso corporal, niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de los ratones.
- C) Evaluar la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso y después del consumo de fructanos.
- D) Indagar el efecto de la ingesta de fructanos sobre las hormonas: grelina, *GLP-1*, insulina y leptina.
- E) Investigar si el consumo de fructanos modifica la producción de *SCFA* y el pH en el ciego y colon de los ratones.

## ***5. Estrategia experimental***

De forma global, el presente trabajo se dividió en dos fases experimentales (Figura 5.1); en la primer fase (A), se llevó a cabo la extracción de los fructanos de *Agave* de bajo *DP*, a partir de plantas de *A. tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad. Los fructanos extraídos se cuantificaron mediante un método enzimático/espectrofotométrico y se caracterizaron a través de las técnicas cromatográficas: *TLC* y *HPAEC-PAD* con el objetivo de obtener el perfil cromatográfico (*DP*) de estos carbohidratos. En la segunda fase experimental (B), los fructanos de *Agave* de bajo *DP* obtenidos previamente, se emplearon para realizar un estudio *in vivo* en ratones con sobrepeso y analizar el efecto de la ingesta de estos prebióticos sobre los efectos sistémicos (peso, glucosa, triglicéridos y colesterol), cambios en la microbiota del ciego, producción de *SCFA* (acético, propiónico y butírico) y hormonas involucradas en la regulación del apetito (grelina, *GLP-1*, insulina y leptina).

### ***5.1. Extracción y purificación de fructanos de Agave tequilana Weber var. azul de bajo grado de polimerización***

En el presente proyecto se utilizaron piñas de *Agave tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad, las cuales se caracterizan por poseer un alto contenido de fructanos con un bajo *DP* (véase sección 1.2.2.1). Las plantas de *Agave* fueron donadas por Casa Cuervo S.A. de C.V. y los fructanos fueron extraídos y purificados en el laboratorio. Brevemente, las piñas de *Agave* fueron cortadas en trozos de aproximadamente 10 x 3 cm, los cuales se colocaron en un extractor de jugos comercial. Al jugo obtenido se le ajustó el pH a 7 empleando  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , para evitar la hidrólisis ácida de los fructanos. Posteriormente, el jugo se sometió a un proceso de purificación: primero

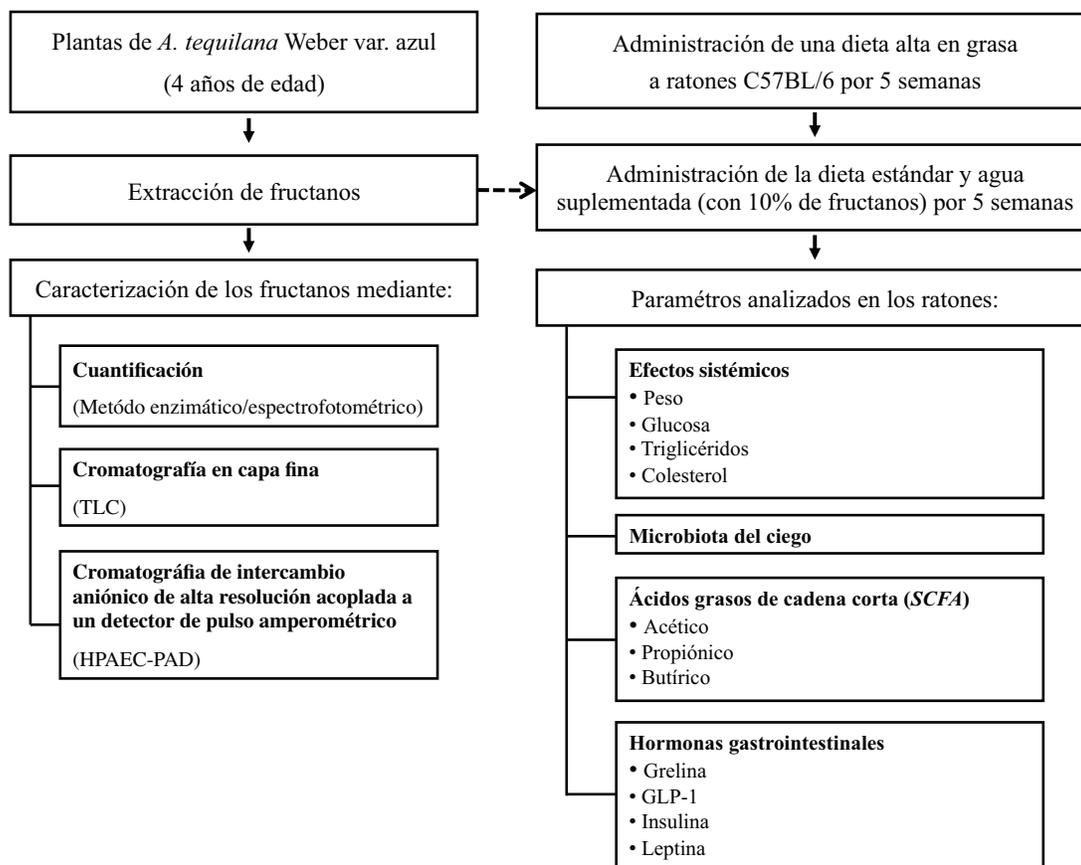


Figura 5.1: Esquema general de trabajo.

se calentó a 80-85 °C por 30 min en un baño de agua con agitación continua para inactivar las enzimas hidrolíticas y saponinas presentes en éste [143, 144]; en seguida, se centrifugó a 10,000 xg por 10 min. El sedimento formado fue desechado y a la fase acuosa se le agregó 1 % (*peso/volumen*) de tierra de diatomeas y posteriormente de carbón activado, con la finalidad de remover las impurezas orgánicas y colorantes suspendidos en el jugo [36, 145]. La tierra de diatomeas y el carbón activado fueron retirados del jugo mediante centrifugación a 10,000 g por 10 min. Por último, el jugo de *Agave* fue filtrado bajo vacío, usando una membrana de nylon con un tamaño de poro de 0.20  $\mu\text{m}$  para posteriormente ser liofilizado (Figura 5.2).

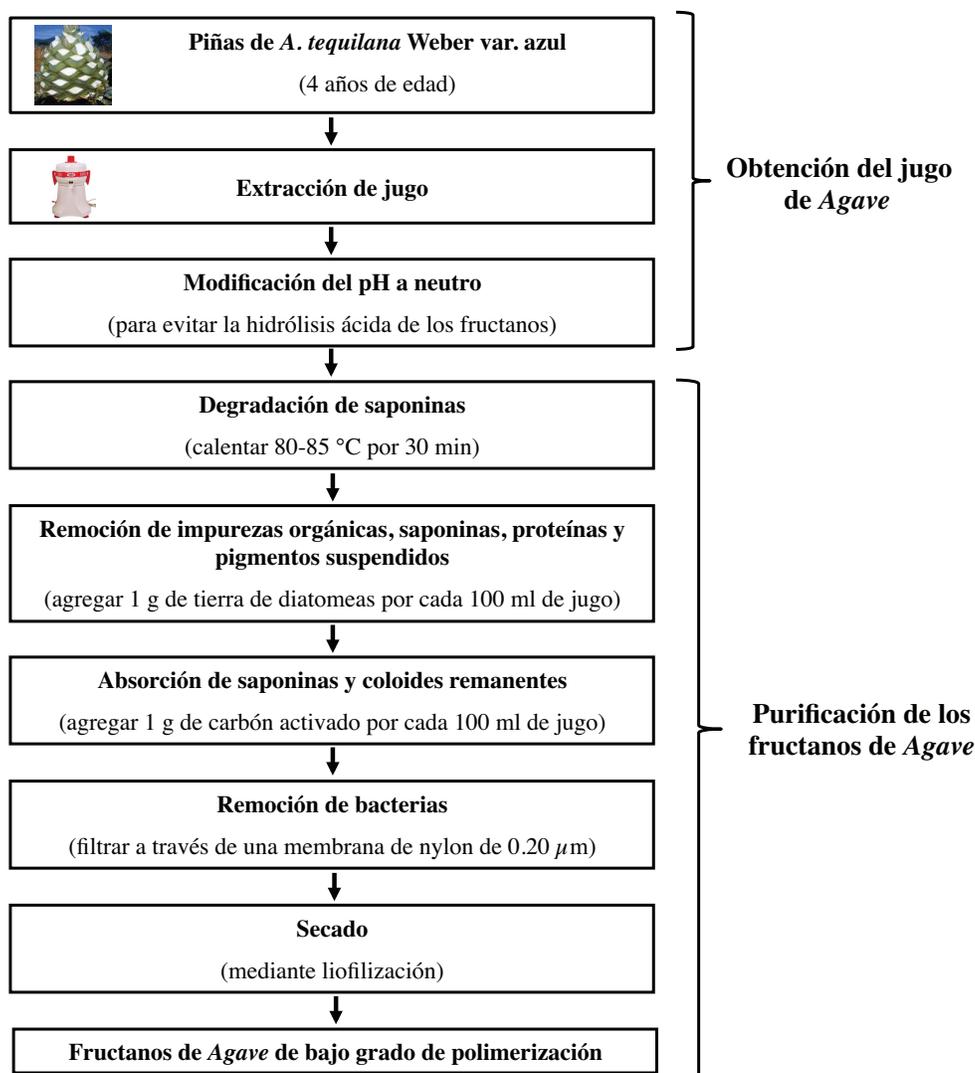


Figura 5.2: Proceso empleado para la obtención y purificación de los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul.

### 5.1.1. Análisis de proteínas, saponinas y presencia de bacterias

La concentración de proteínas se determinó en el jugo de *Agave* antes y después de ser sometido al proceso de purificación, con el objetivo de confirmar la pureza de los fructanos de *Agave* obtenidos. La cuantificación de proteínas se llevo a cabo mediante el método de Bradford [146] utilizando el kit (*protein assay; Bio-Rad*) y albúmina de suero bovino (*BSA*) como proteína estándar, siguiendo las especificaciones del proveedor. Brevemente, en una microplaca se colocaron 10 μL de jugo de *Agave* (purificado y sin purificar) y se añadieron 150 μL de agua destilada estéril,

en seguida se agregaron 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Al término de este tiempo, se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Por otra parte, la presencia de saponinas en extractos de plantas se indica fácilmente por su capacidad de formar espumas estables en solución acuosa [137, 147]; motivo por el cual, se evaluó la capacidad del jugo de *Agave* para formar espuma. Brevemente, 25 ml del jugo de *Agave* (antes y después del proceso de purificación) se colocaron en frascos, los cuales fueron agitados por 1 min empleando un equipo vortex. Los frascos permanecieron en reposo por 15 min y enseguida se analizó la cantidad (altura) de la espuma que se formó.

Por último, la presencia de bacterias en el jugo de *Agave* (previo y posterior al proceso de purificación), se determinó evaluando el crecimiento de éstas en medio Luria-Bertani (LB; el cual es uno de los más usados para el cultivo de bacterias, debido a que permite el crecimiento de una gran variedad de cepas). De forma breve, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del jugo de *Agave* y se colocaron en la caja petri con medio LB sólido, se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se analizó la presencia de bacterias en cada una de las cajas petri.

### ***5.1.2. Caracterización de los fructanos extraídos de plantas de Agave tequilana Weber var. azul de 4 años de edad***

#### ***5.1.2.1. Cuantificación de fructanos (análisis enzimático/ espectrofotométrico)***

Los fructanos de bajo *DP* obtenidos a partir de las piñas de *Agave tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad, fueron cuantificados empleando el kit (*Fructan Assay Procedure; Megazyme*), siguiendo las especificaciones del proveedor. Brevemente, 100 mg de fructanos liofilizados se agregaron a 50 ml de agua destilada e incubaron a 80 °C con agitación constante por 15 min. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior y se colocaron en un tubo cónico, al cual se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de sacarasa e incubó a 40 °C por 30 min (con el objetivo de hidrolizar a glucosa y fructosa, la sacarosa existente en la muestra). Posteriormente, los monosacáridos presentes en la muestra

se reducen a polioles mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$  de borohidruro de sodio ( $\text{NaHB}_4$ ; 10 mg/mL de  $\text{NaHB}_4$  en  $\text{NaOH}$  50 mM) e incubando a 40 °C por 30 min. El exceso de  $\text{NaBH}_4$  se eliminó con la adición de 125  $\mu\text{L}$  de ácido acético 200 mM. Esta solución fue denominada solución S.

De la solución S, se tomaron 25  $\mu\text{L}$  los cuales se colocaron en un tubo cónico y se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de fructanasa (exo-inulinasa) e incubó a 40 °C por 20 min (en este paso, los fructanos existentes en la muestra son hidrolizados a glucosa y fructosa). Finalmente, para cuantificar los azúcares reductores producidos, se adicionaron 1.25 mL de hidrazida del ácido *p*-hidroxibenzoico (PAHBAH) y se incubó en baño de agua hirviendo exactamente 6 min. Al término de este tiempo, la muestra se colocó en agua fría (18-20 °C) por 5 min y posteriormente en una placa de 96 pozos para leer su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Por otra parte, el kit contiene los estándares (D-fructosa, sacarosa y fructanos de dalia) para la validación del método. De la solución estándar de fructosa (1.5 mg/mL), se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se adicionaron 225  $\mu\text{L}$  de buffer de acetato de sodio 100 mM; 50  $\mu\text{L}$  de esta disolución (la cual contiene 54.5  $\mu\text{g}$  de fructosa) se trataron con PAHBAH de acuerdo al procedimiento previamente descrito y su valor de absorbancia fue utilizado como un factor de conversión a  $\mu\text{g}$  (54.5  $\mu\text{g}$  de fructosa/absorbancia de 54.5  $\mu\text{g}$  de fructosa). La sacarosa y los fructanos de dalia fueron tratados como dos muestras más, de acuerdo al proceso descrito anteriormente.

El porcentaje de fructanos presente en las muestras, se calculó de la siguiente manera:

$$\%Fructanos = \Delta_A * F * 5 * V * (0.275/0.05) * (100/w) * (1/1000) * (162/180) \quad (5.1)$$

Donde:

$\Delta_A$  = Absorbancia de la muestra leída contra el blanco

$F$  = Factor de conversión de absorbancia de fructosa a  $\mu\text{g}$  de fructosa (54.5  $\mu\text{g}$  de fructosa/absorbancia de 54.5  $\mu\text{g}$  de fructosa)

5 = Factor de conversión de 0.05 mL analizados a 0.25 mL

$V$  = Volumen de agua destilada empleada para disolver los fructanos (50 mL)

$(0.275/0.05)$  = Considera que se tomaron 0.05 ml de 0.275 ml de la solución S

$w$  = Peso de la muestra (mg)

$(100/w)$  = Factor para expresar los fructanos como porcentaje de peso seco

$(1/1000)$  = Factor de conversión de  $\mu\text{g}$  a mg

$(162/180)$  = Factor de conversión de fructosa libre (como es determinada) a fructosa anhidra (como se encuentra en los fructanos)

### **5.1.3. Cromatografía en capa fina (TLC)**

Se preparó una solución de fructanos de *Agave* a una concentración de 40 mg/mL. Se aplicó 1  $\mu\text{L}$  de esta solución en una placa de sílica gel con soporte de aluminio (10x10 cm). La placa se colocó dentro de una cámara para *TLC*, conteniendo una mezcla de propanol, agua y butanol (12:4:3 *v/v* respectivamente) la cual fue empleada como fase móvil [148]. Finalmente, la placa se asperjó con una solución reveladora (difenilamina-anilina-ácido ortofosfórico) y posteriormente se calentó a 100 °C por 3 min, para llevar a cabo la identificación de los fructanos [149].

### **5.1.4. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)**

Los fructanos extraídos de las piñas de *Agave* de 4 años de edad fueron analizados por *HPAEC-PAD* utilizando un cromatógrafo de iones (*Dionex ICS-3000*). De forma breve, 0.05 g de fructanos de *Agave* se añadieron a 100 mL de agua miliQ seguido de filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (0.22  $\mu\text{m}$  GSWP; *Millipore*) y sonicado por 10 min. Se tomaron 5 mL de esta solución y se colocaron en un vial del *HPAEC-PAD* (el equipo realizó una inyección automática de únicamente 25  $\mu\text{L}$ ). La separación de las muestras se realizó en la columna analítica (*CarboPac-PA100; Dionex*) a una temperatura de 25 °C y un flujo de 0.8 mL/min. El sistema de elución utilizado consistió de NaOH (0.5 M),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (1M) y agua miliQ, empleando diferentes gradientes de estos eluentes como se muestra en la Tabla 5.1 (con la finalidad de facilitar la separación de los fructanos de *Agave*). El tiempo

de corrida para cada muestra fue de 85 min y la identificación de los carbohidratos se realizó mediante estándares (glucosa, fructosa y sacarosa; *Sigma*) o empleando fructanos tipo inulina, para los cuales ya se tiene identificado el patrón de elución.

Tabla 5.1: Sistema de elución empleado para el análisis de fructanos de *Agave* mediante HPAEC-PAD.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	NaOH (0.5M) (%)	CH <sub>3</sub> COONa (1M) (%)	H <sub>2</sub> O (%)
1	0.8	20	0	80
10	0.8	50	50	50
25	0.8	50	10	40
40	0.8	50	20	30
65	0.8	50	30	20
75	0.8	50	40	10
80	0.8	50	50	0
85	0.8	50	50	0

### 5.2. Estudio *in vivo* del efecto del consumo de fructanos de *Agave* de bajo grado de polimerización en ratones con sobrepeso

Para llevar a cabo el estudio *in vivo* del presente proyecto, se eligieron ratones de la línea C57BL/6 debido a que estos animales son susceptibles al desarrollo de sobrepeso y obesidad mediante el consumo de una dieta alta en grasa. Cuarenta y dos ratones machos (12 semanas de edad al inicio del experimento) del bioterio de la Universidad Metropolitana de México (UAM), fueron alojados en jaulas individuales en un cuarto con un ambiente controlado (temperatura: 18-26 °C, humedad relativa: 40-70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 h). Los animales fueron sometidos a dos etapas experimentales, la primera para ganar peso y la segunda para perderlo (Figura 5.3). En la primer etapa del experimento, los ratones fueron alimentados con una dieta estándar (ST, n=12; *5053 Lab Diet*) o alta en grasa (HF, n=30; *58Y1 Test Diet*) por 5 semanas con el objetivo de inducir sobrepeso en los animales [150].

En la segunda etapa experimental, los ratones control continuaron alimentándose

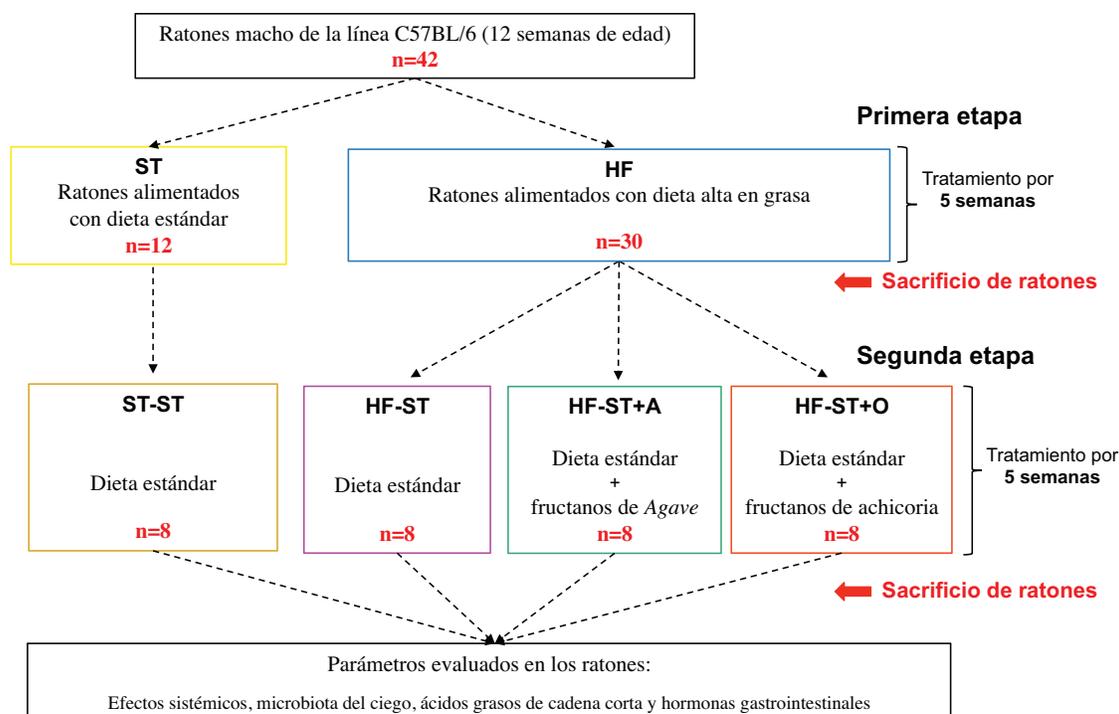


Figura 5.3: Esquema del diseño experimental utilizado para realizar el estudio *in vivo* del efecto de los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul en ratones con sobrepeso.

con la dieta estándar (ST-ST; n=8), pero los ratones con sobrepeso fueron divididos en tres nuevos grupos y cambiaron su dieta a la dieta estándar (HF-ST; n=8) suplementada con 10 % de fructanos de *Agave* (HF-ST+A; n=8) o achicoria (HF-ST+O; n=8) por 5 semanas más. El agua y el alimento fueron provistos de manera *ad libitum* a lo largo de todo el experimento. La dieta estándar contenía 62.4 % calorías provenientes de carbohidratos (almidón), 24.5 % de proteínas y 13.1 % de grasa; mientras que la dieta alta en grasa contenía 20.3 % de calorías provenientes de carbohidratos (16.15 % maltodextrina, 8.85 % sacarosa y 6.46 % de celulosa en polvo), 18.1 % de proteínas y 61.6 % de grasa. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con los lineamientos del comité institucional de cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAL, CINVESTAV-México; protocolo número: 0091-14) y bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Cada ratón recibió 0.38 g de fructanos (*Agave* o achicoria) por día [70, 71], disueltos en 5

mL de agua (promedio de agua consumida por ratón/día).

### **5.2.1. Ingesta de alimento y evolución del peso corporal de los ratones**

El peso corporal de los ratones fue registrado de manera semanal a lo largo del experimento. La ingesta de alimento fue monitoreada diariamente, el consumo promedio de energía por día (kJ/d) fue obtenido mediante la multiplicación de la ingesta de alimento (g) por el valor de energía de la dieta (kJ/g). El valor de energía para la dieta estándar fue de 14.28 kJ/g, para la dieta alta en grasa de 21.35 kJ/g y para el suplemento con fructanos de *Agave* o achicoria de 13.99 kJ/g.

### **5.2.2. Análisis de la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre**

El análisis de la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol se realizó en sangre de la cola de los ratones al término de la primer y segunda etapa experimental (5 y 10 semanas respectivamente). La muestra de sangre fue tomada en estado post-pandrial de los animales. La concentración de glucosa se determinó inmediatamente después de la toma de sangre, empleando un glucómetro (*SD Check Gold*). Por otra parte, la muestra de sangre empleada para la determinación de triglicéridos y colesterol, se colectó en tubos con heparina (0.2 mL/mL de sangre) y se centrifugó a 1,600 g por 15 min. El plasma obtenido se almacenó a -70 °C hasta su análisis. La cuantificación de triglicéridos se llevó a cabo empleando el kit (*trigliceryde quantitation; Biovision*), su principio es el siguiente, los triglicéridos son primeramente hidrolizados mediante una lipoproteína lipasa para generar glicerol y ácidos grasos. El glicerol es oxidado por una glicerol fosfato oxidasa obteniéndose dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa cataliza el acoplamiento del peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina y sodio N-etil-N-3 sulfopropil m-anisidina (ESPA) para producir una quinoneimina. El color rosa producido por la quinoneimina se leyó a 570 nm, el incremento del color es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra.

Mientras que, la concentración de colesterol total en el plasma sanguíneo de los

ratones, se determinó utilizando el kit (*Cholesterol/Cholestery Ester Quantitation; BioVision*), su principio es el siguiente, la colesterol esterasa hidroliza a los ésteres de colesterol a colesterol, el cual es oxidado por la colesterol oxidasa para producir peróxido de hidrógeno. La producción de peróxido de hidrógeno interactúa con resorufin, para dar una coloración rosada. La intensidad del color rosa (la cual se leyó a una longitud de onda de 570 nm) es proporcional a la concentración de colesterol total presente en la muestra.

### ***5.2.3. Análisis de la microbiota del ciego de los ratones***

#### ***5.2.3.1. Extracción de ADN genómico***

El análisis de la microbiota se realizó en el contenido del ciego de los ratones, colectado antes y después del suplemento con fructanos (5 y 10 semanas respectivamente). Después del sacrificio de los ratones, el ciego se disectó y el contenido de éste se congeló inmediatamente empleando nitrógeno. Posteriormente se almacenó a -70 °C hasta su uso. La extracción del ADN genómico del contenido del ciego se realizó mediante el kit (*ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep*) siguiendo las instrucciones del proveedor; el ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

#### ***5.2.3.2. Amplificación de la región V4 del gen 16S ARNr***

Para analizar la composición de la microbiota del ciego de los ratones, se llevó a cabo la amplificación de la región V4 del gen bacterial 16S ARNr empleando los iniciadores (F515/R806) [75]. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en un volumen final de 25  $\mu$ L, utilizando 5  $\mu$ L del iniciador directo y reverso, 2  $\mu$ L de ADN como templado y la mezcla (*HotMasterMix; 5 PRIME*) 1X. El ciclo termal para las reacciones de PCR consistió de una temperatura inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 seg, alineamiento a 50 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 90 seg; con una extensión final de 10 min a 72 °C.

### 5.2.3.3. Cuantificación, mezclado y secuenciación de los amplicones

La concentración de ADN para cada amplicon se determinó empleando el kit (*Quant-iT PicoGreen dsDNA; Invitrogen*) siguiendo las especificaciones del proveedor. Los ensayos fueron realizados en una microplaca de 96 pozos, empleando 2  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR en un volumen final de reacción de 200  $\mu\text{L}$ . La fluorescencia fue medida en el plato de lectura del equipo (*BioTek Synergy HT*) utilizando el par de filtros 480/520 nm (excitación/emisión). Posteriormente, los amplicones limpios se mezclaron en proporciones equimolares dentro de un solo tubo. La concentración final de la mezcla de amplicones (ADN) se evaluó mediante el ensayo de alta sensibilidad *Qubit (dsDNA; LifeTechnologies)*. La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en la plataforma *Illumina MiSeq* en la Universidad de Nueva York.

### 5.2.3.4. Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron procesadas y analizadas empleando el programa *QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)* siguiendo el protocolo descrito por Caporaso *et al.* [76]. Brevemente, las secuencias fueron removidas del análisis si: a) Eran menores a 200 nucleótidos o mayores a 350 nucleótidos de longitud; b) Mostraban un puntaje de calidad menor a 20; c) Contenían caracteres ambiguos o no contenían la secuencia del iniciador. Las secuencias restantes se asignaron a las muestras mediante los 12 nucleótidos contenidos en la etiqueta (*barcode*) del iniciador reverso. Las secuencias similares fueron agrupadas dentro de unidades taxonómicas operacionales (*OTUs*) empleando el método de referencia abierta de *QIIME*. Las asignaciones taxonómicas para cada *OTU* se llevó a cabo empleando la base de datos de *Greengenes* (liberada en mayo del 2013) con una identidad mínima del 97%. Finalmente, los *OTUs* fueron usados para generar las gráficas de las abundancias relativas y para calcular las diversidades alfa y beta de cada comunidad microbiana (la diversidad alfa se refiere a la diversidad dentro de cada muestra y la diversidad beta a los patrones de similitud y diferencias entre las muestras).

### ***5.2.3.5. Evaluación de las taxas enriquecidas mediante el análisis lineal discriminante por efecto de tamaño (LEfSe)***

La detección de cambios significativos en la abundancia relativa de las taxas microbianas entre los ratones con sobrepeso alimentados con la dieta estándar y los que recibieron el suplemento de fructanos, se evaluó empleando el programa *LEfSe* [151]. Brevemente, *LEfSe* es un algoritmo que se aplica a un conjunto de datos obtenidos de la secuenciación del gen 16S ARNr para detectar organismos bacterianos que son diferencialmente abundantes entre dos o mas ambientes microbianos. El programa *LEfSe* primero identifica las características que son significativamente diferentes entre los diferentes tratamientos, empleando el análisis factorial no paramétrico *Kruskal-Wallis (KW) ran-sum* y posteriormente realiza un análisis lineal discriminante (*LDA*) para estimar el efecto de cada característica diferencialmente abundante.

### ***5.2.4. pH y ácidos grasos de cadena corta en el contenido del ciego y colon de los ratones***

Después del sacrificio de los ratones, el ciego y el colon de los animales se disectaron inmediatamente. El contenido del ciego y colon (el cual se seccionó en proximal, medio y distal) se colocó en tubos cónicos y se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El pH del contenido colónico se determinó mediante un microelectrodo (*PHR-146; Lazar Research Laboratories Inc.*). El análisis de los *SCFA* se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de flama (*GC-FID*) siguiendo el protocolo de Femia *et al.* [152] con algunas modificaciones. De forma breve, se pesaron 0.05 g de contenido colónico al cual se adicionaron 0.3 mL de agua miliQ y 0.05 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Para la extracción de los *SCFA* se añadieron 0.6 mL de dietiléter a la mezcla anterior, se agitó vigorosamente en un equipo vortex y se centrifugó a 10,000 xg por 30 seg. Se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica e inyectó directamente dentro de la columna capilar *Nukol* (30 m x 0.32 mm; *Supelco*). La temperatura inicial de la columna fue de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

la cual se incrementó de forma gradual (15 °C/min) hasta alcanzar 120 °C con una pausa de 10 min; seguido de un aumento gradual (10 °C/min) hasta llegar a 200 °C. La temperatura del inyector y detector fueron 180 °C y 230 °C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador y la identificación y cuantificación de cada uno de los *SCFA* se realizó mediante los tiempos de retención y las curvas de calibración realizadas para cada ácido.

### **5.2.5. Análisis de las hormonas grelina, GLP-1, insulina y leptina**

Al final de la segunda etapa experimental (después de la ingesta de fructanos), los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso corporal) e inmediatamente, se colectó sangre de la vena porta del animal en tubos cónicos con inhibidor de dipeptidil peptidasa IV (*DPPIV*); la mezcla se centrifugó a 1,600 g por 15 min a 4 °C. El plasma obtenido fue almacenado a -70 °C hasta su uso en la determinación de hormonas. La cuantificación de las hormonas grelina, *GLP-1*, insulina y leptina se realizó utilizando el kit *Mouse Diabetes Standard Bio-Plex (Bio-Plex Pro Assay; Bio-Rad)* y el equipo *Bioplex magpix*. Este kit presenta una enorme ventaja, ya que permite la detección simultánea de múltiples analitos empleando únicamente 1  $\mu$ L de plasma. Esta tecnología consta de tres elementos básicos: 1) Microesferas marcadas fluorescentemente, esto permite la detección simultánea de hasta 50 analitos por muestra; 2) Un dispositivo de imágenes acoplado a diodos emisores de luz, para determinar los distintos analitos anclados a la superficie de las microesferas; y 3) Un procesador digital de señales de alta velocidad que controla los datos de la fluorescencia. Los ensayos *Bio-Plex* son esencialmente inmunoensayos realizados con microesferas magnéticas, el principio de la técnica es similar al *ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)* tipo sandwich, donde el anticuerpo de captura (dirigido contra el biomarcador deseado) se acopla covalentemente a las microesferas. Las microesferas acopladas reaccionan con la muestra que contiene el biomarcador de interés. Después de una serie de lavados, para eliminar la proteína no unida, se añade un anticuerpo de detección biotinilado, para formar un complejo tipo sandwich alrededor del biomarcador de interés

(Figura 5.4). El complejo de detección final, se forma con la adición del conjugado estreptavidina-ficoeritrina, en donde la ficoeritrina es un indicador fluorescente. La intensidad de la fluorescencia indica la cantidad relativa del biomarcador de interés presente en la muestra. La concentración de las hormonas grelina, *GLP-1*, insulina y leptina en el plasma, se realizó a partir de curvas de calibración para cada hormona.

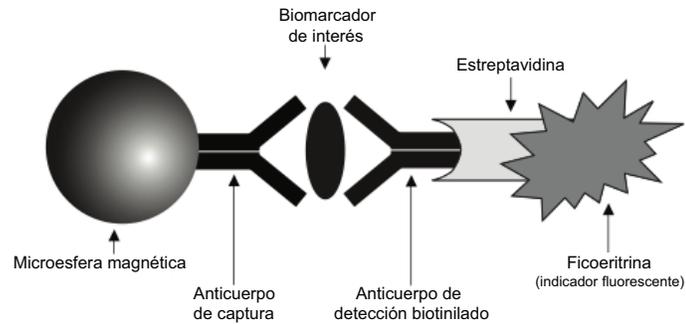


Figura 5.4: Inmunoensayos utilizando microesferas magnéticas (*Bio-Plex*) para la cuantificación de las hormonas grelina, *GLP-1*, insulina y leptina.

## ***6. Resultados y discusión***

### ***6.1. Extracción y purificación de los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul de bajo grado de polimerización***

En el presente trabajo se utilizó un extractor comercial de jugos para la obtención de fructanos de *Agave* a partir del jugo derivado de la piña. Este método de extracción difiere del que comúnmente se usa a nivel laboratorio o industrial, el cual emplea agua caliente para extraer los fructanos de la piña de *Agave* [32–36]. Sin embargo, como se mencionó en la sección 1.2.3, la adición de agua al proceso de extracción (a nivel laboratorio) aumenta considerablemente el tiempo que se requiere para tener el producto final (fructanos en polvo). El procedimiento que se llevó a cabo para la obtención de fructanos (véase sección 5.1), consta de dos etapas principales: 1) Obtención del jugo de piñas de *A. tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad y 2) Purificación de los fructanos de *Agave*. El cambio de pH del jugo extraído de la piña de *Agave* de ácido ( $5.3 \pm 0.1$ ) a neutro ( $7.0 \pm 0.1$ ), (dentro de la primer etapa del proceso de obtención de fructanos), es un paso crucial, ya que además de evitar la hidrólisis de los fructanos, incrementa la recuperación de éstos. Gupta *et al.* [31] muestran que la recuperación de fructanos tipo inulina se ve afectada hasta un 35 %, cuando el pH de la solución disminuye de 7 a 6. Por otra parte, la segunda etapa del proceso comprende cinco pasos, los cuales se establecieron tomando en cuenta reportes previos, como el de Michel-Cuello *et al.* [144] quienes mediante calor (80-85 °C) degradaron las saponinas presentes en el jugo de *Agave salmiana*, mientras que Gustav J.N. [152] llevó a cabo la remoción de saponinas presentes en el jugo obtenido de hojas o piña de *Agave* usando tierra de diatomeas, seguido de carbón activado con la finalidad de retirar las saponinas remanentes. Otros trabajos también emplean la

tierra de diatomeas seguido de carbón activado con el objetivo de retirar impurezas orgánicas, proteínas, pigmentos y coloides suspendidos en los extractos de *Agave* [36, 145, 153]. El proceso aquí planteado, es sencillo, económico y lo más importante, reduce considerablemente el tiempo para la obtención de los fructanos con respecto a las metodologías usadas previamente en nuestro laboratorio. Por otra parte, el rendimiento obtenido con este procedimiento fue de  $125.9 \pm 1.08$  g de carbohidratos por cada kilogramo de piña fresca procesada, siendo este rendimiento mayor en un 39% al reportado previamente por Arrizon *et al.* [32], quienes obtuvieron  $90.4 \pm 0.94$  g de carbohidratos por cada kilogramo de piña en base húmeda, para plantas de *A. tequilana* de 4 años de edad, mediante el proceso de extracción con agua caliente.

#### **6.1.1. Remoción de proteínas, saponinas y bacterias del jugo de *Agave***

El análisis de proteínas, saponinas y bacterias en el jugo de *Agave*, se llevó a cabo antes y después del proceso de purificación (véase la Figura 5.2; sección 5.1), con el objetivo de confirmar la pureza de los fructanos obtenidos. La concentración de proteínas en el jugo de *Agave* antes del procedimiento de purificación, fue de 0.0045 mg/mL de jugo, después de éste, la concentración fue de cero (Figura 6.1).

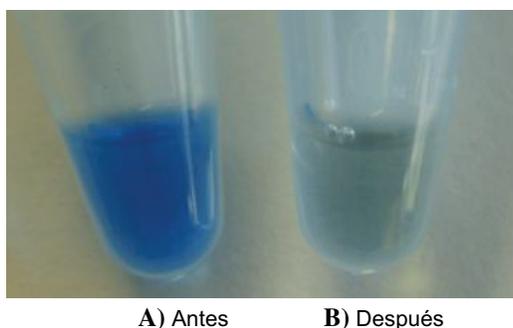


Figura 6.1: Análisis del contenido de proteínas en el jugo de *Agave* antes y después del proceso de purificación.

Por otra parte, la presencia de saponinas se evaluó a través de la capacidad que presentó el jugo de *Agave*, para la formación de espuma estable [137, 147]. La formación de espuma se redujó de manera considerable debido a que el calentamiento

(80-85 °C) degradó una gran cantidad de saponinas y mediante la adición de tierra de diatomeas y carbón activado, se realizó la remoción de éstas del jugo de *Agave*. Esto se puede apreciar en la Figura 6.2, donde previo a este procedimiento, cuando hay presente una gran cantidad de saponinas, se observa que éstas producen una columna de espuma alta, constituida por burbujas de diámetro muy pequeño (véase la interface entre el líquido y la espuma). Al degradar y remover las saponinas (con el calentamiento del jugo, la adición de tierra de diatomeas y carbón activado), la columna de espuma se reduce y el tamaño de la burbuja se incrementa. Asari & Hormozi [154] mostraron que la presencia de surfactantes (por ejemplo, saponinas [155, 156]) tienen una profunda influencia sobre el tamaño de la burbuja. Niveles bajos de estas sustancias producen burbujas de tamaño grande, mientras que altas concentraciones forman burbujas de tamaño muy fino. Por lo que, debido al incremento drástico en el tamaño de las burbujas observado en el jugo de *Agave* después del proceso de purificación, implica una disminución importante en la concentración de saponinas.

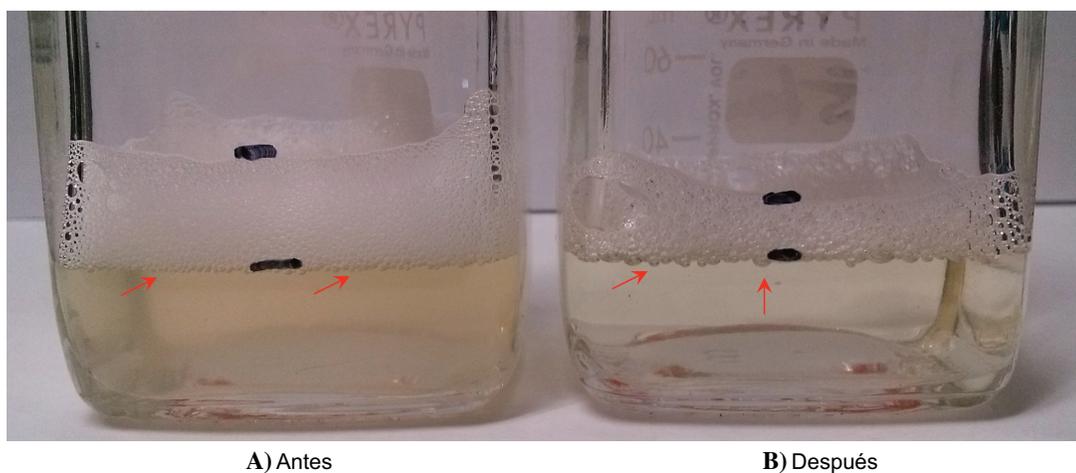


Figura 6.2: Análisis de saponinas en el jugo de *Agave* antes y después del proceso de purificación.

Por otra parte, el último paso del proceso de purificación previo al secado, implicó el uso de una membrana de nylon ( $0.2 \mu\text{m}$ ) para retirar las bacterias presentes en el jugo de *Agave* mediante filtración. Para demostrar que hubo una remoción de

bacterias del jugo de *Agave*, se plaqueó una alícuota de éste (antes y después de ser filtrado) en cajas petri con medio Luria-Bertani (LB). En la Figura 6.3 se puede observar, que las bacterias presentes en el jugo de *Agave* fueron removidas en su totalidad después de la etapa de filtración. Estos análisis confirman que los fructanos de *Agave* de bajo *DP* derivados de la extracción del jugo de la piña de *Agave* presentan una alta pureza.

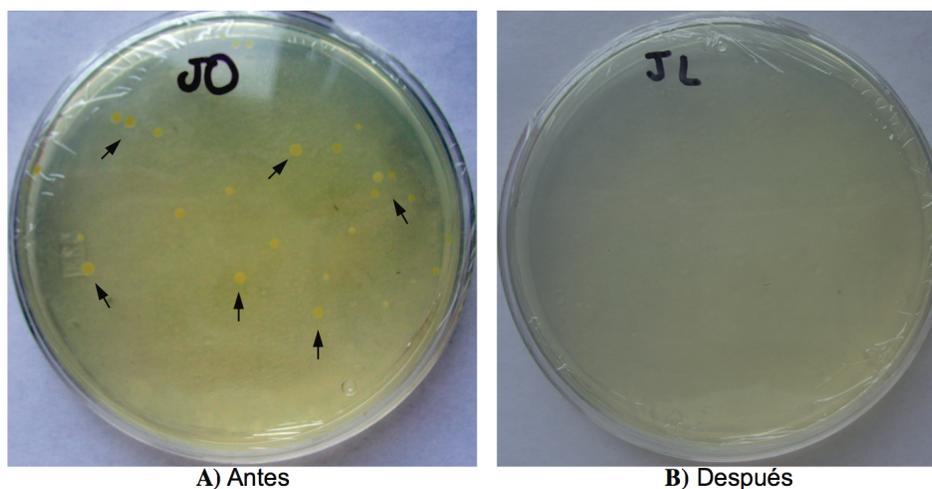


Figura 6.3: Análisis de la remoción de bacterias en el jugo de *Agave* antes y después del proceso de purificación.

### 6.1.2. Caracterización de los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad

Como se explicó en la sección 1.2.4, debido a la complejidad que presentan los fructanos de *Agave*, es necesario emplear una combinación de técnicas para realizar una caracterización completa de estos carbohidratos. En el presente trabajo, se utilizaron técnicas cualitativas y cuantitativas, *TLC*, análisis enzimático/espectrofotométrico y *HPAEC-PAD*, con el objetivo de caracterizar los fructanos obtenidos a partir de plantas de *A. tequilana* de 4 años de edad.

### **6.1.2.1. Pureza de los fructanos extraídos de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad**

Como previamente se reportó, las plantas de *Agave* almacenan fructanos como su principal fuente de carbohidratos, sin embargo, también acumulan glucosa, fructosa y sacarosa aunque en una menor concentración [17, 30]. Después de realizar la extracción de carbohidratos de las piñas de *A. tequilana* Weber var. azul, mediante el procedimiento descrito en la sección 5.1, se calculó el contenido de fructanos en peso seco mediante *HPAEC-PAD*, siendo éste de 96.6 %. Mientras que el porcentaje de glucosa, fructosa y sacarosa fue solo del 3.4 %. Estos resultados coinciden con los publicados por Arrizon *et al.* [32], quienes mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC*) obtuvieron un 97 % de fructanos y únicamente 3 % de glucosa, fructosa y sacarosa para plantas de *A. tequilana* de 4 años de edad.

Por otra parte, el porcentaje de fructanos que se obtuvo empleando el método enzimático fue de 82 %. Esta enorme diferencia en el porcentaje de fructanos derivado del método enzimático y el *HPAEC*, fue atribuída a que el método enzimático presenta un error muy grande, debido a que no es específico para fructanos tan complejos y ramificados como los que poseen las plantas de *Agave*.

### **6.1.2.2. Complejidad estructural de los fructanos de *Agave***

Los fructanos de *Agave* extraídos de las piñas de *A. tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad, fueron analizados primeramente mediante *TLC*. A pesar de que esta técnica es únicamente cualitativa, es muy fácil, económica y rápida de realizar, aporta información muy valiosa y semejante a sistemas cromatográficos de alta resolución. En la Figura 6.4 se muestra el perfil cromatográfico de los fructanos de *A. tequilana*, en la cual se observa que éstos presentan un perfil distinto al exhibido por los fructanos comerciales tipo inulina de bajo *DP*. Interesantemente, en la *TLC* se visualiza el fructano base de las agavinas (neo-kestosa), el cual se localiza únicamente en la muestra de *Agave* (entre las manchas correspondientes a sacarosa y kestosa) [17, 46]. Aunque, debido a la complejidad estructural de los fructanos de *Agave* (los

cuales poseen ramificaciones, así como varios isómeros dentro de un mismo  $DP$ ), no se obtuvo una buena separación de éstos mediante  $TLC$ , observándose únicamente un barrido desde el punto de aplicación de la muestra de *Agave*. Por otra parte, la mancha en el punto de origen de la muestra de *Agave*, denota que los fructanos extraídos de *A. tequilana* de 4 años de edad son de un  $DP$  un poco más grande con respecto a los fructanos tipo inulina. Finalmente, las manchas con mayor intensidad que se observan en la  $TLC$  para los fructanos tipo inulina, corresponden a fructanos de la serie Fn (fructanos constituidos únicamente por moléculas de fructosa), debido a que estos carbohidratos son obtenidos a nivel industrial mediante la hidrólisis enzimática de fructanos lineales de mayor  $DP$  [157].

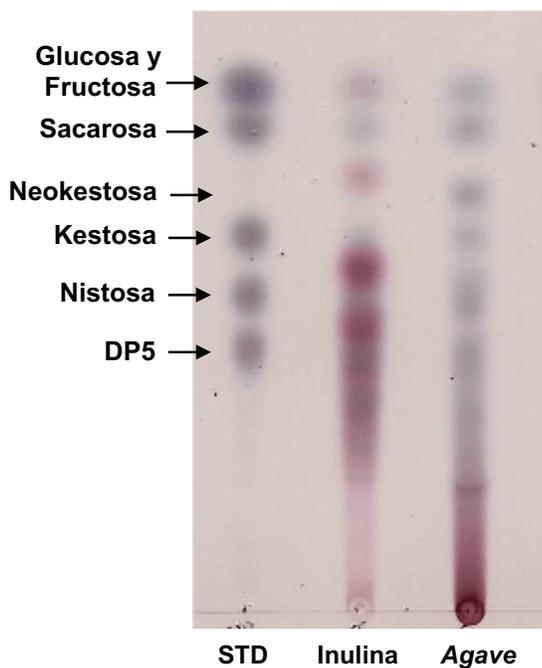


Figura 6.4: Cromatografía en capa fina de los fructanos extraídos de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad. STD: Estándares; Inulina: fructanos tipo inulina de bajo  $DP$ .

### 6.1.2.3. Grado de polimerización de los fructanos extraídos de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul de 4 años de edad

Mediante *HPAEC-PAD* se corroboró la complejidad de los fructanos de *Agave tequilana*, determinada previamente mediante *TLC*. En la Figura 6.5 se puede ver que el perfil cromatográfico de los fructanos de *Agave* obtenido mediante *HPAEC-PAD* es muy diferente al que exhiben los fructanos tipo inulina [17, 30, 32, 158]. Además, mediante esta herramienta analítica, se confirmó que los fructanos extraídos de las plantas de *A. tequilana* de 4 años de edad, son principalmente de bajo *DP*, como previamente reportaron Mellado-Mójica & López [30] y Arrizon *et al.* [32]. No obstante, el rango del *DP* (3-15) que muestran estos prebióticos es un poco mayor en comparación al rango (3-8) que exhiben los fructanos tipo inulina (Figura 6.5). Además, como se aprecia en el cromatograma de *Agave* (Figura 6.5 A), estos carbohidratos contienen varios isómeros dentro de un mismo *DP* (los cuales aumentan a medida que incrementa el *DP* del fructano; veáanse los picos entre corchetes) [30]. No obstante, como se mencionó en la sección 1.2.4, el *HPAEC* muestra una reducción en la sensibilidad del detector *PAD* en la separación de fructanos con alto *DP*, por lo que la eficiencia en la separación de isómeros disminuye y en el cromatograma se comienzan a visualizar “montañas” conforme el *DP* del fructano de *Agave* crece. Estos perfiles cromatográficos son idénticos a los previamente publicados por Mellado-Mójica & López [30] y Arrizon *et al.* [32] para fructanos extraídos de plantas de *A. tequilana* de 4 años de edad. Por otra parte, el cromatograma que se obtuvo para los fructanos tipo inulina (Figura 6.5 B) es el característico para este tipo de prebióticos, y confirma lo que previamente se mostró mediante *TLC*; que estos carbohidratos son de bajo *DP* y están constituidos principalmente por dos isómeros, fructanos de la serie GF<sub>n</sub> (fructanos que presentan una molécula de fructosa en su estructura) y Fn (fructanos constituidos exclusivamente por moléculas de fructosa), en donde la serie Fn es la más abundante; ya que proceden de la hidrólisis enzimática de fructanos tipo inulina con mayor *DP* [157].

En Figura 6.5, también se presenta el porcentaje de fructanos, así como el de carbohidratos digeribles (glucosa, fructosa y sacarosa) contenidos en la muestra de *Agave* y

fructanos tipo inulina. Interesantemente, ambos prebióticos exhiben una pureza de fructanos y un contenido de carbohidratos digeribles muy parecido, a pesar de que se obtienen mediante procesos distintos (los fructanos de *Agave* fueron extraídos a partir del jugo de la piña de esta planta, mientras que los tipo inulina los extraen de achicoria empleando el procedimiento que involucra el uso de agua caliente) [157].

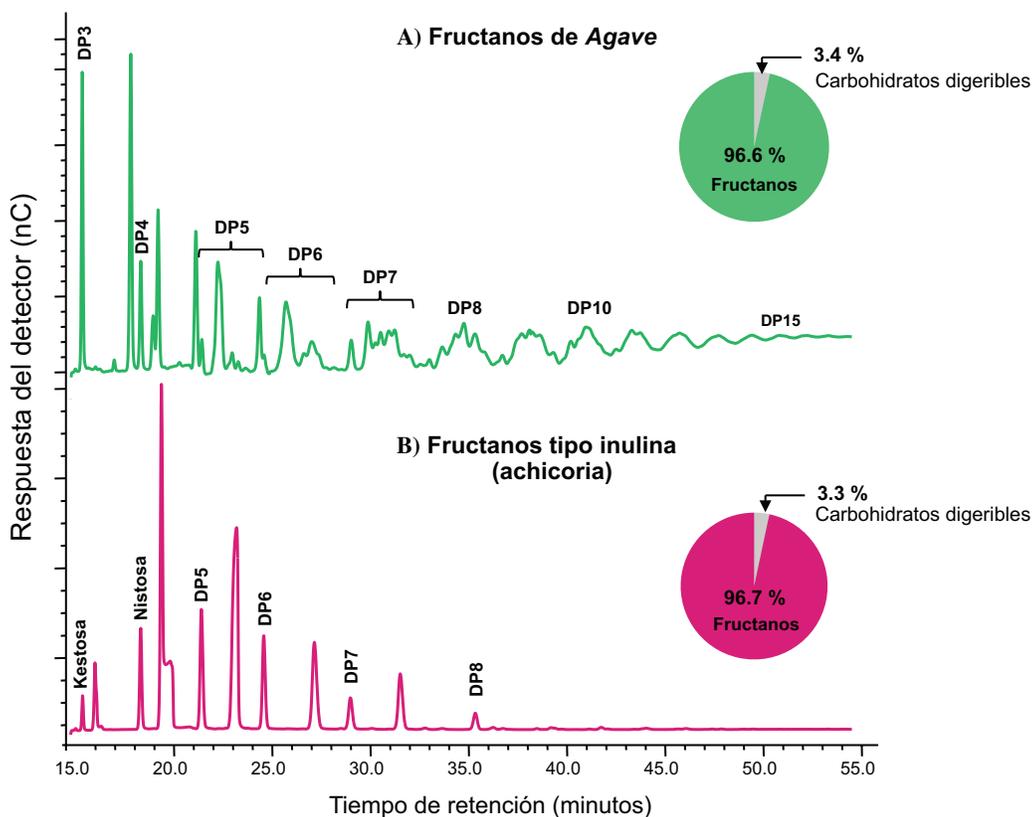


Figura 6.5: Comparación del perfil cromatográfico de los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul extraídos de plantas de 4 años de edad y fructanos tipo inulina de bajo grado de polimerización.

## 6.2. Estudio *in vivo* del efecto del consumo de fructanos de *Agave* de bajo grado de polimerización en ratones con sobrepeso

### 6.2.1. Efecto del consumo de una dieta alta en grasa

#### 6.2.1.1. Evolución del peso corporal de los ratones

Durante la primer etapa del experimento, los ratones fueron alimentados con una dieta estándar (ST) o alta en grasa (HF) por 5 semanas, con el objetivo de inducir sobrepeso en los animales. Como era de esperarse, el grupo HF incrementó de forma gradual y constante su peso corporal, por lo que al término de esta primer etapa experimental, mostró una ganancia de peso significativa de  $\approx 30\%$  (alcanzando niveles de sobrepeso [150]) comparado con el grupo ST (Figura 6.6). Estos resultados coinciden con investigaciones previas, las cuales muestran que el consumo de una dieta rica en grasa induce una mayor ganancia de peso corporal en relación a una dieta estándar o baja en grasa [1, 87, 159, 160].

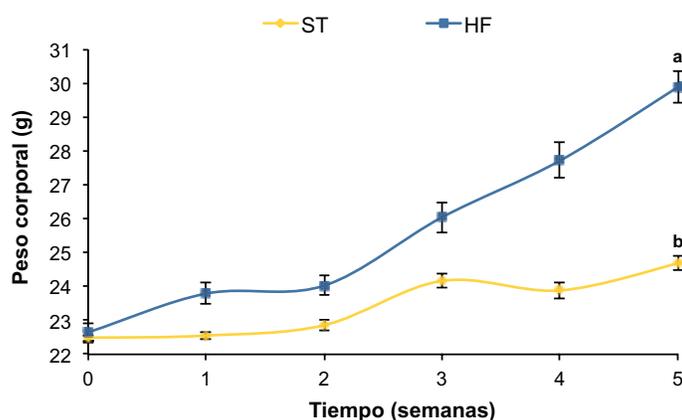


Figura 6.6: Efecto del consumo de una dieta alta en grasa sobre el peso corporal de los ratones. ST, dieta estándar; HF, dieta alta en grasa. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba t de Student;  $P < 0.05$ ).

### 6.2.1.2. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre

El consumo de la dieta alta en grasa por 5 semanas, llevó a los ratones del grupo HF a un incremento en la concentración de glucosa (9%), triglicéridos (79%) y colesterol (38%) en la sangre de los animales (el aumento en estos parámetros, frecuentemente es asociado con el síndrome metabólico) en comparación a los ratones control (ST), los cuales fueron alimentados con dieta estándar (Tabla 6.1). Estos resultados podrían estar asociados con un cambio en la microbiota de los ratones del grupo HF, como previamente ha sido reportado [70, 138, 161]. Además, se conoce que un cambio en la microbiota intestinal como resultado del consumo de una dieta rica en grasas es clave para el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina y otras características del síndrome metabólico [140, 162].

Tabla 6.1: Efecto de la ingesta de una dieta alta en grasa por cinco semanas sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de los ratones.

Grupo	Glucosa (nM)	Triglicéridos (nM)	Colesterol (nM)
ST	$6.80 \pm 0.05^a$	$0.53 \pm 0.02^a$	$1.77 \pm 0.17^a$
HF	$7.43 \pm 0.07^b$	$0.95 \pm 0.08^b$	$2.44 \pm 0.14^b$

ST, dieta estándar; HF, dieta alta en grasa. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba t de Student;  $P < 0.05$ ).

### 6.2.1.3. Cambios en la microbiota del ciego de los ratones después del consumo de la dieta alta en grasa

Los ratones con sobrepeso mostraron una pérdida substancial de la diversidad de la microbiota del ciego en relación a los ratones control (Figura 6.7 A). Por otra parte, mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA), el cual es el resultado de un análisis estadístico multivariante, se observó que la comunidad bacteriana de los ratones con sobrepeso era distinta a la de los ratones control (Figura 6.7 B). Estos cambios drásticos en la composición y la pérdida de la diversidad microbiana, derivados del consumo de una dieta alta en grasa, son consistentes con reportes previos [160, 163, 164]. Además, la presencia de disbiosis (desbalance en la composición

de la microbiota intestinal) así como una diversidad microbiana reducida, ha sido asociado con obesidad [139, 142, 165, 166].

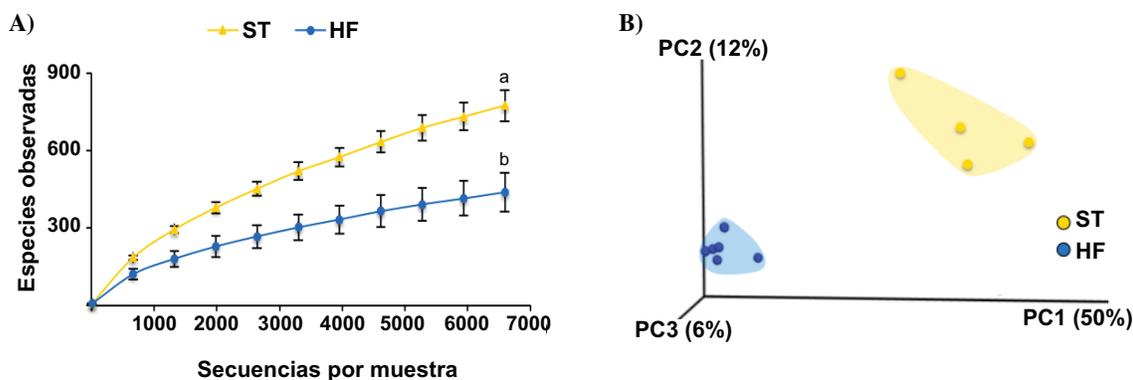


Figura 6.7: Efecto de la ingesta de una dieta alta en grasa sobre la microbiota del ciego de ratones. A) Diversidad de la microbiota y B) Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades microbianas del ciego de los ratones. ST, dieta estándar; HF, dieta alta en grasa. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba t de Student;  $P < 0.05$ ).

De manera general, la microbiota del ciego de los ratones fue dominada principalmente por 3 filos: Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, aunque, también se encontraron otros 5 filos (Tenericutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Defferribacteres y Verrucomicrobia) pero en mucha menor proporción (Figura 6.8).

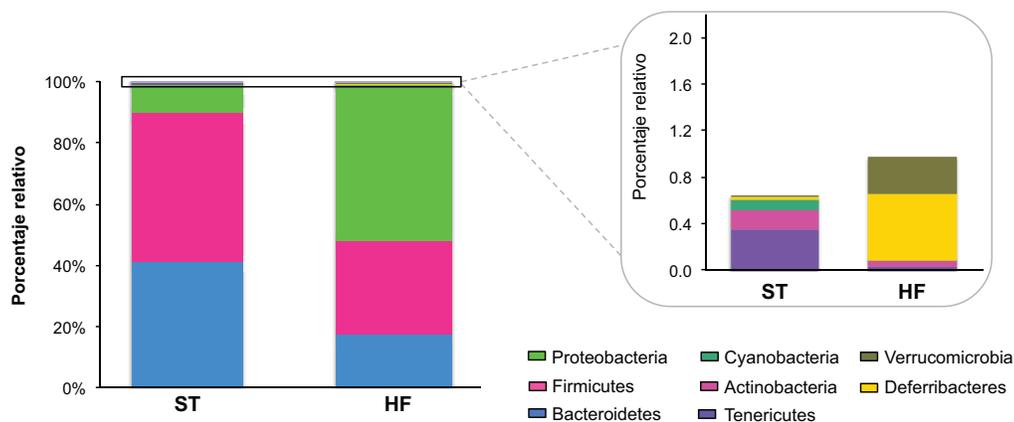


Figura 6.8: Cambios en la abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en la microbiota del ciego de los ratones debido al consumo de una dieta alta en grasa. ST, dieta estándar; HF, dieta alta en grasa.

El consumo de la dieta alta en grasa incrementó la abundancia relativa del filo Proteobacteria (familias: Helicobacteraceae y Desulfovibrionaceae incluyendo el género *Bilophila*) y disminuyó los filos Firmicutes (familias: Ruminococcaceae, Lactobacillaceae, Erysipelotrichaceae, Lachnospiraceae y Dehalobacteriaceae incluyendo los géneros *Lactobacillus*, *Coprobacillus*, *Allobaculum*, *Roseburia* y *Dehalobacterium*) y Bacteroidetes (familias: S24\_7 y Prevotellaceae incluyendo el género *Prevotella*; Figura 6.9).

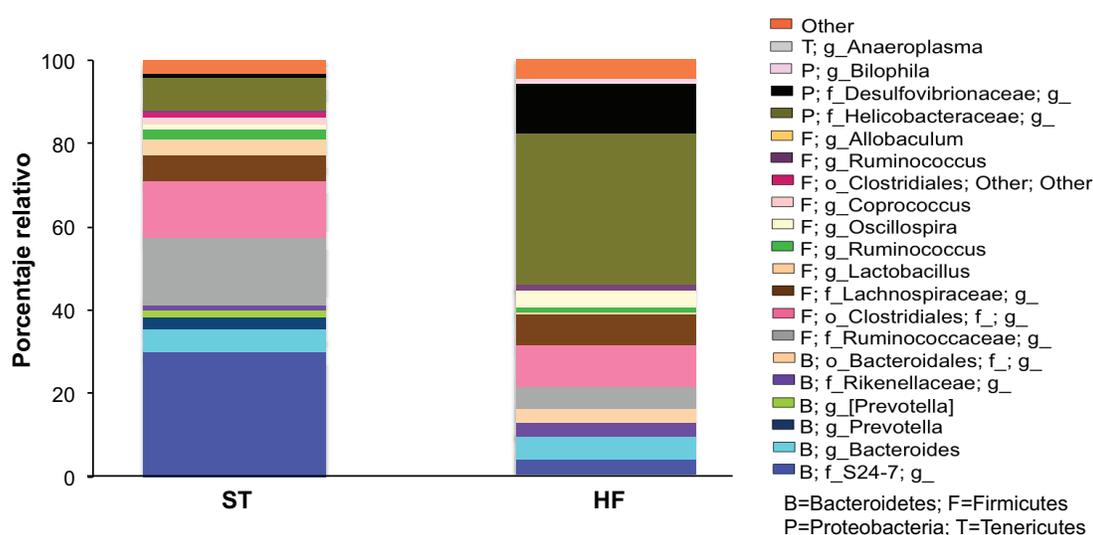


Figura 6.9: Variación en la abundancia relativa de las principales taxas (>1%) presentes en la microbiota del ciego de los ratones debido a la ingesta de una dieta alta en grasa por cinco semanas. ST, dieta estándar; HF, dieta alta en grasa.

A pesar de que los ratones con sobrepeso, mostraron una disminución significativa de los filos Firmicutes y Bacteroidetes en relación al grupo control (Figura 6.10); la relación Firmicutes/Bacteroidetes resultó ser mayor de manera significativa para los ratones con sobrepeso con respecto al grupo control (1.78 vs 1.17; respectivamente). El aumento en la relación Firmicutes/Bacteroidetes que exhibieron los ratones con sobrepeso, es muy importante, ya que ésta se considera un biomarcador de obesidad [139–141].

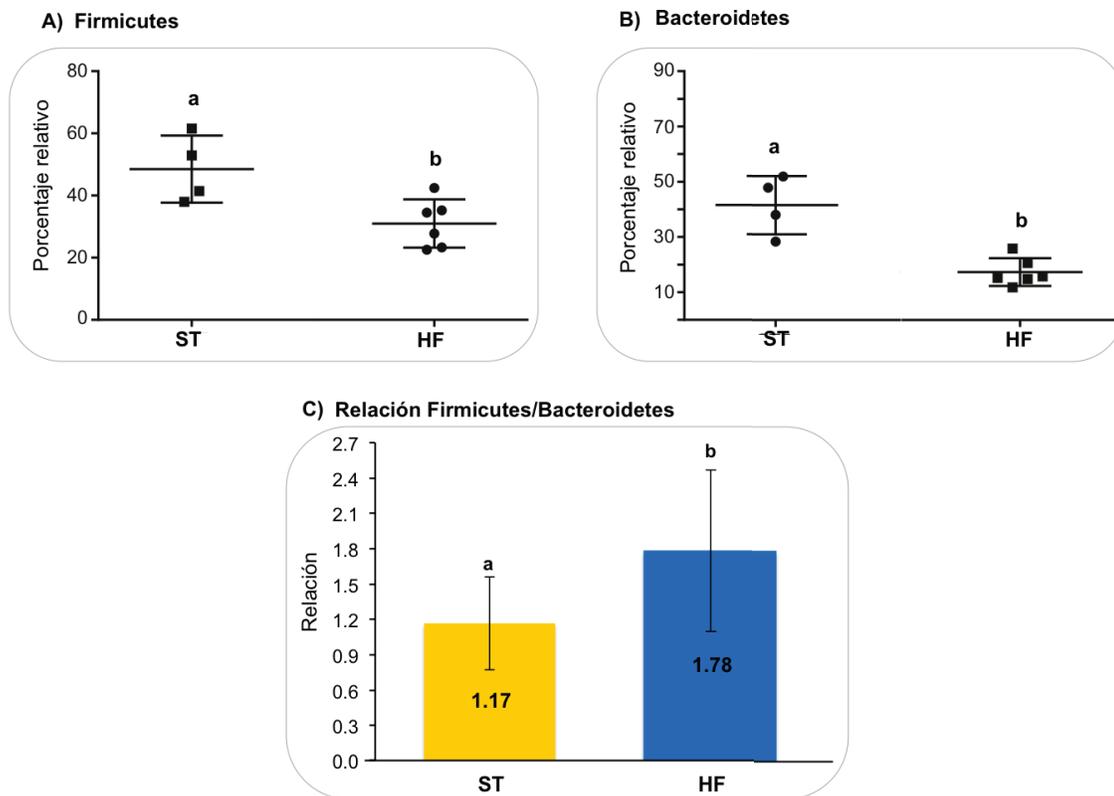


Figura 6.10: Modificación de la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota del ciego de los ratones debido al consumo de una dieta alta en grasa. A) Abundancia relativa de Firmicutes; B) Abundancia relativa de Bacteroidetes; C) Relación Firmicutes/Bacteroidetes. ST, dieta estándar; HF, dieta alta en grasa. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba t de Student;  $P < 0.05$ ).

Como previamente se mostró, el consumo de la dieta alta en grasa por 5 semanas, originó cambios drásticos en la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso. Sin embargo, los géneros de bacterias enriquecidos de manera significativa bajo la dieta alta en grasa fueron: *Bilophila*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus*, *Mucispirillum* y *Lactococcus* (Figura 6.11). En esta misma figura, se muestra que los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Coprobacillus*, *Sutterella*, *Allobaculum*, *Dehalobacterium*, *Roseburia* y *Anaeroplasma* disminuyeron de manera significativa con el consumo de la dieta alta en grasa. El tamaño de las barras en la Figura 6.11, estima el efecto de cada género diferencialmente abundante; es decir, en el presente estudio, el incremento del género *Bilophila* y la disminución de los géneros *Lactobacillus* y *Prevotella*

son las taxas bacterianas que inducen el mayor efecto en los ratones con sobrepeso. Interesantemente, algunos de los géneros que disminuyeron de manera significativa con el consumo de la dieta alta en grasa (*Lactobacillus*, *Allobaculum* y *Roseburia*) se consideran benéficos para la salud del hospedero [141, 167–169]; mientras que, algunas especies del género *Bilophila* (el cual se enriqueció de manera significativa con la ingesta de la dieta rica en grasa), son patógenos oportunistas que han sido asociados a enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo: *B. wadsworthia* [170]).

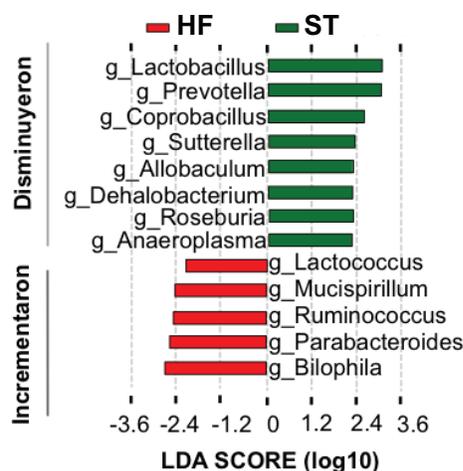


Figura 6.11: Análisis lineal discriminante mostrando los géneros de bacterias diferencialmente abundantes entre los ratones que fueron alimentados con la dieta estándar (ST) y los que recibieron la dieta alta en grasa (HF) por 5 semanas.

#### 6.2.1.4. pH y ácidos grasos de cadena corta en contenido del ciego

Los ratones con sobrepeso mostraron una reducción significativa en la concentración de los *SCFA* y por lo tanto, también presentaron un aumento significativo en el pH del contenido colónico, con respecto a los ratones control (Tabla 6.2). Estos resultados fueron asociados con los cambios drásticos en la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso, lo cual es consistente con la alteración en la actividad metabólica microbiana como previamente ha sido reportado [171].

Tabla 6.2: Efecto de la ingesta de una dieta alta en grasa sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta y pH del contenido del ciego de los ratones.

Grupo	pH	Acido acético	Acido propiónico	Acido butírico
ST	$7.60 \pm 0.12^a$	$15.13 \pm 0.92^a$	$3.85 \pm 0.20^a$	$4.54 \pm 0.33^a$
HF	$8.18 \pm 0.06^b$	$5.43 \pm 0.65^b$	$1.96 \pm 0.11^b$	$1.72 \pm 0.09^b$

ST, dieta estándar; HF, dieta alta en grasa. La concentración del ácido acético, propiónico y butírico son  $\mu\text{moles/g}$  de peso fresco. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba t de Student;  $P < 0.05$ ).

### 6.2.2. Efecto del cambio de dieta y la suplementación con fructanos de *Agave* en los ratones con sobrepeso

#### 6.2.2.1. Ingesta de alimento y disminución del peso corporal de los ratones

Al inicio de la segunda etapa experimental (después del consumo de la dieta alta en grasa por 5 semanas), los ratones con sobrepeso se cambiaron a la dieta estándar (HF-ST), suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O), la cual consumieron por 5 semanas más; mientras que, el grupo control permaneció en la dieta estándar (ST-ST). Al término de la segunda etapa experimental (después del cambio de dieta y el consumo de fructanos), se observó que los ratones que recibieron las dietas suplementadas con fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) disminuyeron la ingesta de alimento de forma significativa con respecto a los animales que se alimentaron con la dieta estándar (HF-ST y ST-ST; Figura 6.12).

El cambio de dieta llevó a los ratones con sobrepeso (HF-ST) a una pérdida de peso corporal de  $\approx 4\%$ . Interesantemente, la pérdida de peso corporal de los ratones que recibieron el suplemento con fructanos *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) fue más del doble  $\approx 9\%$  con respecto al grupo HF-ST; mostrando incluso, de manera sorpresiva, valores de peso corporal muy cercanos a los que presentaban los animales del grupo control (ST-ST); los cuales fueron alimentados exclusivamente con dieta estándar durante todo el experimento (Figura 6.13).

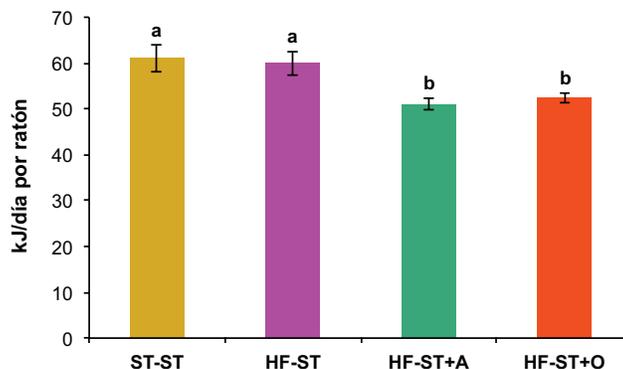


Figura 6.12: Ingesta de alimento de los ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar (HF-ST), suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST), ratones sanos alimentados con dieta estándar. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

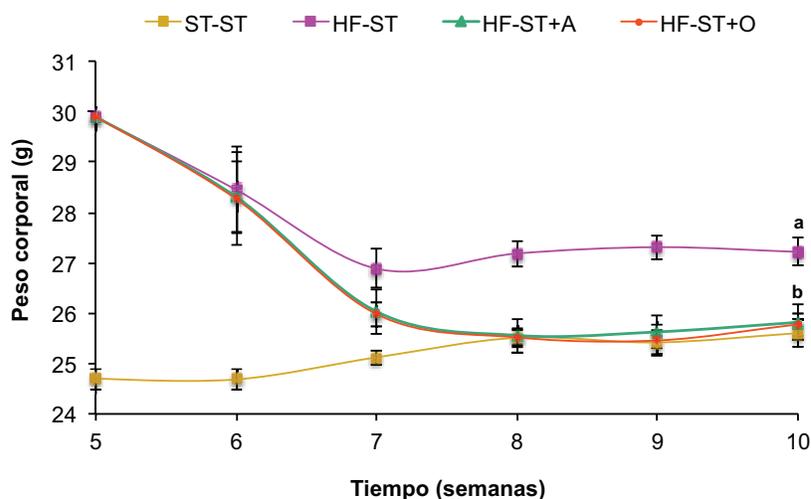


Figura 6.13: Disminución del peso corporal de los ratones con sobrepeso debido al cambio de dieta y al suplemento con fructanos. (HF-ST), ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar; suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST), ratones sanos alimentados con dieta estándar. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

La mayor pérdida de peso observada en los ratones que recibieron el suplemento de fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) puede ser debido a la modulación de la microbio-

ta intestinal (lo cual favorece el enriquecimiento de géneros de bacterias específicos [70, 73]) y al incremento en la concentración de los *SCFA* (ácido acético, propiónico y butírico) productos de la fermentación de los fructanos en el ciego y colon de los ratones. Recientemente se reportó que el ácido acético suprime el apetito a través de un mecanismo homeostático central [172], mientras que los ácidos propiónico y butírico, interactúan con los receptores (*FFA*) del hospedero, los cuales han sido unidos a las hormonas (*GLP-1* y *PYY*) que afectan la saciedad, por lo que el individuo muestra una reducción en la ingesta de alimento (Figura 6.12) y en consecuencia una disminución del peso corporal [127–129](Figura 6.13).

#### **6.2.2.2. Efecto en los parámetros metabólicos (glucosa, triglicéridos y colesterol)**

Al término de la segunda etapa experimental (después del cambio de dieta), los ratones con sobrepeso mostraron una ligera disminución en los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre. Sin embargo, los animales que cambiaron su dieta y recibieron el suplemento con fructanos de *Agave* o inulina, fueron capaces de contrarrestar los desórdenes metabólicos inducidos por el consumo de la dieta alta en grasa (Tabla 6.3). Increíblemente, no hubo una diferencia significativa en los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol entre los ratones con sobrepeso que cambiaron su dieta y recibieron los prebióticos (HF-ST+A y HF-ST+O) y los animales control (ST-ST).

El hecho de que únicamente los ratones con sobrepeso que recibieron la dieta suplementada con fructanos (*Agave* o inulina) lograran revertir los desórdenes metabólicos inducidos por la ingesta de la dieta rica en grasa, podría estar asociado a la modulación selectiva de la microbiota a lo largo del colon, que inducen los fructanos a través de la producción de los *SCFA*, como previamente se ha reportado [173]. Acetato y propionato son entregados al hígado a través de la vena porta, en donde el incremento en la proporción de propionato/acetato puede potencialmente disminuir la lipogénesis [101]. Además, el ácido propiónico ha sido reportado para

Tabla 6.3: Efecto del cambio de dieta y el suplemento de fructanos sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de ratones con sobrepeso.

Grupo	Glucosa (mM)	Triglicéridos (mM)	Colesterol (mM)
ST-ST	$6.42 \pm 0.08^b$	$0.55 \pm 0.01^b$	$1.67 \pm 0.18^b$
HF-ST	$7.36 \pm 0.11^a$	$0.82 \pm 0.05^a$	$2.37 \pm 0.20^a$
HF-ST+A	$6.40 \pm 0.27^b$	$0.61 \pm 0.02^b$	$1.89 \pm 0.14^b$
HF-ST+O	$6.44 \pm 0.18^b$	$0.49 \pm 0.03^c$	$1.82 \pm 0.12^b$

(HF-ST), ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar; suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST), ratones sanos alimentados con dieta estándar. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letras fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

inhibir la síntesis de ácidos grasos (*in vitro*) y tiene una influencia positiva sobre el metabolismo del hospedero mediante la regulación de la gluconeogenesis intestinal [174]. Por otra parte, el butirato induce la secreción de la hormona *GLP-1*, la cual incrementa la secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas, disminuyendo la concentración de glucosa en sangre del individuo [175–177]. Los elevados niveles en la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre, que mostraron los ratones con sobrepeso que solo cambiaron su dieta (HF-ST), dan evidencia de que el simple cambio de dieta no fue suficiente para revertir los desórdenes metabólicos que presentaron los ratones con sobrepeso debido al consumo de la dieta rica en grasa.

### 6.2.3. Cambios en la microbiota del ciego de los ratones después de la ingesta de fructanos

El cambio de dieta realizado a los ratones con sobrepeso, en la segunda etapa experimental, llevó al grupo (HF-ST) a recuperar la diversidad de la microbiota. En contraste, los ratones que recibieron el suplemento con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) mostraron una restauración parcial de la diversidad microbiana del ciego (Figura 6.14 A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la diversidad bacteriana entre los animales que recibieron los fructanos ramificados de *Agave* y los que consumieron fructanos lineales tipo inulina (Figura 6.14 A). Interesantemente, los ratones que recibieron el suplemento con fructanos

(HF-ST+A o HF-ST+O) muestran una comunidad bacteriana más similar entre ellos, con respecto a los roedores que consumieron la dieta estándar (HF-ST o ST-ST; Figura 6.14 B).

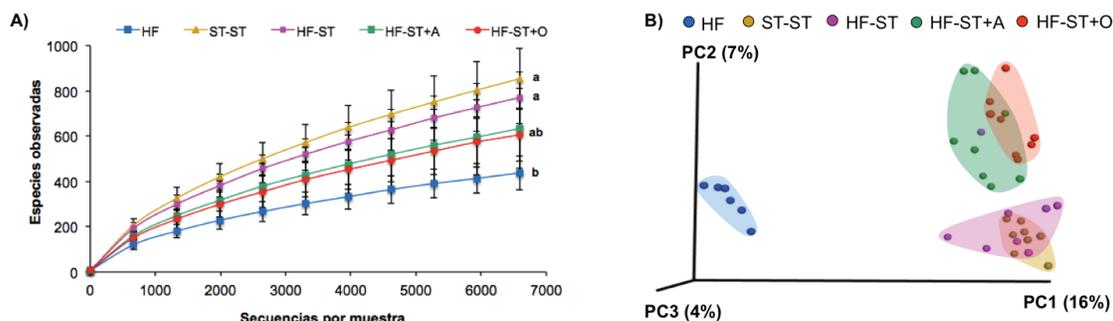


Figura 6.14: Efecto del cambio de dieta y el suplemento de fructanos sobre la microbiota del ciego de ratones con sobrepeso. A) Diversidad de la microbiota y B) Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades microbianas del ciego de los ratones. (HF) ratones alimentados con dieta alta en grasa por 5 semanas; (ST-ST), ratones alimentados con dieta estándar; (HF-ST), ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar; suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

La restauración parcial de la diversidad microbiana del ciego que se observó en los ratones con sobrepeso que consumieron los prebióticos (*Agave* o inulina), puede ser debido a que los suplementos son selectos hacia bacterias específicas, que tienen la capacidad de tolerar condiciones más ácidas de pH, producto de la fermentación de los fructanos [32], motivo por el cual sus comunidades microbianas son más similares entre estos grupos en comparación con los grupos de ratones que recibieron la dieta estándar (HF-ST y ST-ST).

Por otra parte, el cambio de dieta (con o sin el suplemento de fructanos) incrementó la abundancia relativa de Firmicutes, Bacteroidetes, Tenericutes, Actinobacteria y Cyanobacteria y disminuyó Proteobacteria, Deferribacteres y Verrucomicrobia con respecto al grupo HF (Figura 6.15), confirmando la enorme plasticidad que tiene la microbiota. De forma notable, la abundancia relativa de Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria en los ratones que consumieron el suplemento con fructanos

de *Agave* (HF-ST+A) fue más parecida a los grupos control (ST-ST y HF-ST); en relación a los animales que consumieron inulina (HF-ST+O); lo cual es muy interesante, ya que esto significa que los cambios en la microbiota intestinal producidos por los fructanos de *Agave* son menos drásticos, en relación a los provocados por los fructanos tipo inulina, incluso podría decirse que los fructanos de *Agave* modulan la microbiota hacia una composición saludable (similar a la exhibida por el grupo ST-ST), pero con el enriquecimiento de microorganismos que promueven la salud (a diferencia del grupo HF-ST).

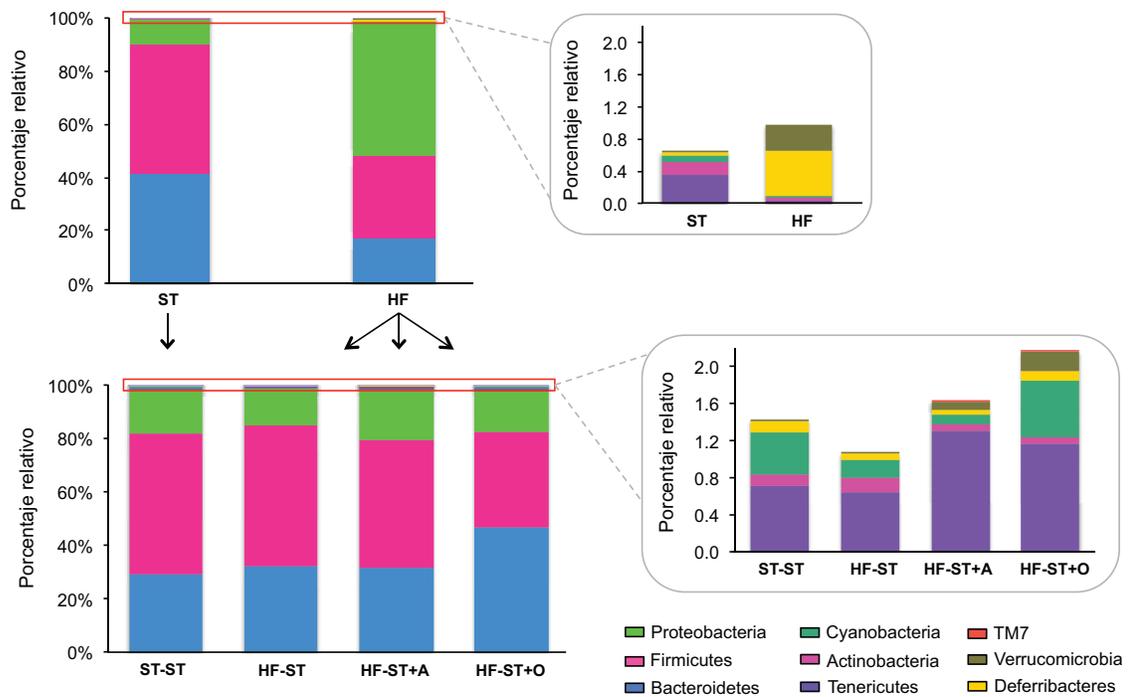


Figura 6.15: Cambios en la abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso debido al cambio de dieta y al suplemento con fructanos. (ST; HF) ratones alimentados con dieta estándar o alta en grasa por 5 semanas. (HF-ST), ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar; suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST), ratones sanos alimentados con dieta estándar.

Además de los cambios en la microbiota a nivel de filo, señalados anteriormente, se observó un cambio drástico en la composición de la microbiota del ciego a nivel

de familia y género en los roedores que cambiaron su dieta con o sin el suplemento de fructanos con respecto al grupo HF. Las familias Helicobacteraceae y Desulfovibrionaceae (incluyendo el género *Bilophila*), pertenecientes al filo Proteobacteria (las cuales se incrementaron abruptamente, después del consumo de la dieta alta en grasa), mostrando un decremento con el cambio de dieta y el suplemento de fructanos. Mientras que las familias Ruminococcaceae y Erysipelotrichaceae (incluyendo el género *Allobaculum*) pertenecientes al filo Firmicutes y las familias S24\_7 y Prevotellaceae incluyendo el género *Prevotella*, pertenecientes al filo Bacteroidetes, presentaron un incremento en su abundancia relativa (Figura 6.16).

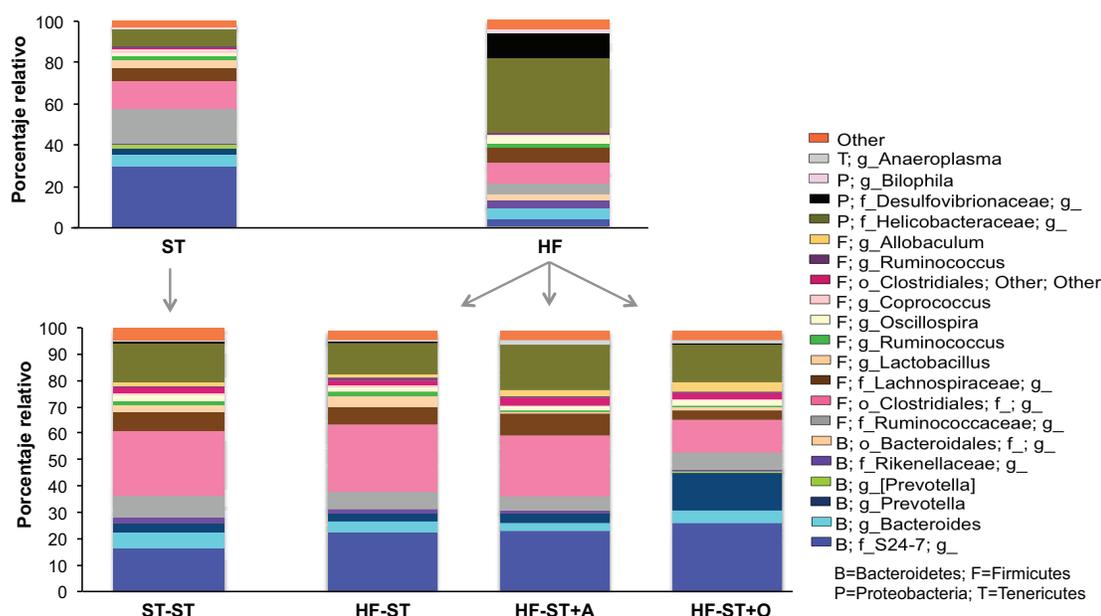


Figura 6.16: Variación en la abundancia relativa de las principales taxas (>1%) debido al cambio de dieta y al suplemento con fructanos.(ST; HF), ratones alimentados con dieta estándar o alta en grasa por 5 semanas. (HF-ST), ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar; suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST), ratones sanos alimentados con dieta estándar.

Por otra parte, el cambio de dieta (con o sin el suplemento de fructanos) llevó a una disminución de la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso (Figura 6.17). Sin embargo, la dieta no fue el único

factor que afectó la microbiota presente en el ciego de los ratones, ya que se observó que la edad del ratón también modificó la microbiota, esto se puede apreciar en los ratones control los cuales se alimentaron únicamente con dieta estándar durante todo el experimento y sin embargo, exhibieron una variación en la composición de la microbiota (Figuras 6.16 y 6.17). La restauración de la proporción Firmicutes/Bacteroidetes debido al cambio de dieta, llevó a los ratones con sobrepeso a una pérdida de peso corporal [33, 34]; sin embargo, el aumento en la pérdida de peso observada en los ratones que recibieron el suplemento de fructanos (*Agave* o inulina) puede ser atribuido al enriquecimiento de géneros de bacterias específicos y al incremento en la concentración de los *SCFA* en el contenido colónico de los ratones.

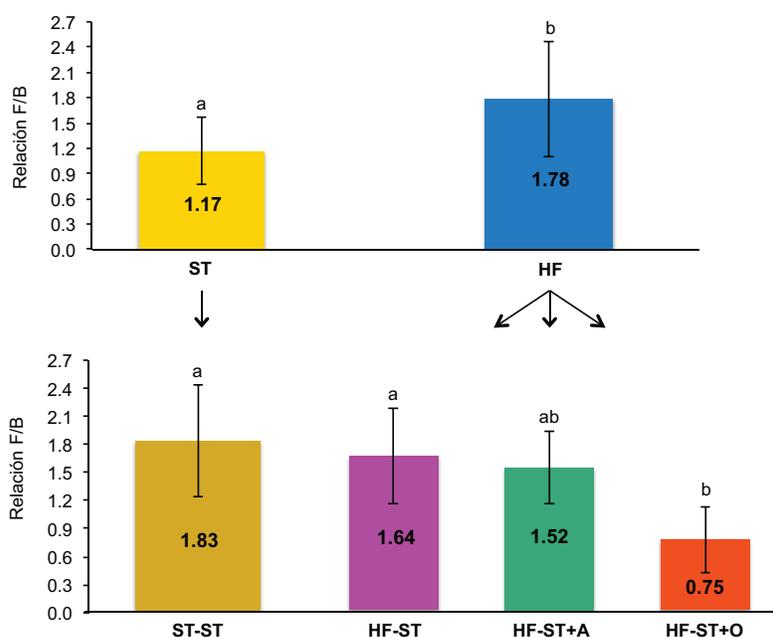


Figura 6.17: Cambio en la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso debido al cambio de dieta y al suplemento con fructanos.(ST; HF), ratones alimentados con dieta estándar o alta en grasa por 5 semanas. (HF-ST), ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar; suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST), ratones sanos alimentados con dieta estándar. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

La suplementación de la dieta con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-

ST+O) fue asociada con diferentes comunidades: con respecto al grupo HF-ST, el suplemento de fructanos de *Agave* enriqueció 2 géneros de manera significativa (*Citrobacter* y *Klebsiella*) y disminuyó 4 (*Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Prevotella* y *Coprococcus*; Figura 6.18 A), mientras que el suplemento de inulina enriqueció 3 (*Prevotella*, *Faecalibacterium* y *Allobaculum*) y disminuyó 6 (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Odoribacter*, *Adlercreutzia*, *Desulfovibrio* y *Ruminococcus*; Figura 6.18 B). En relación al suplemento de inulina, los fructanos de *Agave* enriquecieron *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* y disminuyeron *Prevotella*, *Bacteroides*, *Dehalobacterium* y *Oscillospira* (Figura 6.18 C).

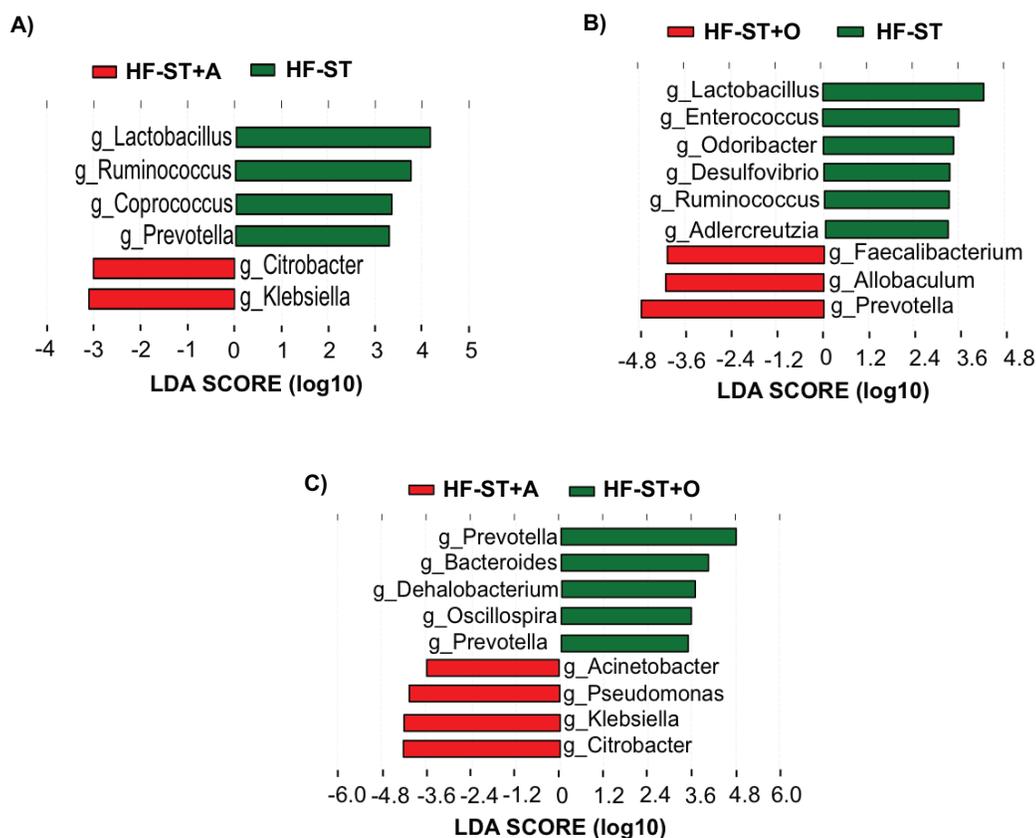


Figura 6.18: Análisis lineal discriminante mostrando los géneros de bacterias diferencialmente abundantes entre los ratones con sobrepeso que se alimentaron con: A) El cambio de dieta y el suplemento con fructanos de *Agave* vs el simple cambio de dieta; B) El cambio de dieta y el suplemento con inulina vs el simple cambio de dieta; C) El suplemento con fructanos de *Agave* vs inulina.

Estudios previos muestran que el consumo de una dieta rica en grasa induce una disminución importante de *Bifidobacterium* en el contenido colónico de los ratones [70, 134, 178]. El hecho de que no se encontrara un enriquecimiento significativo de *Bifidobacterium*, después de la ingesta de fructanos, como previamente se había reportado para ratones con obesidad inducida a través del consumo de una dieta rica en grasa [70]; podría ser atribuido a la baja presencia de este género en la microbiota de los ratones con sobrepeso (partiendo del enfoque de los prebióticos, el cual considera que muchos microorganismos positivos para la salud del huésped residen en el colon). Un prebiótico no puede ser fermentado de manera selectiva únicamente por uno o dos géneros de bacterias, ni tampoco por toda la microbiota presente en el ciego. En la literatura, se establece que el efecto prebiótico se considera cuando el fructano induce el crecimiento selectivo de microorganismos que promueven la salud. Reportes previos muestran que *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* (y algunas veces *Roseburia*) son considerados microorganismos benéficos [48, 121, 179], mientras que *Clostridia* es con frecuencia asociada con efectos perjudiciales en la salud [48, 179]. Sin embargo, este tipo de consideraciones son un problema muy fuerte debido a que no se ha llegado a un consenso en el que se establezca cuáles son los microorganismos que constituyen una microbiota benéfica y cuáles conforman una microbiota intestinal perjudicial [180]. De hecho, grupos de bacterias que previamente se identificaron como perjudiciales a la salud del individuo, tal es el caso de *Clostridia*, recientemente han mostrado tener un potencial probiótico debido a que esta comunidad está implicada en la tolerancia a alérgenos alimentarios [181, 182]. Además, nuevas especies bacterianas con potencial benéfico son constantemente descubiertas tal es el caso de *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* [183, 184]. En este sentido, en el presente trabajo se mostró que los fructanos de *Agave* enriquecieron los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter* (perteneciendo a la familia Enterobacteriaceae; Figura 6.18 A) en el contenido colónico de ratones con sobrepeso. El incremento de estos dos géneros de bacterias no ha sido reportado en estudios con fructanos. Sin embargo, recientes investigaciones en ratones con obesidad inducida mediante una dieta alta en grasa [185] o en humanos con obesidad morbida [186, 187] han asociado

la presencia de la familia Enterobacteriaceae con la pérdida de peso corporal después de un tratamiento quirúrgico de bypass gástrico. Por lo tanto, el enriquecimiento de la familia Enterobacteriaceae en los ratones que consumieron la dieta suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) pudiera estar asociada con la mayor pérdida de peso corporal y los efectos sistémicos observados en estos animales. Sin embargo, son necesarias futuras investigaciones con estos dos géneros de bacterias identificadas, así como el estudio de su interacción con la salud del hospedero.

Por otra parte, el suplemento con inulina (HF-ST+O) llevó a un enriquecimiento de los géneros *Prevotella*, *Allobaculum* y *Faecalibacterium* en relación al grupo HF-ST. Un estudio previo reportó la asociación del género *Allobaculum* con una reducción de peso corporal en ratones con obesidad inducida mediante una dieta alta en grasa [169], no obstante, ya se ha reportado el enriquecimiento de los géneros *Allobaculum* y *Faecalibacterium* después de la ingesta de inulina [70] y son considerados benéficos para el hospedero.

Finalmente, las diferencias en los géneros de bacterias enriquecidos con la ingesta de los fructanos ramificados de *Agave* y los fructanos tipo inulina fueron atribuidos a las diferencias estructurales entre ambos prebióticos, al grado de polimerización, la microbiota presente en el ciego de los ratones con sobrepeso, así como a la tolerancia de las condiciones presentes en el intestino [171]; en este sentido, la dieta suplementada con fructanos de *Agave* mostró un enriquecimiento de los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* y disminuyó *Prevotella*, *Bacteroides*, *Dehalobacterium* y *Oscillospira*, en relación a la dieta suplementada con inulina (Figura 6.18 C); Sin embargo, ambos fructanos tienen la capacidad de modular la microbiota del ciego e inducir efectos benéficos en la salud de los ratones con sobrepeso.

### 6.2.4. pH y concentración de los ácidos grasos de cadena corta en el contenido colónico de los ratones

#### 6.2.4.1. Análisis del contenido del ciego de los ratones

El pH del contenido del ciego de los ratones con sobrepeso, que consumieron la dieta suplementada con fructanos (*Agave* o inulina), fue menor de manera significativa con respecto a los animales alimentados con la dieta estándar (ST-ST y HF-ST; Figura 6.19 A).

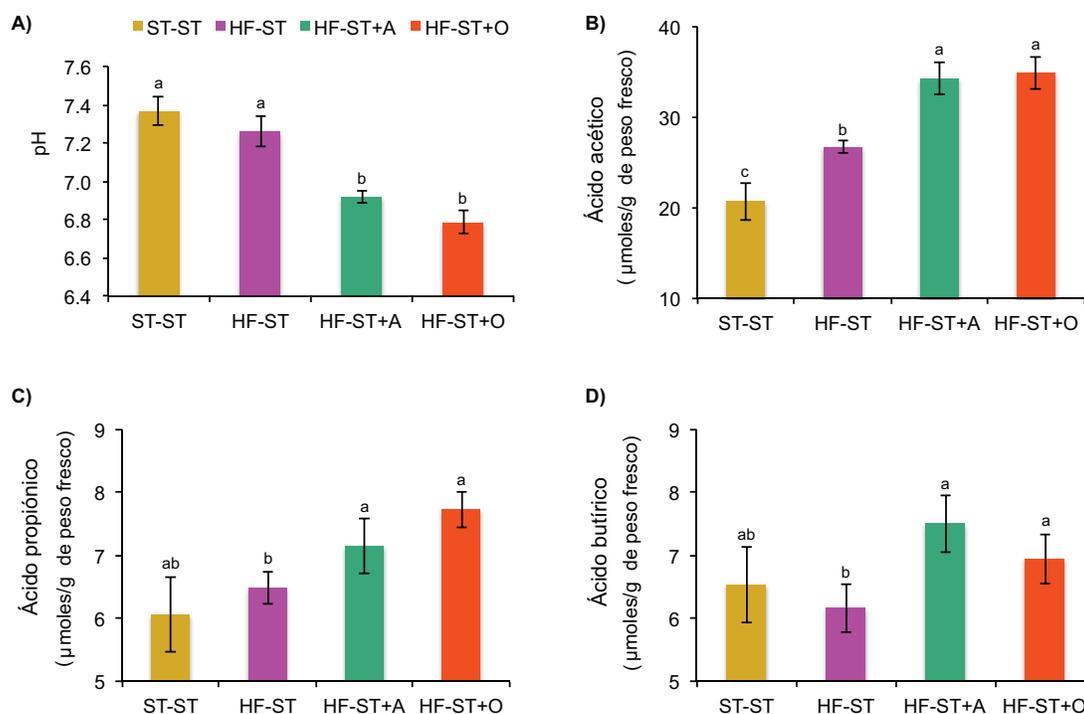


Figura 6.19: pH y niveles de los SCFA en el contenido del ciego de los ratones con sobrepeso después del cambio de dieta (HF-ST); y el suplemento con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST) corresponde a ratones control alimentados con dieta estándar. A) pH; B) Ácido acético; C) Ácido propiónico y D) Ácido butírico. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

Además, únicamente los ratones con sobrepeso que fueron cambiados a la dieta estándar suplementada con fructanos (*Agave* o achicoria), mostraron un aumento

significativo de los *SCFA* en el contenido del ciego, en relación a los ratones que no recibieron ningún suplemento (ST-ST y HF-ST; Figura 6.19). Sin embargo, se observó que el simple cambio de dieta llevó a los roedores a recuperar las condiciones ácidas y la concentración de *SCFA* en el contenido del ciego en comparación a su estado inicial para estos parámetros (Tabla 6.2). No obstante, los animales que cambiaron de dieta y consumieron el suplemento de fructanos (*Agave* o inulina) mostraron un aumento en la concentración de los *SCFA*; lo cual se debe a que los fructanos modificaron la microbiota del ciego de los animales (enriqueciéndose géneros de bacterias con capacidad para fermentar a estos prebióticos), por lo tanto, se eleva la producción de ácido acético, propiónico y butírico (productos de la fermentación), llevando en consecuencia a una disminución en el pH del contenido del ciego de los roedores (Figura 6.19). Además del enriquecimiento de los géneros selectos que pudieran conferir beneficios al hospedero (Figura 6.18), como el contrarrestar los desórdenes metabólicos inducidos por el consumo de la dieta alta en grasa (Tabla 6.3), el incremento en la concentración de los *SCFA* también podría estar asociado con el aumento en la pérdida de peso observada en los animales que consumieron las dietas suplementadas con fructanos [127–129].

#### 6.2.4.2. *Análisis del contenido colónico de los ratones*

Los ratones que recibieron el suplemento de fructanos (*Agave* o inulina) exhibieron una disminución substancial del pH en las tres secciones del colon (proximal, medio y distal) con respecto a los animales que se alimentaron con la dieta estándar (ST-ST y HF-ST; Figura 6.20 A). En contraste, los ratones con sobrepeso que únicamente cambiaron su dieta a la estándar (HF-ST), mostraron un aumento significativo del pH en las tres secciones del intestino. Interesantemente, únicamente los grupos (HF-ST+A y HF-ST+O), presentaron una elevación en la concentración de los *SCFA* a lo largo del colon en relación a los grupos (ST-ST y HF-ST).

Los fructanos de *Agave* fueron fermentados principalmente en el colon medio y distal en comparación a la inulina, la cual se fermentó mayoritariamente en el colon proximal (Figura 6.20). El ácido acético fue el más abundante en el colon de los ratones

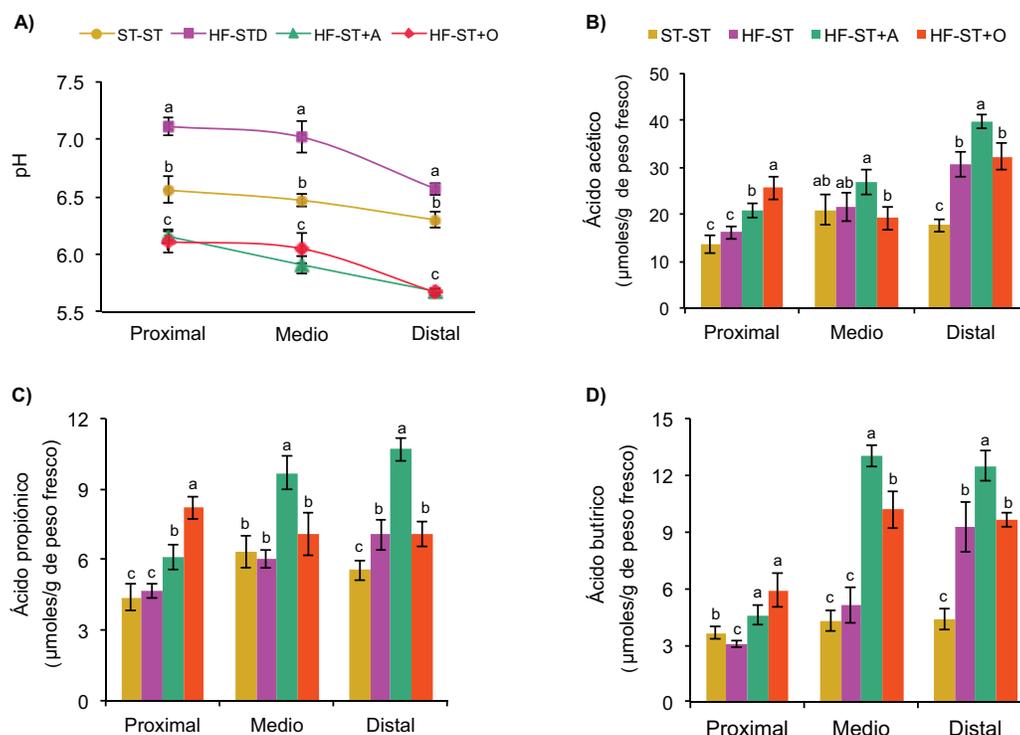


Figura 6.20: pH y niveles de los SCFA en el contenido colónico de los ratones con sobrepeso después del cambio de dieta (HF-ST); y el suplemento con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST) corresponde a ratones control alimentados con dieta estándar. A) pH; B) Ácido acético; C) Ácido propiónico y D) Ácido butírico en cada una de las secciones del colon. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

(independientemente de la dieta), seguido por los ácidos propiónico y butírico. La concentración de ácido acético fue mayor de manera importante en el colon proximal de los ratones que consumieron fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) en relación a los animales que no recibieron el suplemento (ST-ST y HF-ST); en el colon medio no hubo diferencias destacables en la concentración de ácido acético entre los diferentes tratamientos y hacia el colon distal, solo el grupo control (ST-ST) mostró una reducción substancial en la concentración de este ácido en relación a los demás grupos (HF-ST, HF-ST+A y HF-ST+O; Figura 6.20 B). La cantidad de ácido propiónico fue notablemente mayor en el colon proximal de los animales que recibieron el suplemento de fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) con respecto a los grupos (ST-ST y HF-ST); sin embargo, solo el grupo HF-ST+A exhibió un aumento substancial

de este ácido en el colon medio ( 37 %) y distal ( 51 %) con respecto a los demás grupos (ST-ST, HF-ST, HF-ST+O; Figura 6.20 C). Por último, el ácido butírico se incrementó significativamente en el colon proximal de los ratones que recibieron el suplemento de fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) con respecto a los grupos (ST-ST y HF-ST); pero únicamente el grupo HF-ST+A mostró un aumento destacable de ácido butírico en colon medio y distal en relación a los demás grupos (ST-ST, HF-ST, HF-ST+O; Figura 6.20 D).

Los fructanos son fermentados en el ciego y colon del individuo, sitios en los cuales el ácido acético, propiónico y butírico son generalmente producidos. La fermentación de los fructanos ramificados y lineales (*Agave* e inulina, respectivamente) fue muy similar en el ciego de los animales (Figura 6.19), no obstante, en el colon se observó una diferencia muy clara en la fermentación de ambos fructanos de bajo *DP* (Figura 6.20). Los fructanos de *Agave* con un *DP* promedio de 8 fueron fermentados lentamente en el colon proximal, pero mostraron una mayor fermentación hacia el colon medio y distal, lo cual se deba muy probablemente a su complejidad estructural [17, 18, 30]; mientras que, la inulina (fructanos lineales) con un *DP* promedio de 5, fue fermentada principalmente en el colon proximal como previamente había sido reportado [57].

La disminución del pH en el ciego y las tres secciones del colon de los ratones que consumieron la dieta suplementada con fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) se asoció con el aumento en la concentración de los *SCFA* observado en estos grupos, en relación a los animales que consumieron la dieta estándar (HF-ST y ST-ST; Figuras 6.19 y 6.20). La disminución del pH puede cambiar la composición de la microbiota y promover el crecimiento de bacterias benéficas, previniendo el crecimiento excesivo de bacterias patogénicas sensibles al pH como previamente a sido reportado [89, 90]. En contraste, los ratones con sobrepeso que solo cambiaron su dieta (HF-ST) exhibieron los mayores valores de pH en las tres secciones del colon. Por lo tanto, el simple cambio de dieta fue suficiente para revertir la disbiosis (alteraciones en la microbiota) debido al consumo de la dieta alta en grasa, pero no fue suficiente para

recuperar su funcionalidad [163], mientras que el cambio de dieta y el suplemento con prebióticos (HF-ST+A y HF-ST+O) originó un cambio favorable en la microbiota intestinal y mejoró la salud de los ratones [70].

El notable aumento de la concentración de los *SCFA* en el colon de los animales, podría asociarse a los efectos fisiológicos observados en los roedores (Tabla 6.3; Figuras 6.12 y 6.13). De manera puntual, el incremento en los niveles de ácido acético en el ciego y colon distal del grupo HF-ST (Figuras 6.19 B y 6.20 B) se asoció con los niveles elevados de triglicéridos y colesterol que presentaron estos animales (Tabla 6.3); debido a que el ácido acético estimula la síntesis de colesterogénesis y lipogénesis en el hígado [64–67]. Por otra parte, el aumento substancial de ácido propiónico, observado únicamente en los grupos de animales que consumieron los prebióticos (HF-ST+A y HF-ST+O), se relacionó con la disminución en los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre que exhibieron estos ratones (Tabla 6.3); ya que el ácido propiónico (a diferencia del acético) inhibe la síntesis de colesterogénesis y lipogénesis en el hígado [64–67].

Mientras que, la elevada concentración de ácido butírico que se observó en el contenido colónico de los ratones que recibieron los fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) fue relacionado con la disminución en la ingesta de alimento (Figura 6.12), el incremento en la pérdida de peso corporal (Figura 6.13) y la disminución en los niveles de glucosa en sangre (Tabla 6.3) de estos animales, debido a que, el butirato es enormemente utilizado por las células L del colon, estas células son responsables de la liberación de GLP-1 (hormona insulínica) la cual inhibe la ingesta de alimento, disminuye la concentración de glucosa en sangre, decrementa la secreción de glucagón e incrementa la secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas [175–177].

### **6.2.5. Efecto sobre las hormonas grelina, *GLP-1*, insulina y leptina**

La concentración de la hormona grelina fue notablemente menor en la vena porta de los ratones con sobrepeso que cambiaron su dieta y recibieron el suplemento de inulina (HF-ST+O) en comparación con los demás grupos (ST-ST, HF-ST y HF-ST+A; Figura 6.21 A). Por otro parte, la concentración de las hormonas *GLP-1* e

insulina fue apreciablemente mayor únicamente en los animales con sobrepeso que cambiaron su dieta y recibieron el suplemento de fructanos (*Agave* o inulina), en relación a los grupos que se alimentaron con la dieta estándar (ST-ST y HF-ST; Figura 6.21 A y B). Por último, únicamente los grupos HF-ST+A y HF-ST+O mostraron una reducción significativa en los niveles de leptina con respecto al grupo (HF-ST). De forma importante, los grupos que consumieron los prebióticos (HF-ST+A y HF-ST+O) exhibieron concentraciones de leptina muy parecidas a las que presentó el grupo control (ST-ST; Figura 6.21 D).

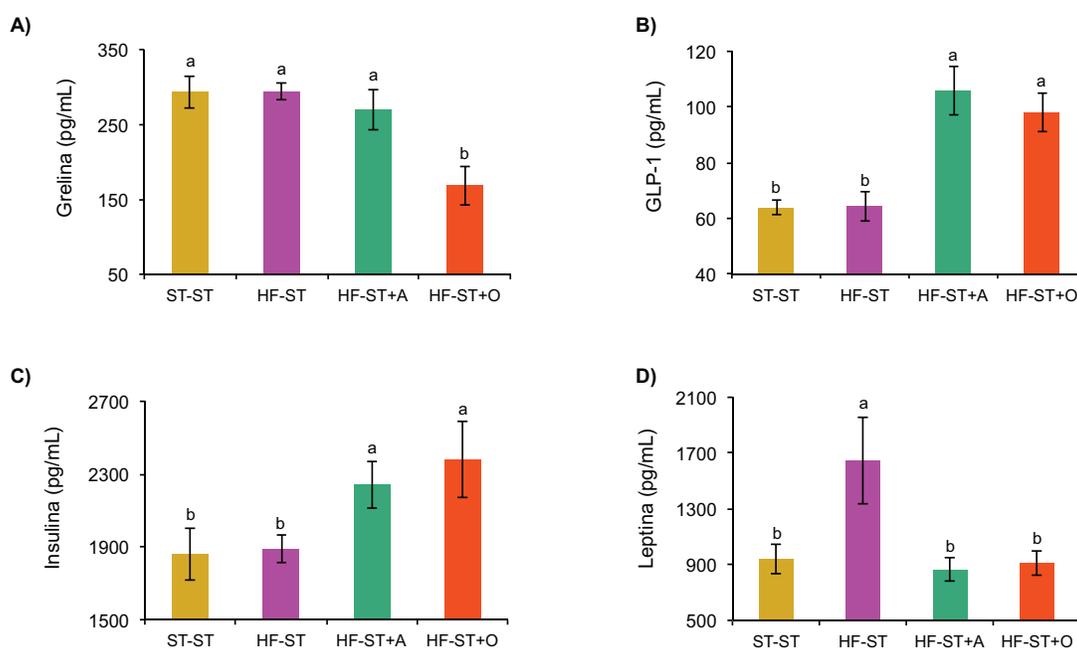


Figura 6.21: Efecto del cambio de dieta y el suplemento de fructanos sobre la concentración de las hormonas involucradas con la regulación del apetito. A) Grelina; B) *GLP-1*; C) Insulina; y D) Leptina. (HF-ST), ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar; suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) o inulina (HF-ST+O) por 5 semanas. (ST-ST), ratones sanos alimentados con dieta estándar. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EEM; las medias con diferente letra fueron estadísticamente significativas (Prueba de Bonferroni;  $P < 0.05$ ).

El incremento de *GLP-1* en los grupos HF-ST+A y HF-ST+O podría relacionarse con la menor ingesta de alimento, la disminución en la ganancia de peso corporal y los niveles más bajos en la concentración de glucosa (Tabla 6.3; Figuras 6.12 y

6.13), así como con el aumento significativo en la concentración de insulina en la vena porta de los ratones (Figura 6.21 B).

La grelina es otra hormona involucrada en la regulación de la ingesta de alimento, en el grupo HF-ST+O, esta hormona ha sido correlacionada inversamente con *GLP-1* en la vena porta [57, 135, 188]. Los fructanos lineales de bajo *DP* son fermentados preferencialmente en el colon proximal y se tiene el conocimiento de que el ácido butírico es el responsable del incremento de *GLP-1*, éstos son dos eventos clave sobre el aumento de *GLP-1* en la vena porta y consecuentemente en una disminución en los niveles de grelina [57]. El grupo de ratones que recibió la dieta suplementada con fructanos de *Agave* (HF-ST+A) presentó la concentración más alta de *GLP-1* (66 %) y disminuyó la grelina (8 %); en cambio, el grupo de ratones que recibió la inulina (HF-ST+O) mostró un aumento de *GLP-1* de (53 %) y una reducción en los niveles de grelina de (43 %) en relación a los animales que consumieron la dieta estándar (HF-ST y ST-ST; Figura 6.21). La ligera reducción en la concentración de grelina en el grupo HF-ST+A podría ser debido a la estructura compleja de los fructanos de *Agave*, que induce a ser fermentado principalmente en el colon medio y distal en comparación a la inulina.

El consumo de una dieta rica en grasa ha sido asociada con resistencia a la leptina, y ya que la leptina está implicada principalmente en la ingesta de alimento y homeostasis de energía, también esta vinculada a la regulación de la homeostasis de la glucosa y numerosas funciones gastrointestinales [169]. Interesantemente, los grupos HF-ST+A y HF-ST+O presentaron una disminución en la concentración de leptina, siendo estos valores muy similares a los encontrados en los ratones control (ST-ST; Figura 6.21 D); además, este decremento en los niveles de leptina en los grupos que consumieron los prebióticos, podría también estar relacionado con la menor ingesta de alimento y peso corporal observado en estos animales.

#### **6.2.6. Análisis de componentes principales (PCA)**

Un PCA de todas las variables consideradas en el presente estudio (peso corporal, glucosa, triglicéridos, colesterol, pH, *SCFA* y hormonas) se presenta en la Figura

6.22. El primer y el segundo componente principal (PCs) fueron responsables del 64 % de la variación total. El PC1 mostró una clara separación entre los grupos que se alimentaron con dieta estándar (ST-ST y HF-ST), sin embargo, los animales que consumieron prebióticos (HF-ST+A y HF-ST+O) mostraron un solapamiento entre ellos. El PC1 (el cual recogió el 42 % de la variación) fue controlado principalmente por la concentración del ácido butírico en el colon medio y propiónico en el colon proximal y también por los niveles de la hormona *GLP-1*; mientras que el PC2 (22 %) fue controlado por las concentraciones de triglicéridos, glucosa y colesterol en la sangre de los ratones (Figura 6.22).

Los resultados en la gráfica de PCA confirman que hubo una diferencia remarcable entre los grupos de ratones que recibieron el suplemento con fructanos (HF-ST+A y HF-ST+O) y los que se alimentaron con dieta estándar (ST-ST y HF-ST). A pesar de las grandes diferencias estructurales y a los diferentes sitios de fermentación favorecidos con los fructanos de *Agave* o inulina, los efectos sistémicos observados para ambos fructanos fueron similares; esto se corroboró en la gráfica de PCA en la cual se observó un solapamiento entre los grupos HF-ST+A y HF-ST+O. El PCA de las variables indicó que el consumo de fructanos se asoció fuertemente a los *SCFA* así como a la secreción de las hormonas (*GLP-1* e insulina). Notablemente, el peso corporal, así como la concentración de las hormonas grelina y leptina fueron estrechamente asociadas al grupo HF-ST (Figura 6.22). Finalmente, el gráfico de PCA sugiere que el aumento en la concentración de los *SCFA* y *GLP-1*, así como la disminución en los niveles de grelina y leptina, podrían ser los parámetros más importantes afectados por la ingesta de los fructanos de *Agave* e inulina, mostrando en general un decremento de los trastornos metabólicos (glucosa, triglicéridos, colesterol y peso corporal) como se muestra en la Tabla 6.3 y la Figura 6.13.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio nos indican que los fructanos de *Agave* podrían ser una opción viable para el manejo del sobrepeso, ya que éstos prebióticos no solo indujeron una pérdida de peso corporal en los ratones, sino que fueron capaces de mejorar la salud de estos (ya que revirtieron los desórdenes metabólicos originados por la ingesta de la dieta alta en grasa).

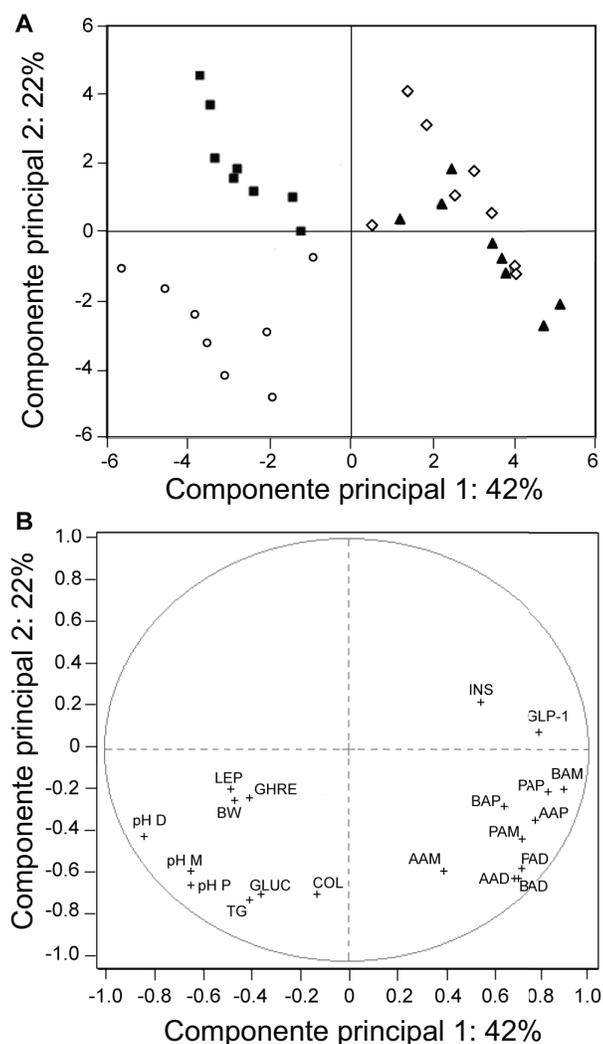


Figura 6.22: Análisis de componentes principales de todos los parámetros investigados en los ratones con sobrepeso alimentados con la dieta estándar y el suplemento con fructanos. A) Gráfica de todos los parámetros investigados en los ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar (○), suplementada con fructanos de Agave (▲) o inulina (◇) por 5 semanas; (■) corresponden a ratones sanos alimentados con dieta estándar durante todo el experimento. B) Gráfica de los 2 componentes principales. BW: peso corporal; GLU: glucosa; TG: triglicéridos; COL: colesterol; AAP, AAM y AAD: Concentración de ácido acético en el colon proximal, medio y distal respectivamente; PAP, PAM y PAD: Concentración de ácido propiónico en cada una de las secciones del colon; BAP, BAM y BAD: Concentración de ácido butírico en las secciones del colon analizadas; pH P, pH M y pH D: valores de pH en cada sección del colon; GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1; GHRE: grelina; INS: insulina; LEP: leptina.

## *Conclusiones*

En el presente proyecto se desarrolló un proceso de extracción/purificación de fructanos de *Agave*, mediante el cual se obtuvieron fructanos de forma rápida y con una alta pureza (96.6 %). Por lo cual, este proceso podría ser una alternativa para la obtención de fructanos a nivel laboratorio o industrial.

La ingesta de la dieta alta en grasa no solo cambio la composición de la microbiota de los ratones, sino que también indujo una pérdida de su diversidad, la cual fue restaurada por el cambio de dieta y la pérdida de peso corporal.

Los ratones con sobrepeso que únicamente fueron cambiados a la dieta estándar (HF-ST), mostraron una pérdida de peso corporal. Sin embargo, las alteraciones metabólicas observadas en estos animales debido al consumo de la dieta alta en grasa, no fueron revertidas. Por lo tanto, un cambio de dieta aunado a un suplemento prebiótico, tal como los fructanos de *Agave*, presentan un enorme potencial para reducir los desórdenes metabólicos asociados con sobrepeso.

Los ratones con sobrepeso que consumieron fructanos de *Agave*, revirtieron los desórdenes metabólicos (aumento en los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol) inducidos por el consumo de la dieta alta en grasa. Estos efectos fueron atribuidos al notable incremento en los niveles de los ácidos propiónico y butírico en el contenido intestinal, así como de las hormonas *GLP-1* e insulina en sangre de los animales.

La mayor pérdida de peso corporal observada en los ratones con sobrepeso, que recibieron la dieta suplementada con fructanos de *Agave*, fue asociada con la restauración de la relación Firmicutes/Bacteroidetes y al enriquecimiento de los géneros específicos (*Citrobacter* y *Klebsiella*). Esta microbiota fermentó a los fructanos de *Agave*, incrementando de manera significativa los niveles de *SCFA*, los cuáles a su vez influyeron en la modulación de las hormonas GLP-1, grelina y leptina, induciendo una pérdida de peso en el roedor.

Los efectos sistémicos observados en los ratones con sobrepeso, que consumieron fructanos de *Agave* o inulina, fueron similares, a pesar de la gran diferencia estructural entre ambos carbohidratos.

Estos resultados demuestran que los fructanos de *Agave* son una opción viable y con mucho potencial para el manejo de sobrepeso y de los desórdenes metabólicos asociados a este padecimiento.

## *Perspectivas*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde se demuestra que los fructanos de *Agave* ejercen un efecto benéfico en la salud de ratones con sobrepeso, justifican el realizar estudios en personas con sobrepeso u obesidad, ya que que estos prebióticos podrían ser una opción viable para la prevención y reducción de éstos problemas en México.

Estudiar a mayor profundidad los cambios en la microbiota después de la ingesta de fructanos de *Agave*, con la finalidad de determinar el papel que desempeñan las bacterias que se enriquecen con este prebiótico, en la salud del hospedero.

## *Bibliografía*

- [1] Woods S. C., Seeley R. J., Rushing P. A., et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr.*, 133:1081–1087, 2003.
- [2] Cani P. D., Bibiloni R., Knauf C., et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57:1470–1481, 2008.
- [3] Bose M., Lambert J. D., Ju J., et al. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J. Nutr.*, 138:1677–1683, 2008.
- [4] Buettner R., Schölmerich J., and Bollheimer C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15:798–808, 2007.
- [5] Gutiérrez J.P., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., et al. Encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT), 2012.
- [6] Rössner S. Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 26:2S–4S, 2002.
- [7] Yach D., Stuckler D., and Brownell K. D. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemic of obesity and diabetes. *Nat. Med.*, 12:62–66, 2006.
- [8] Zhang Y., Liu J., Yao J., et al. Obesity: Pathophysiology and intervention. *Nutrients*, 6:5153–5183, 2014.
- [9] Miller W. C., Koceja D. M., and Hamilton E. J. A meta-analysis of the past 25 years of weight loss research using diet, exercise or diet plus exercise intervention. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 21:941–947, 1997.
- [10] Dansinger M. L., Tatsioni A., Wong J. B., et al. Meta-analysis: the effect of dietary counseling for weight loss. *Ann. Intern. Med.*, 147:41–50, 2007.
- [11] Catenacci V. A. and Wyatt H. R. The role of physical activity in producing and maintaining weight loss. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, 3:518–529, 2007.
- [12] Church T. S., Earnest C. P. Skinner J. S., et al. Effects of different doses of physical activity on cardiorespiratory fitness among sedentary, overweight or obese postmenopausal women with elevated blood pressure: a randomized controlled trial. *JAMA*, 297:2081–2091, 2007.
- [13] WHO Consultation on Obesity. Obesity: preventing and managing the global epi-

- demic. Technical Report 894, Geneva, 2000.
- [14] Beserra B. T., Fernandes R., do Rosario V. A., et al. A systematic review and meta-analysis of the prebiotics and synbiotics effects on glycaemia, insulin concentrations and lipid parameters in adult patients with overweight or obesity. *Clin. Nutr.*, 34:845–858, 2016.
- [15] Spollen W. G. and Nelson J. C. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiol.*, 106:329–336, 1994.
- [16] Ritsema T. and Smeekens S. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:223–230, 2003.
- [17] Mancilla-Margalli N. A. and López M. G. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *J. Agric. Food Chem.*, 54:7832–7839, 2006.
- [18] López M. G., Mancilla-Margalli N. A., and Mendoza-Diaz G. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7835–7840, 2003.
- [19] Banguela A. and Hernández L. Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotecnol. Apl.*, 23:202–210, 2006.
- [20] Cairns A. J., Pollock C. J., Gallagher J. A., et al. Fructans: synthesis and regulation. In Sharkey T. D. Leegood R. C. and Von Caemmerer S., editors, *Photosynthesis: physiology and metabolism*, chapter 13, pages 301–320. Springer, 2000.
- [21] Shalini R. and Anthony U. Fructan distribution in banana cultivars and effect of ripening and processing on *Nendran* banana. *J. Food Sci. Technol.*, 52:8244–8251, 2015.
- [22] Muir J. G., Shepherd S. J., Rosella O., et al. Fructan and free fructose content of common australian vegetables and fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 55:6619–6627, 2007.
- [23] De Leenheer L. Production and use of inulin: industrial reality with a promising future. In H. Van Bekkum, H. Roper, and A.G.J. Voragen, editors, *Carbohydrates as organic raw materials III*, chapter 4, pages 67–92. Wiley-Blackwell, 1996.
- [24] Van Den Ende W., Mintiens A., Speleers H., et al. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytol.*, 132:555–563, 1996.
- [25] Good-Avila S. V., Souza V., Gaut B. S., et al. Timing and rate of speciation in *agave* (*Agavaceae*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:9124–9129, 2006.
- [26] Eguiarte L., Souza V., and Silva-Montellano A. Evolución de la familia *Agavaceae*: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Bol. Soc. Bot. México*, 66:131–150, 2000.
- [27] Sánchez-Marroquín A. and Hope P. H. *Agave* juice: fermentation and chemical

- composition studies of some species. *J. Agric. Food Chem.*, 1:246–249, 1953.
- [28] Satyanarayana M. N. Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in *Agave vera cruz*: part II biosynthesis of oligosaccharides. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 13:398–407, 1976.
- [29] Wang N. and Nobel P. S. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol.*, 116:709–714, 1998.
- [30] Mellado-Mojica E. and López M. G. Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *J. Agric. Food Chem.*, 60:11704–11713, 2012.
- [31] Gupta A. K., Kaur N., and Kaur N. Preparation of inulin from chicory roots. *JSIR*, 62:916–920, 2003.
- [32] Arrizon J., Morel S., Gschaedler A., et al. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chem.*, 122:123–130, 2010.
- [33] Ávila Fernández Á., Galicia-Lagunas N., Rodríguez-Alegría M. E., et al. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of *Agave* fructans. *Food Chem.*, 129:380–386, 2011.
- [34] Allsopp P., Possemiers S., Campbell D., et al. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe*, 22:38–44, 2013.
- [35] Márquez-Aguirre A. L., Camacho-Ruiz R. M., Arriaga-Alba M., et al. Effects of *Agave tequilana* fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal *Lactobacilli/Bifidobacteria* in obese mice. *Food Funct.*, 4:1237–1244, 2013.
- [36] Ogura T., Beltran C., and Kojima Y. Highly water-soluble *agave* inulin, *agave* inulin-containing product, *agave* inulin-origin product, by-product and method for producing the same. In *Patent Application Publication US2009/0311370A1*, 2009.
- [37] Collins F. W. and Chandorkar K. R. Thin-layer chromatography of fructo-oligosaccharides. *J. Chromatogr.*, 56:163–167, 1971.
- [38] Darbyshire B. and Henry R. J. The distribution of fructans in onions. *New Phytol.*, 81:29–34, 1978.
- [39] Shiomi N., Yamada J., and Izawa M. Isolation and identification of fructo-oligosaccharides in roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agr. Biol. Chem.*, 40:567–575, 1976.
- [40] Shiomi N., Yamada J., and Izawa M. A novel pentasaccharide in the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 43:1375–1377, 1979.
- [41] John J. A. St., Bonnett G. D., and Simpson R. J. A method for rapid quantification

- of sucrose and fructan oligosaccharides suitable for enzyme and physiological studies. *New Phytol.*, 134:197–203, 1996.
- [42] McCleary B. V., Murphy A., and Mugford D. C. Measurement of total fructan in food by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 83:356–364, 2000.
- [43] Chatteron N. J., Harrison P. A., Thornley W. R., et al. Separation and quantification of fructan (inulin) oligomers by anion exchange chromatography. In Fuchs A., editor, *Inulin and inulin-containing crops*, pages 93–100. Elsevier, 1993.
- [44] Franck A. Inulin. In Stephen A.M., Phillips G.O., and Williams P.A., editors, *Food Polysaccharides and their applications*, chapter 10, pages 335–352. CRC Taylor and Francis Group, 2006.
- [45] Corradini C., Cavazza A., and Bignardi C. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: principles and application. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, 2012.
- [46] López M. G. and Urías-Silvas J. E. *Agave* fructans as prebiotics. In Norio S., Noureddine B., and Shuichi O., editors, *Recent advances in fructooligosaccharides research*, pages 297–310. Research Signpost, 2007.
- [47] Bindels L. B., Delzenne N. M., Cani P. D., et al. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 12:303–310, 2015.
- [48] Gibson G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.*, 129:S1438–S1441, 1999.
- [49] Kolida S., Tuohy K., and Gibson G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.*, 87:S193–S197, 2002.
- [50] Wang X. and Gibson G. R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Microbiol.*, 75:373–380, 1993.
- [51] Gibson G. R. and Wang X. Enrichment of *bifidobacteria* from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 118:121–128, 1994.
- [52] Gibson G. R., Beatty E. R., Wang X., et al. Selective stimulation of *bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterol.*, 108:975–982, 1995.
- [53] Kruse H. P., Kleessen B., and Blaur M. Effects of inulin on faecal *bifidobacteria* in human subject. *Br. J. Nutr.*, 82:375–382, 1999.
- [54] Cani P. D., Lecourt E., Dewulf E. M., et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am. J. Clin. Nutr.*, 90:1236–1243, 2009.

- 
- [55] Delzenne N., Cani P. D., and Neyrinck A.M. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J. Nutr.*, 137:S2547–S2551, 2007.
- [56] Delzenne N., Cani P. D., Daubioul C., et al. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br. J. Nutr.*, 93:S157–S161, 2005.
- [57] Cani P. D., Dewever C., and Delzenne N. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br. J. Nutr.*, 92:521–526, 2004.
- [58] Delzenne N., Kok N. N., Fiordaliso M., et al. Dietary fructooligosaccharides modify lipid metabolism in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57:S820, 1993.
- [59] Fiordaliso M., Kok N., Desager J. P., et al. Dietary oligofructose lowers serum and VLDL concentrations of triglycerides, phospholipids and cholesterol in rats. *Lipids*, 30:163–167, 1995.
- [60] Kok N., Roberfroid M., Robert A., et al. Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br. J. Nutr.*, 76:881–890, 1996.
- [61] Delzenne N. and Kok N. N. Effect of non-digestible fermentable carbohydrates on hepatic fatty acid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, 26:228–230, 1998.
- [62] Delzenne N. and Kok N. N. Dietary fructooligosaccharides modify lipid metabolism in the rat. *J. Nutr.*, 129:S1467–S1469, 1999.
- [63] Delzenne N., Daubioul C., Neyrinck A., et al. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review biochemical events and future prospects. *Br. J. Nutr.*, 87:S257–S259, 2002.
- [64] Demigné C., Remesy C., and Morand C. Short chain fatty acids. In Gibson G. and Roberfroid M., editors, *Colonic microbiota, nutrition and health*, chapter 4, pages 55–70. Kluwer Academic Publishers, 1999.
- [65] Nishina P. and Freeland R. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated hepatocytes. *Hepatology*, 16:1350–1356, 1990.
- [66] Demigné C., Morand C., Levrat M. A., et al. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br. J. Nutr.*, 74:209–219, 1995.
- [67] Lin Y., Vonk R. J., and Sloof M. J. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *Br. J. Nutr.*, 74:197–207, 1995.
- [68] Bäckhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307:1915–1920, 2005.
- [69] David L. A., Maurice C. F., Carmody R. N., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505:559–563, 2014.

- 
- [70] Everard A., Lazarevic V., Gaia N., et al. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J.*, 8:2116–2130, 2014.
- [71] Everard A., Belzer C., Geurts L., et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110:9066–9071, 2013.
- [72] Everard A., Lazarevic V., Derrien M., et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*, 60:2775–2786, 2011.
- [73] B. Mao, D. Li, J. Zhao, et al. Metagenomic insight into the effects of fructo-oligosaccharides (FOS) on the composition of fecal microbiota in mice. *J. Agric. Food Chem.*, 63:856–863, 2015.
- [74] Hiergeist A., Gläsner J., Reischl U., et al. Analyses of intestinal microbiota: culture versus sequencing. *ILAR J.*, 56:228–240, 2015.
- [75] Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.*, 6:1621–1624, 2012.
- [76] Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 7:335–336, 2010.
- [77] Cummings J. H., Roberfroid M. B., Andersson H., et al. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51:417–423, 1997.
- [78] Topping D. L. and Clifton P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81:1031–1064, 2001.
- [79] Cummings J., Pomare E., Branch W., et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28:1221–1227, 1987.
- [80] Bernalier A., Dore J., and Durand M. Biochemistry of fermentation. In Glenn G. and Roberfroid M.B., editors, *Colonic microbiota, nutrition and health*, chapter 3, pages 37–53. Kluwer Academic Publishers, 1999.
- [81] Wong J. M., de Sousa R., Kendall C. W., et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.*, 40:235–243, 2006.
- [82] Cook S. I. and Sellin J. H. Short chain fatty acids in health and disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 12:499–507, 1998.
- [83] Macfarlane G. T. and Macfarlane S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:156–162, 2007.

- 
- [84] Brinkworth G.D., Noakes M., Clifton P.M., et al. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial population. *Br. J. Nutr.*, 101:1493–1502, 2009.
- [85] Peng X., Li S., Luo J., et al. Effects of dietary fibers and their mixtures on short chain fatty acids and microbiota in mice guts. *Food Funct.*, 4:932–938, 2013.
- [86] Schwierts A., Taras D., Schafer K., et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18:190–195, 2010.
- [87] Murphy E., Cotter P., Healy S., et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*, 59:1635–1642, 2010.
- [88] Byrne C. S., Chambers E. S., and Morrison D. J. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int. J. Obes.*, 39:1331–1338, 2015.
- [89] Cherrington C. A., Hinton M. G., Pearson R., et al. Short-chain organic acids at pH 50 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *J. Appl. Bacteriol.*, 70:161–165, 1991.
- [90] Duncan S. H., Louis P., Thomson J. M., et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.*, 11:2112–2122, 2009.
- [91] Macfarlane S. and Macfarlane G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.*, 62:67–72, 2003.
- [92] Puertollano E., Kolida S., and Yaqoob P. Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 17:139–144, 2014.
- [93] Macfarlane G. T. and Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J. AOAC Int.*, 95:50–60, 2012.
- [94] Ye E. Q., Chacko S. A., Chou E. L., et al. Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease and weight gain. *J. Nutr.*, 142:1304–1313, 2012.
- [95] Brown A. J., Goldsworthy S. M., Barnes A. A., et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.*, 278:25481–25489, 2003.
- [96] Li G., Su H., Zhou A., et al. Identification of the porcine G protein-coupled receptor 41 and 43 genes and their expression pattern in different tissues and development stages. *PLoS One*, 9:e97342, 2014.
- [97] Hong Y-H., Nishimura Y., Hishikawa D., et al. Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*, 146:5092–5099, 2005.

- 
- [98] Masui R., Sasaki M., Funaki Y., et al. G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm. Bowel Dis.*, 19:2848–2856, 2013.
- [99] Layden B. T., Angueira A. R., Brodsky M., et al. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl. Res.*, 161:131–140, 2013.
- [100] Le Poul E., Loison C., Struyf S., et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.*, 278:25481–25489, 2003.
- [101] Daubioul C., Rousseau N., Demeure R., et al. Dietary fructans, but not cellulose decreases triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker *fa/fa* rats. *J. Nutr.*, 132:967–973, 2002.
- [102] Wolever T., Spadafora P., and Eshuis H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:681–687, 1991.
- [103] Reshef L., Niv J., and Shapiro B. Effect of propionate on lipogenesis in adipose tissue. *J. Lipid Res.*, 8:682–687, 1967.
- [104] De Vriese C. and Delporte C. Influence of ghrelin on food intake and energy homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 10:615–619, 2007.
- [105] Cummings D. E. and Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest.*, 117:13–23, 2007.
- [106] Böttcher G., Sjölund K., Ekblad E., et al. Coexistence of peptide YY and glicentin immunoreactivity in endocrine cells of the gut. *Regul. Pept.*, 8:261–266, 1984.
- [107] Ku S., Lee H., and Lee J. An immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the C57BL/6 mice. *Anat. Histol. Embryol.*, 32:21–28, 2003.
- [108] Flint A., Raben A., Astrup A., et al. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J. Clin. Invest.*, 101:515–520, 1998.
- [109] Flint A., Raben A., Ersboll A., et al. The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 25:781–792, 2001.
- [110] Pittner R., moore C., Bhavsar S., et al. Effects of PYY 3-36; in rodent models of diabetes and obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 28:963–971, 2004.
- [111] Maffei M., Halaas J., Ravussin E., et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.*, 1:1155–1161, 1995.
- [112] Cani P. D., Hoste S., Guiot Y., et al. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br. J. Nutr.*, 98:32–37, 2007.
- [113] Verhoef S. P., Meyer D., and Westerterp K. R. Effects of oligofructose on appetite profile, glucagon-like peptide 1 and peptide YY 3-36 concentration and energy intake.

- Br. J. Nutr.*, 106:1757–1762, 2011.
- [114] Velázquez-Martínez J. R., González-Cervantes R. M., Hernández-Gallegos M. A., et al. Prebiotic potential of *Agave angustifolia* Haw. fructans with different degrees of polymerization. *Molecules*, 19:12660–12675, 2014.
- [115] Moreno-Vilet L., García-Hernández M. H., Delgado-Portales R. E., et al. *In vitro* assessment of *agave* fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *Int. J. Biol. Macromol.*, 63:181–187, 2014.
- [116] Gomez E., Tuohy K. M., Gibson G. R., et al. *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of *agave* fructans. *J. Appl. Microbiol.*, 108:2114–2121, 2010.
- [117] Urías-Silvas J. E., Cani P. D., Delmée E., et al. Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* gto. and *Dasyilirion* spp. *Br. J. Nutr.*, 99:254–261, 2008.
- [118] Santiago-García P. A. and López M. G. Agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice. *Food Funct.*, 5:3311–3319, 2014.
- [119] García-Curbelo Y., Bocourt R., Savón L. L., et al. Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model. *Food Funct.*, 6:3177–3182, 2015.
- [120] Huazano-García A. and López M. G. Metabolism of short chain fatty acids in the colon and faeces of mice after a supplementation of diet with *agave* fructans. In Valenzuela R., editor, *Lipid Metabolism*, chapter 8, pages 163–182. InTech, 2013.
- [121] Gibson G. R., Scott K. P., Rastall R. A., et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods*, 7:1–19, 2010.
- [122] Rendón-Huerta J. A., Juárez-Flores B., Pinos-Rodríguez J. M., et al. Effects of different sources of fructans on body weight, blood metabolites and fecal bacteria in normal and obese non-diabetic and diabetic rats. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 67:64–70, 2012.
- [123] Ramnani P., Costabile A., Bustillo A. G. R., et al. A randomised, double-blind, cross-over study investigating the prebiotic effect of *agave* fructans in healthy humans subjects. *J. Nutr. Sci.*, 4:e10, 2015.
- [124] Crittenden R. and Playne M. J. Modifying the human intestinal microbiota with prebiotics. In Ouwehand A.C. and Vaughan E.E., editors, *Gastrointestinal microbiology*, chapter 16, pages 285–314. Taylor and Francis Group, 2006.
- [125] Holscher H. D., Bauer L. L., Gourineni V., et al. *Agave* inulin supplementation affects the fecal microbiota of healthy adults participating in a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J. Nutr.*, 145:2025–2032, 2015.
- [126] Zhang-Sun W., Augusto L. A., Zhao L., et al. *Desulfovibrio desulfuricans* isolates from the gut of a single individual: structural and biological lipid A characterization.

- 
- FEBS Lett.*, 589:165–171, 2015.
- [127] Psichas A., Sleeth M. L., Murphy K. G., et al. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int. J. Obes.*, 39:424–429, 2015.
- [128] Tolhurst G., Heffron H., Lam Y. S., et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 61:364–371, 2012.
- [129] Lin H. V., Frassetto A., Kowalik E. J. Jr., et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acids receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*, 7:e35240, 2012.
- [130] Huazano-García A., García-Pérez M. C., García-Vieyra M., et al. *In vivo* prebiotic effect of branched fructans from *Agave angustifolia* (long DP) and *Dasyliirion* sp (short DP). *Ann. Nutr. Metab.*, 55:126, 2009.
- [131] Cani P. D., Knauf C., Iglesias M. A., et al. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*, 55:1484–1490, 2006.
- [132] Delmée E., Cani P. D., Gual G., et al. Relation between colonic proglucagon expression and metabolic response to oligofructose in high fat diet-fed mice. *Life Sci.*, 79:1007–1013, 2006.
- [133] Dewulf E. M., Cani P. D., Neyrinck A. M., et al. Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR-related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J. Nutr. Biochem.*, 22:712–722, 2011.
- [134] Cani P. D., Neyrinck A. M., Fava F., et al. Selective increases of *bifidobacteria* in gut microflora improve high-fat-diet induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50:2374–2383, 2007.
- [135] Cani P. D., Neyrinck A. M., Maton N., et al. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like peptide-1. *Obes. Res.*, 13:1000–1007, 2005.
- [136] Cani P. D., Possemiers S., Van de Wiele T., et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58:1091–1103, 2009.
- [137] Hostettmann K. and Marston A. Saponins. In Phillipson J.D., Ayres D.C., and Baxter H., editors, *Chemistry and pharmacology of natural products*. Cambridge University Press, 1995.
- [138] Bäckhed F., Ding H., Wang T., et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44:15718–15723, 2004.
- [139] Ley R. E., Bäckhed F., Turnbaugh P., et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:11070–11075, 2005.

- 
- [140] Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., et al. An obesity-associated gut microbiota with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444:1027–1031, 2006.
- [141] Zhang C., Zhang M., Pang X., et al. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J*, 6:1848–1857, 2012.
- [142] Turnbaugh P. J., Hamady M., Yatsunencko T., et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457:480–484, 2009.
- [143] Tarade K. M., Singhal R. S., Jayram R. V., et al. Kinetic of degradation of saponins in soybean flour (*Glycine max.*) during food processing. *J. Food Process. Eng.*, 76:440–445, 2006.
- [144] Michael-Cuello C., Ortiz-Cerda I., Moreno-Vilet L., et al. Study of enzymatic hydrolysis of fructans from *Agave salmiana* characterization and kinetic assessment. *ScientificWorldJournal*, 2012. DOI: 10.1100/2012/863432.
- [145] Legorreta E. and Ogura T. Method for processing *agave*, the composition obtained and uses therof. In *Patent publication number WO2002066517 A1*, 2002.
- [146] Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 7:248–254, 1976.
- [147] Noudeh G. D., Shariffar F., Khatib M., et al. Study of aqueous extract of three medicinal plants on cell membrane-permeabilizing and their surface properties. *Afr. J. Biotechnol.*, 9:110–116, 2009.
- [148] Kanaya K., Chiba S., and Shimomura T. Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.*, 42:1947–1948, 1978.
- [149] Anderson K., Li S. C., and Li Y. T. Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. *Anal. Biochem.*, 287:337–339, 2000.
- [150] Long R. T., Zeng W. S., Chen L. Y., et al. *Bifidobacterium* as an oral delivery carrier of oxyntomodulin for obesity therapy: inhibitory effects on food intake and body weight in overweight mice. *IJO*, 34:712–719, 2010.
- [151] Segata N., Izard J., Waldron L., et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.*, 12:R60, 2011.
- [152] Femia A. P., Luceri C., Dolara P., et al. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoximethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 23:1953–1960, 2002.
- [153] Gustav J. N. Recovery of saponin. In *Patent publication number US2301787 A*, 1942.
- [154] Asari M. and Hormozi F. Effects of surfactant on bubble size distribution and gas

- hold-up in a bubble column. *AICHE*, 1:50–58, 2013.
- [155] Kaczorek E., Chrzanowski L., Pijanowska A., et al. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: rhamnolipides and saponins. *Bioresour. Technol.*, 99:4285–4291, 2008.
- [156] Oleszed W. and Hamed A. Saponin-based surfactants. In Kjellin M. and Johansson I., editors, *Surfactants from renewable resources*, chapter 12, pages 239–250. John Wiley and Sons, 2010.
- [157] Roberfroid M. Inulin: a fructan. In Roberfroid M., editor, *Inulin-type fructans functional food ingredients*, chapter 3, pages 39–60. CRC Press, 2004.
- [158] Waleckx E., Gschaedler A., Colonna-Ceccaldi B., et al. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional elaboration process. *Food Chem.*, 108:40–48, 2008.
- [159] Chang C. J., Lin C. S., Lu C. C., et al. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat. Commun.*, 6:7489, 2015.
- [160] Hildebrandt M. A., Hoffmann C., Sherrill-Mix S. A., et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137:1716–1724, 2009.
- [161] Lee C. Y. The effect of high-fat diet-induced pathophysiological changes in the gut on obesity: what should be the ideal treatment? *Clin. Transl. Gastroenterol.*, 4:e39, 2013.
- [162] Ley R. E., Turnbaugh P. J., Klein S., et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444:1022–1023, 2006.
- [163] Hannelore D., Moghaddas A., Berry D., et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J.*, 8:295–308, 2014.
- [164] Turnbaugh P. J., Bäckhed F., Fulton L., et al. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 3:213–223, 2008.
- [165] Costello E. K., Stagaman K., Dethlefsen L., et al. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*, 336:1255–1262, 2012.
- [166] Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500:541–546, 2013.
- [167] Delzenne N., Neyrinck A. M., Bäckhed F., et al. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 7:639–646, 2011.
- [168] Neyrinck A. M., Possemiers S., Verstraete W., et al. Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* 23, 23:51–

- 59, 2012.
- [169] Ravussin Y, Koren O., Spor A., et al. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity*, 20:738–747, 2012.
- [170] Devkota S., Wang Y., Musch M. W., et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*<sup>-/-</sup> mice. *Nature*, 487:104–108, 2012.
- [171] David L. A., Maurec C. F., Carody R. N., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505:559–563, 2014.
- [172] Frost G., Sleeth M.L., Sahuri-Arisoylu M., et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat. Commun.*, 5:3611, 2014.
- [173] Gibson G. R. and Roberfroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125:1401–1412, 1995.
- [174] De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Goncalves D., et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 156:84–96, 2014.
- [175] Drucker D. J. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology*, 122:531–544, 2002.
- [176] Drucker D. J. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.*, 3:153–165, 2006.
- [177] Meier J. J. and Nauck M. A. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 21:91–117, 2005.
- [178] Cani P. D., Amar J., Iglesias M. A., et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56:1761–1772, 2007.
- [179] Roberfroid M. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.*, 104:S1–S63, 2010.
- [180] Huttenhower C., Gevers D., Knight R., et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486:207–214, 2012.
- [181] Stefk A. T., Feehley T., Tripathi P., et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111:13145–13150, 2014.
- [182] Du Toit A. *Clostridia* spp. combat food allergy in mice. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12:657, 2014.
- [183] Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:16731–16735, 2008.
- [184] Everard A., Lazarevic V., Derrien M., et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*, 60:2775–2786, 2011.

- [185] Liou A. P., Paziuk M., Luevano J. M., et al. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci. Transl. Med.*, 5:178ra41, 2013.
- [186] Tremaroli V., Karlsson F., Werling M., et al. Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributin to fat mass regulation. *Cell Metab.*, 22:228–238, 2015.
- [187] Zhang H., KiBaise J. K., Zuccolo A., et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106:2365–2370, 2009.
- [188] Cani P. D. and Delzenne N. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des.*, 15:1546–1558, 2009.

# Índice de figuras

1.1	Prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población mexicana . . . . .	4
1.2	Estructuras de los fructanos . . . . .	7
1.3	Estructuras de los principales fructanos sintetizados por plantas de <i>Agave</i> . . . . .	10
1.4	Contenido de fructanos y carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) en cinco especies de <i>Agave</i> creciendo en distintas regiones de México . . . . .	11
1.5	Contenido de carbohidratos y fructanos en plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul a lo largo de su ciclo biológico en campo . . . . .	12
1.6	Cambios en la microbiota de las heces de ratones alimentados por 3 semanas con una dieta estándar suplementada al 5 % con fructanos tipo inulina . . . . .	18
1.7	Diagrama simplificado de las principales rutas de fermentación de los fructanos en el colon . . . . .	22
1.8	Mecanismo propuesto por el cual los fructanos a través de los ácidos grasos de cadena corta inducen un efecto benéfico en la salud del individuo . . . . .	24
1.9	Hormonas gastrointestinales involucradas en la regulación del apetito . . . . .	25
1.10	Importancia del grado de polimerización del fructano sobre la modulación de las hormonas <i>GLP-1</i> y grelina, involucradas en la regulación del apetito . . . . .	26
1.11	Efectos sistémicos de los fructanos ramificados de <i>Agave tequilana</i> en ratones sanos . . . . .	28

1.12	Efectos sistémicos de los fructanos tipo inulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa . . . . .	33
1.13	Influencia del consumo de fructanos sobre los niveles de triglicéridos en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa . . . . .	34
1.14	Efecto de la ingesta de fructanos en la modulación de <i>GLP-1</i> y su impacto sobre la ingesta de alimento, peso corporal, niveles de insulina y glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa . . . . .	35
1.15	Influencia de la microbiota intestinal sobre la ingesta de alimento y el desarrollo de masa grasa . . . . .	36
1.16	Modificación de la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota del ciego de ratones obesos con respecto a ratones sanos . . . . .	37
1.17	Cambios en la microbiota del ciego de ratones alimentados por 8 semanas con una dieta alta en grasa suplementada con 10% de fructanos tipo inulina . . . . .	38
5.1	Esquema general de trabajo . . . . .	43
5.2	Proceso empleado para la obtención y purificación de los fructanos de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul . . . . .	44
5.3	Esquema del diseño experimental utilizado para realizar el estudio <i>in vivo</i> del efecto de los fructanos de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul en ratones con sobrepeso . . . . .	49
5.4	Inmunoensayos utilizando microesferas magnéticas ( <i>Bio-Plex</i> ) para la cuantificación de las hormonas grelina, <i>GLP-1</i> , insulina y leptina . . . . .	55
6.1	Análisis del contenido de proteínas en el jugo de <i>Agave</i> antes y después del proceso de purificación . . . . .	57
6.2	Análisis de saponinas en el jugo de <i>Agave</i> antes y después del proceso de purificación . . . . .	58
6.3	Análisis de la remoción de bacterias en el jugo de <i>Agave</i> antes y después del proceso de purificación . . . . .	59

6.4	Cromatografía en capa fina de los fructanos extraídos de plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de 4 años de edad . . . . .	61
6.5	Comparación del perfil cromatográfico de los fructanos de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul extraídos de plantas de 4 años de edad y fructanos tipo inulina de bajo grado de polimerización . . . . .	63
6.6	Efecto del consumo de una dieta alta en grasa sobre el peso corporal de los ratones . . . . .	64
6.7	Efecto de la ingesta de una dieta alta en grasa sobre la microbiota del ciego de ratones . . . . .	66
6.8	Cambios en la abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en la microbiota del ciego de los ratones debido al consumo de una dieta alta en grasa . . . . .	66
6.9	Variación en la abundancia relativa de las principales taxas (>1%) presentes en la microbiota del ciego de los ratones debido a la ingesta de una dieta alta en grasa por cinco semanas . . . . .	67
6.10	Modificación de la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota del ciego de los ratones debido al consumo de una dieta alta en grasa . . . . .	68
6.11	Análisis lineal discriminante mostrando los géneros de bacterias diferencialmente abundantes entre los ratones que fueron alimentados con la dieta estándar y los que recibieron la dieta alta en grasa por 5 semanas . . . . .	69
6.12	Ingesta de alimento de los ratones con sobrepeso alimentados con dieta estándar, suplementada con fructanos de <i>Agave</i> o inulina por 5 semanas . . . . .	71
6.13	Disminución del peso corporal de los ratones con sobrepeso debido al cambio de dieta y al suplemento con fructanos . . . . .	71
6.14	Efecto del cambio de dieta y el suplemento de fructanos sobre la microbiota del ciego de ratones con sobrepeso . . . . .	74

---

6.15	Cambios en la abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso debido al cambio de dieta y el suplemento con fructanos . . . . .	75
6.16	Variación en la abundancia relativa de las principales taxas (>1%) debido al cambio de dieta y al suplemento con fructanos . . . . .	76
6.17	Cambio en la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota del ciego de los ratones con sobrepeso debido al cambio de dieta y al suplemento con fructanos . . . . .	77
6.18	Análisis lineal discriminante mostrando los géneros de bacterias diferencialmente abundantes entre los ratones con sobrepeso después del cambio de dieta y el suplemento con fructanos . . . . .	78
6.19	pH y niveles de los <i>SCFA</i> en el contenido del ciego de los ratones con sobrepeso después del cambio de dieta y el suplemento con fructanos	81
6.20	pH y niveles de los <i>SCFA</i> en el contenido colónico de los ratones con sobrepeso después del cambio de dieta y el suplemento con fructanos	83
6.21	Efecto del cambio de dieta y el suplemento de fructanos sobre la concentración de las hormonas involucradas con la regulación del apetito	86
6.22	Análisis de componentes principales de todos los parámetros investigados en los ratones con sobrepeso alimentados con la dieta estándar y el suplemento con fructanos . . . . .	89

# Índice de tablas

1.1	Fuentes naturales de fructanos y contenido . . . . .	8
1.2	Agrupación de las especies de <i>Agave</i> en función a la relación agavinas/graminanos y su grado de polimerización promedio . . . . .	11
1.3	Variación del grado de polimerización y proporción de agavinas/graminanos en plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul de 2-7 años de edad . .	13
1.4	Principales grupos de bacterias sacarolíticas presentes en el colon del individuo y sus productos de fermentación . . . . .	23
1.5	Efecto del consumo de una dieta suplementada al 10 % con fructanos de <i>Agave</i> sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de ratones sanos . . . . .	28
1.6	Efecto del consumo de una dieta suplementada al 10 % con fructanos de <i>Agave angustifolia</i> y <i>potatorum</i> de bajo grado de polimerización sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y lipoproteínas de baja ( <i>LDL</i> ) y alta ( <i>HDL</i> ) densidad en sangre de ratones sanos . . . . .	29
5.1	Sistema de elución empleado para el análisis de fructanos de <i>Agave</i> mediante <i>HPAEC-PAD</i> . . . . .	48
6.1	Efecto de la ingesta de una dieta alta en grasa por cinco semanas sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de los ratones . . . . .	65
6.2	Efecto de la ingesta de una dieta alta en grasa sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta y pH del contenido del ciego de los ratones . . . . .	70

6.3 Efecto del cambio de dieta y el suplemento de fructanos sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre de ratones con sobrepeso . . . . . 73

## *Lista de abreviaturas*

<b>1-SST</b>	Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa
<b>1-FFT</b>	Fructano:fructano 1-fructosiltransferasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CAM</b>	Metabolismo ácido de las crasuláceas
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>CICUAL</b>	Comité institucional de cuidado y uso de animales de experimentación
<b>DP</b>	Grado de polimerización
<b>DPPIV</b>	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>FFAs</b>	Receptores de ácidos grasos libres
<b>FOS</b>	Fructooligosacáridos
<b>GC-FID</b>	Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagón 1
<b>GPRs</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HF</b>	Dieta alta en grasa
<b>HF-ST</b>	Grupo de ratones con sobrepeso que se cambio a la dieta estándar
<b>HF-ST+A</b>	Grupo de ratones con sobrepeso que se cambio a la dieta estándar suplementada con fructanos de <i>Agave</i>
<b>HF-ST+O</b>	Grupo de ratones con sobrepeso que se cambio a la dieta estándar suplementada con inulina
<b>HPAEC-PAD</b>	Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso amperométrico
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LEfSe</b>	Análisis lineal discriminante por efecto de tamaño
<b>OTU</b>	Unidad taxonómica operacional
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>OXM</b>	Oxintomodulina
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PCoA</b>	Análisis de coordenadas principales

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>QIIME</b>	Análisis cuantitativo de la ecología microbiana en una muestra
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>PAHBAH</b>	Hidrazida del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
<b>PYY</b>	Péptido YY
<b>SCFA</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>ST</b>	Dieta estándar
<b>UAM</b>	Universidad Metropolitana de México

## *Producción y logros científicos*

### *Artículos*

**Huazano-García A.** and López M.G. 2015. Agavins reverse the metabolic disorders in overweight mice through the increment of short chain fatty acids and hormones. *Food Funct.* 6 (12) 3720-3727. DOI: 10.1039/C5FO00830A.

**Huazano-García A.**, Shin H., Dominguez-Bello M.G. and López M.G. Effects of agavins on body weight and cecal microbiota composition in overweight mice. *So-metido a: Scientific Reports from Nature group* (en proceso).

### *Artículos de divulgación*

**Huazano-García A.** y López M.G. 2015. Las agavinas: una gran esperanza para abatir el sobrepeso en México. *Tecno Agave* (revista de la cadena del agave y sus derivados) No. 38 Año V, pp. 44-46.

**Huazano-García A.** y López M.G. 2015. ¿Cómo es que las agavinas generan efectos benéficos en la salud?. *Tecno Agave* (revista de la cadena del agave y sus derivados) No. 36 Año V, pp. 32-33.

*Capítulos en libros*

López M.G., **Huazano-García A.**, García-Pérez M.C., García-Vieyra M.I. 2014. *Agave* fiber structure complexity and their impact on health. In Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition, ed. N. Benkeblia, 45-74. CRC Press.

**Huazano-García A.** and López M.G. 2013. Metabolism of short chain fatty acids in the colon and faeces of mice after a supplementation of diets with agave fructans. In Lipid Metabolism, ed. R. Valenzuela, 163-182. Rijeka: InTech.

*Participación en congresos*

**Huazano-García A.**, Shin H., Dominguez-Bello M.G. and López M.G. Effect of agavins intake on mouse body weight loss and cecal microbiota. American Society for Microbiology, 115th General Meeting, USA, May 2015.

**Huazano-García A.**, García-Pérez M.C., García-Vieyra M.I., López-Pérez M.G. Efecto prebiótico *in vivo* de la inulina de *Agave angustifolia* Haw. en ratones. XIX Foro Norte De Investigación en Salud. Guanajuato, Gto. Mayo del 2013.

**Huazano-García A.** and López M.G. Enzymatic hydrolysis from *Agave angustifolia* branched fructans for the production of fructooligosaccharides. 7th International Fructan Symposium, France, July 2012.

López M.G. and **Huazano-García A.** *Agave* inulin an innovative ingredient in nutrition and their relation with the health trends in Mexico and the world. IFT-ALACCTA Food Science & Innovation Conference, México, February 2012.

***Estancia de investigación***

Department of Medicine, School of medicine of New York University, bajo la asesoría de la Dra. María Gloria Domínguez-Bello. Nueva York, EUA; Septiembre - Diciembre 2014.



Cite this: *Food Funct.*, 2015, 6, 3720

## Agavins reverse the metabolic disorders in overweight mice through the increment of short chain fatty acids and hormones†

Alicia Huazano-García and Mercedes G. López\*

In this study, the effects of agavins (branched fructans) along with a diet shift on metabolic parameters, short chain fatty acid (SCFA) production and gastrointestinal hormones in overweight mice were established. Male C57BL/6 mice were fed with a standard (ST) or high fat (HF) diet over the course of 5 weeks, with the objective to induce overweightness in the animals, followed by a diet shift (HF\_ST) and a diet shift with agavins (HF\_ST + A) or inulin (HF\_ST + O) for 5 additional weeks. After the first 5 weeks, the HF group showed a 30% body weight gain and an increase in glucose, triglyceride and cholesterol concentrations of 9%, 79% and 38% respectively when compared to the ST group ( $P < 0.05$ ). Only the overweight mice that received agavins or inulin in their diets reversed the metabolic disorders induced by consumption of the HF diet, reaching the values very close to those of the ST group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the consumption of agavins or inulin led to higher SCFA concentrations in the gut and modulated hormones such as GLP-1 and leptin involved in food intake regulation ( $P < 0.05$ ). These findings demonstrate that a change of diet and fructan consumption such as agavins is a good alternative to increase weight loss and to improve the metabolic disorders associated with being overweight.

Received 8th July 2015,  
Accepted 16th August 2015  
DOI: 10.1039/c5fo00830a  
www.rsc.org/foodfunction

### Introduction

The growing prevalence of overweightness and obesity is a worldwide public health problem because these conditions promote serious metabolic disorders (glucose intolerance, insulin resistance and high levels of triglycerides and cholesterol) that induce the development of type II diabetes, hypertension, dyslipidemia, cardiovascular disease and some cancers.<sup>1,2</sup> Changes in the dietary habits of overweight individuals or the use of prebiotics in their daily diet such as fructans may regulate lipid and glucose metabolism through the modulation of the intestinal microbiota and gastrointestinal hormones involved in appetite regulation, this might become a way to prevent and manage the risk of metabolic diseases.<sup>3–7</sup>

Fructans are fermented in the gut, changing the microbiota activity and its composition, promoting short chain fatty acid (SCFA) production (acetate, propionate and butyrate) and consequently reducing the luminal pH. SCFA have been established as essential nutrients that act as signaling molecules to influence the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) hormone, involved in satiety and glucose homeostasis. The ingestion of

fructans has shown an increment of the L cell number in the mice proximal colon as well as the expression of proglucagon gene in those cells, leading to the secretion of different peptides, including GLP-1 that plays a relevant role in the host gut function and physiology.<sup>8</sup>

Cani *et al.*<sup>9</sup> compared the effect of the degree of polymerization (DP) of three fructans derived from chicory on GLP-1 synthesis and showed that the most important increment was observed with short DP fructans that were fermented mainly in the cecum and in the proximal gut.

Besides inulin from chicory, another important source of fructans is found in Agave plants endemic of Mexico. Agave fructans are branched carbohydrates containing  $\beta(2-1)$  and  $\beta(2-6)$  linkages that have been classified as graminans and agavins (fructan neoserics) according to the presence of an external and internal glucose unit.<sup>10</sup> It is known that the complex agavin structures change with the plant age; younger plants (2 to 4 year old) have mainly short DP, while older plants (5 to 7 year old) contain principally large DP and higher complexity.<sup>11</sup> Regarding the role of agavins on metabolic parameters, our research group has demonstrated that agavins obtained from *Agave tequilana*, *A. angustifolia* and *A. potatorum* with a high proportion of short DP can modulate glucose and lipid metabolism as well as GLP-1 secretion on healthy mice.<sup>12,13</sup>

Up to now, this is the first report that assesses the potential of agavins from 4 years old *Agave tequilana* plants containing a high proportion of short DP fructans. In this study, agavins

Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, Mexico. E-mail: mlopez@ira.cinvestav.mx;

Fax: +(462) 624-5996; Tel: +(462) 623-9644

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5fo00830a

were given to overweight mice to counteract the metabolic disorders induced by a HF diet, to measure SCFA changes along the gut as well as the modulation of gastrointestinal hormones. We also compared the effects of agavins to those of inulin.

## Materials and methods

### Animals and diets

Thirty-two male C57BL/6 mice (12 weeks old at the beginning of the experiment obtained from the Universidad Autonoma Metropolitana, Mexico) were individually housed in a temperature and humidity controlled room with 12 h light–dark cycles. The mice were randomized to one of the two experimental diets: a standard group (ST;  $n = 8$ ) was fed with a standard diet (5053a; Lab Diet, USA) and a high fat group (HF;  $n = 24$ ) was fed with a high fat diet (58Y1; Test Diet, USA) for a 5 weeks period. At the end of this period, the HF group was divided into three new groups ( $n = 8$  per group) and shifted to a standard diet (HF\_ST) for 5 additional weeks. Two of these new groups received either agavins from *Agave tequilana* (HF\_ST + A) or inulin from *Cichorium intybus* (HF\_ST + O) added in water<sup>14–16</sup> at a concentration of 0.38 g by mouse per day. The standard diet contained 62.4% calories from carbohydrates (starch), 24.5% from proteins and 13.1% from fat. The high fat diet had 20.3% calories from carbohydrates (16.15% maltodextrin, 8.85% sucrose, and 6.46% powdered cellulose), 18.1% from proteins and 61.6% from fat. Food and water were provided *ad libitum* throughout the experiment. All experiments were conducted according to the Guidelines of the Institutional Care and Use of Laboratory Animals Committee from Cinvestav-Mexico and according to the Mexican Norm NOM-062-ZOO-1999.

### Fructans

Four-year-old *A. tequilana* Weber Blue variety plants were collected from Amatitan region, Jalisco, Mexico. The Agave plants' age corresponded to their time in the field, starting from the "hijuelo" (plant shoot) plantation, and this material was kindly donated by Casa Cuervo S. A. de C. V. Agavins were extracted and purified in our laboratory. Firstly, the juice from the Agave plants was obtained using a commercial extractor. The pH value of the juice was adjusted to 7 using  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . The Agave juice was then heated at 80–85 °C for 30 min in a water bath with continuous agitation to inactivate the hydrolytic enzymes and saponins, 1% of diatomaceous earth and activated charcoal were added to remove the suspended organic impurities and coloring matter. The juice was filtered under vacuum using a nylon membrane with a pore diameter of 0.20  $\mu\text{m}$  and finally lyophilized. Agavins presented an average degree of polymerization (DP) of 8<sup>11</sup> (Fig. S1†). Linear fructans from chicory (Oligofructose; Orafiti) were obtained from Megafarma® (Mexico) with an average DP of 5.

### Body weight, food intake and plasma collection

The body weight was measured weekly throughout the experiment, however the food intake was measured daily. The mean

daily energy intake ( $\text{kJ d}^{-1}$ ) was obtained by multiplying the food intake (g) by the energy value of the diet ( $\text{kJ g}^{-1}$ ). The energy value for the ST diet was 14.28  $\text{kJ g}^{-1}$ , for the HF diet was 21.35  $\text{kJ g}^{-1}$  and for the agavins or inulin was 13.88  $\text{kJ g}^{-1}$ . Blood samples after 5 and 10 weeks were taken in the postprandial state from the mice tails in order to measure glucose, triglycerides and cholesterol. Blood glucose concentrations were measured immediately using a blood glucose meter (SD Check Gold, Mexico). Blood for triglyceride and cholesterol analysis was collected in heparin tubes (0.2 ml per ml of blood) and centrifuged at 1600g for 15 min. Plasma was stored at  $-80$  °C until analysis, which was carried out using kits coupling enzymatic reaction (BioVision, USA). After the trial period (10 weeks) mice in the postprandial state were anaesthetized by intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital solution (60 mg per kg body weight). Blood for satiety hormone analysis was collected from the portal vein in heparin tubes containing a dipeptidyl peptidase IV inhibitor (0.01 ml per ml of blood; Millipore, USA) and centrifuged at 1600g for 15 min at 4 °C. Plasma was stored at  $-80$  °C until analysis.

### Plasma analysis for satiety hormones

GLP-1 (active), ghrelin (active), insulin and leptin concentrations were quantified using a Mouse Diabetes Standard Bio-Plex kit (Bio-Plex Pro Assay, Bio-Rad, USA) and a Luminex instrument according to the manufacturer's specifications. The sensitivity for the Bio-Plex kit (in  $\text{pg ml}^{-1}$ ) is 0.8 for GLP-1, 0.8 for ghrelin, 22 for insulin and 6.2 for leptin.

### Determination of pH and SCFA

At death, proximal, medial and distal colon segments were immediately excised. The colonic contents of each section were placed in iced vials and snap frozen at  $-80$  °C. Colonic pH measurements were made using a microelectrode (PHR-146, Lazar Research Laboratories Inc., USA). SCFA analyses were carried out following the protocol of Femia *et al.*<sup>17</sup> with some modifications, gas chromatography and flame ionization detection from Hewlett Packard (HP4890D) were used. Briefly, 0.05 g of the colon content was weighed and 0.3 ml of water was added. The solution was acidified with 0.05 ml of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and SCFA were extracted by shaking with 0.6 ml of diethylether and subsequently centrifuged at 10 000g for 30 s. One microliter of the organic phase was injected directly onto a capillary column Nukol™ (30 m  $\times$  0.32 mm; Supelco, USA) at 80 °C, using  $\text{N}_2$  as the carrier gas; detection temperature was set at 230 °C. Calibration curves of acetic, propionic and butyric acids were used to carry out SCFA quantification in the samples.

### Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  SEM. Differences between ST and HF groups were assessed by Student's *t*-test. Differences between the diets were determined using a one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad

Software, USA). Principal component analysis (PCA) was conducted using a language and environment for statistical computing R version 3.0.3 (<http://www.R-project.org/>) and the *ade4* package.

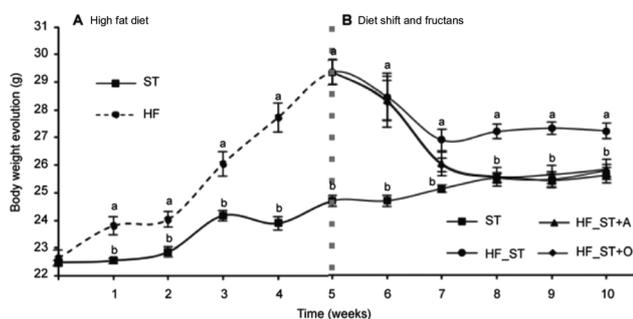
## Results

### Body weight and energy intake

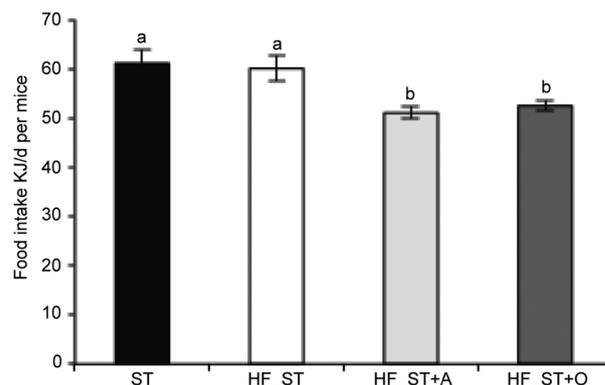
Initially, mice consumed a ST or HF diet for 5 weeks, and mice that received the HF diet steadily gained weight, leading to a 30% weight gain with respect to the ST group (Fig. 1A and S2†). After 5 weeks on the HF diet, the overweight mice<sup>18</sup> were shifted to a ST diet (HF\_ST) or ST diet with either agavins (HF\_ST + A) or inulin (HF\_ST + O) addition for 5 more weeks. Only the animals that were shifted to a ST diet and that received agavins or inulin in their water showed a significant decrement in body weight ( $P < 0.05$ ) by about 9%, surprisingly reaching values very close to those of healthy mice which were fed the ST diet throughout the experiment (Fig. 1B and S2†). However, mice that did not receive fructans but changed their diet (HF\_ST) showed only a 4% body weight decrement ( $P = 0.32$ ). The energy intake was significantly lower ( $P < 0.05$ ) for mice that received the HF\_ST + A and HF\_ST + O diets compared to mice in the HF\_ST and ST groups (Fig. 2).

### Blood glucose, triglycerides and cholesterol

Mice fed for 5 weeks with the HF diet, showed metabolic disorders related to glucose, triglycerides and cholesterol alterations. The HF group had significantly ( $P < 0.05$ ) higher glucose (7.43 mM  $\pm$  0.07), triglyceride (0.95 mM  $\pm$  0.08) and cholesterol (2.44 mM  $\pm$  0.14) concentrations than the ST group (6.80 mM  $\pm$  0.05), (0.53 mM  $\pm$  0.02) and (1.77 mM  $\pm$  0.17) respectively. However, the overweight mice that were shifted to the ST diet and that drank water with agavins or inulin were able to counteract the metabolic disorders induced by the HF diet consumption (Table 1). The HF\_ST + A and HF\_ST + O groups showed significantly lower glucose, triglyceride and cholesterol



**Fig. 1** Body weight evolution. (A) Mice fed with a standard (ST) or high fat (HF) diet for 5 weeks. (B) Diet shift of the overweight mice to a standard diet (HF\_ST) and agavins (HF\_ST + A) or inulin (HF\_ST + O) addition for 5 more weeks. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2** Food intake of overweight mice fed with a standard diet (HF\_ST), agavins or inulin added standard diets (HF\_ST + A and HF\_ST + O respectively) for 5 weeks. ST group is healthy mice fed with a standard diet. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). For more details of diets and procedures, see Materials and methods.

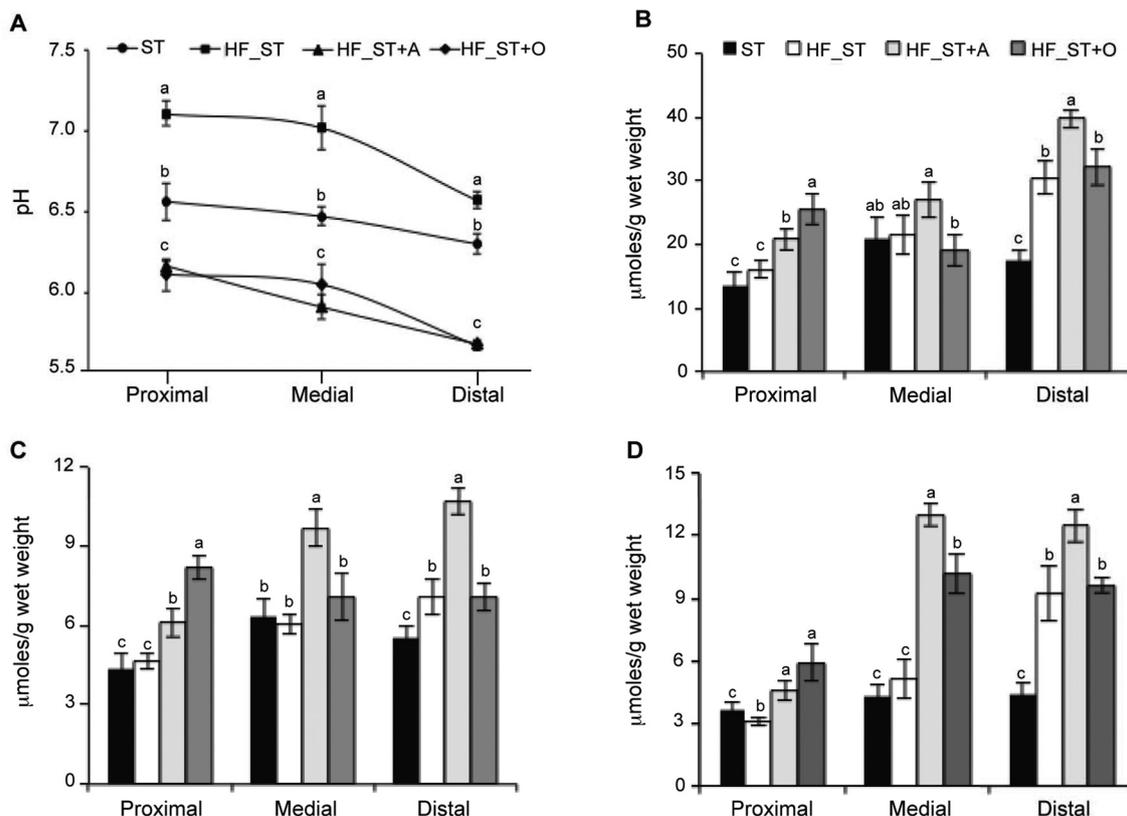
**Table 1** Effects on blood levels of glucose, triglycerides and cholesterol of overweight mice fed with a standard diet (HF\_ST), agavins or inulin added standard diets (HF\_ST + A and HF\_ST + O respectively) for 5 weeks; ST groups are healthy mice fed with a standard diet. Values are mean  $\pm$  SEM. Treatments with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). For more details of diets and procedures, see Materials and methods

Group	Glucose (mM)		Triglycerides (mM)		Cholesterol (mM)	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
ST	6.42 <sup>b</sup>	0.08	0.55 <sup>b</sup>	0.01	1.67 <sup>b</sup>	0.18
HF_ST	7.36 <sup>a</sup>	0.11	0.82 <sup>a</sup>	0.05	2.37 <sup>a</sup>	0.20
HF_ST + A	6.40 <sup>b</sup>	0.27	0.61 <sup>b</sup>	0.02	1.89 <sup>b</sup>	0.14
HF_ST + O	6.44 <sup>b</sup>	0.18	0.49 <sup>c</sup>	0.03	1.82 <sup>b</sup>	0.12

concentrations ( $P < 0.05$ ) in relation to the HF\_ST group. Interestingly, after 10 weeks, no significant differences were found in glucose, triglyceride and cholesterol concentrations between mice that consumed prebiotics (agavins or inulin) and the mice fed with a ST diet during the whole experiment (10 weeks). On the other hand, the HF\_ST group (overweight mice that received a shift to the ST diet) was not able to counteract the metabolic disorders induced by consumption of the HF diet.

### pH and SCFA in the mice gut

Mice that drank water with agavins or inulin presented a significant pH decrement in the proximal, medial and distal gut ( $P < 0.05$ ) compared to HF\_ST and ST groups (Fig. 3A). In contrast, overweight mice that were shifted to the ST diet had a significant pH increment in the three intestine sections ( $P < 0.05$ ). Interestingly, only mice that consumed agavins or inulin showed an increment in SCFA concentrations along the gut with respect to HF\_ST and ST groups. Agavins were fermented



**Fig. 3** pH and SCFA concentrations in the gut content of overweight mice fed with a standard diet (HF\_ST), agavins or inulin added standard diets (HF\_ST + A and HF\_ST + O respectively) for 5 weeks. The ST group is healthy mice fed with a standard diet. (A) pH drop, (B) acetic acid, (C) propionic acid and (D) butyric acid concentrations in each of the large intestine sections. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). For more details of diets and procedures, see Materials and methods.

mostly in the medial and distal colon compared to inulin that was fermented mainly in the proximal gut (Fig. 3B, C and D). Acetic acid was the most abundant in the colon of all mice independently of the group, followed by propionic and butyric acids. There was a significant increase in acetic acid in the proximal gut of mice that drank fructans ( $P < 0.05$ ) compared to the HF\_ST and ST groups; however, in the medial gut, there were no significant differences in acetic acid between groups; whereas in the distal colon, the mice fed with the ST diet throughout 10 weeks showed a significantly lower acetic acid concentration ( $P < 0.05$ ) compared to HF\_ST + A, HF\_ST + O and HF\_ST groups (Fig. 3B). The amount of propionic acid was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the proximal gut of HF\_ST + A and HF\_ST + O groups compared to HF\_ST and ST groups; however, only the HF\_ST + A group had a significant increase of propionic acid ( $P < 0.05$ ) in the medial gut (about 37%) and in the distal intestine (approximately 51%) compared to HF\_ST + O, HF\_ST and ST groups (Fig. 3C). Moreover, the mice that received agavins or inulin showed a significantly higher concentration of butyric acid in the proximal gut ( $P < 0.05$ ) compared to the HF\_ST group; finally, only the HF\_ST + A group presented a significantly higher butyric acid concentration in the medial and distal segments of the intes-

tine ( $P < 0.05$ ) in relation to HF\_ST + O, HF\_ST and ST groups (Fig. 3D).

#### Satiety hormone response

Portal plasma GLP-1 concentrations were significantly higher in mice that drank water added with agavins or inulin ( $P < 0.05$ ) with respect to HF\_ST and ST groups (Fig. 4A); however, only overweight mice that received inulin (HF\_ST + O) had a significantly lower ghrelin concentration ( $P < 0.05$ ) compared to HF\_ST + A, HF\_ST and ST groups (Fig. 4B). On the other hand, insulin concentrations were higher in mice that consumed either agavins or inulin ( $P < 0.05$ ) compared to HF\_ST and ST groups (Fig. 4C); finally, leptin levels were significantly lower in mice that received agavins or inulin ( $P < 0.05$ ) in relation to the HF\_ST group; interestingly, HF\_ST + A and HF\_ST + O groups had very similar leptin concentrations than that in the ST group (Fig. 4D).

#### Principal component analysis (PCA)

A PCA of all variables considered or measured in this study (body weight, glucose, triglycerides, cholesterol, SCFAs, pH and hormones) is shown in Fig. 5A. The first and second principal components (PCs) were responsible for 64% of the total

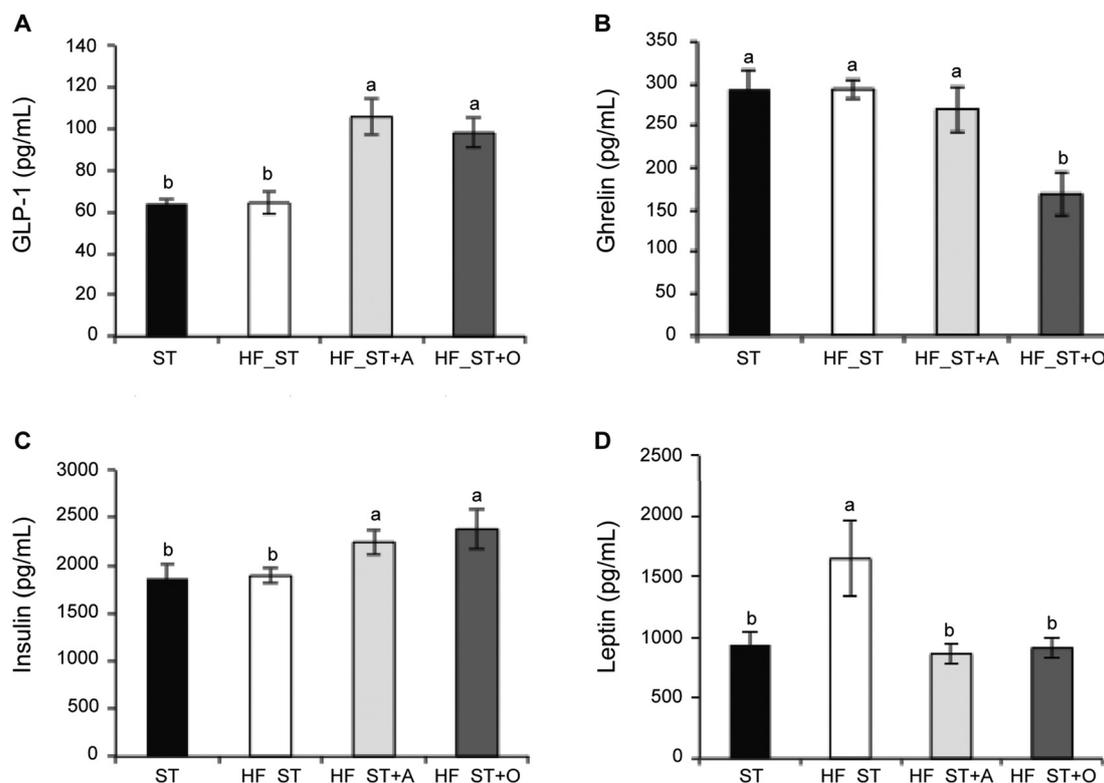


Fig. 4 Concentration of portal GLP-1 (A), ghrelin (B), insulin (C) and leptin (D) in overweight mice fed with a standard diet (HF\_ST), agavins or inulin supplemented standard diets (HF\_ST + A and HF\_ST + O respectively) for 5 weeks. ST group is healthy mice fed with a standard diet. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). For more details of diets and procedures, see Materials and methods.

variance. PC1 shows a clear separation of ST and HF\_ST groups but an overlap was observed for HF\_ST + A and HF\_ST + O groups. PC1 (42%) was controlled mainly by the butyric acid concentration in the medial intestine, propionic acid in the proximal gut and portal GLP-1 levels, whereas PC2 (22%) was controlled by triglyceride, glucose and cholesterol concentrations in the mice blood (Fig. 5B).

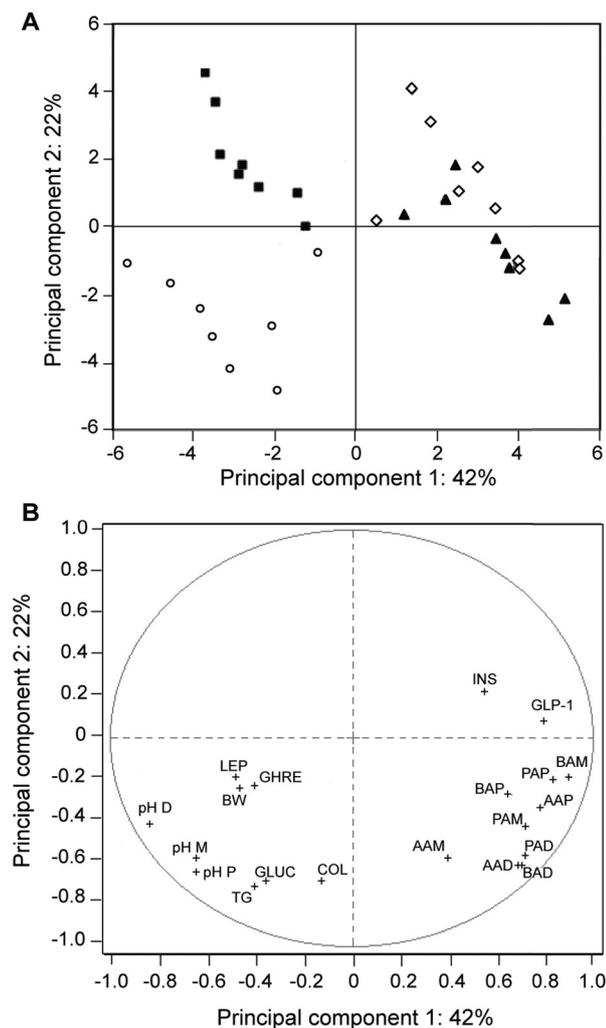
## Discussion

In this study we evaluated the effect of HF diet consumption for 5 weeks followed by a shift to a ST diet along with addition of fructans for 5 more weeks. As expected, mice on the HF diet showed a 30% increase in the body weight as well as a rise in glucose (9%), triglyceride (79%) and cholesterol (38%) concentrations in the blood (features often associated with the metabolic syndrome) compared to mice that were fed with a ST diet. The results obtained on mice fed with the HF diet might be associated with a change in the gut microbiota of the animals as previously reported.<sup>14,19,20</sup> Moreover, it is known that a gut microbiota change as a result of a HF diet consumption is a key factor for obesity development, insulin resistance and other metabolic syndrome hallmarks.<sup>21,22</sup>

Fructans are fermented in the large intestine where acetate, propionate and butyrate acids are generally produced. A clear difference in the fermentation between short DP agavins and inulin was observed (Fig. 3). Agavins with  $DP_{avg} = 8$  were slowly fermented in the proximal gut, then, a significant increment in the medial and distal guts was observed, probably due to their intrinsic structural complexity.<sup>10,11,23</sup> On the other hand, inulin (linear fructans) with  $DP_{avg} = 5$  were mainly fermented in the proximal gut as reported by Cani *et al.*<sup>9</sup>

A pH drop in the three gut sections of both mice groups that consumed fructans was observed due to an increase in total SCFA compared to HF\_ST and ST groups (Fig. 3). The pH drop might change the gut microbiota composition and promote the growth of probiotic bacteria, preventing the overgrowth of pathogenic bacteria sensitive to pH as previously reported.<sup>24,25</sup> In contrast, the overweight mice that only received a shift to the ST diet but no fructans showed significantly higher pH values in the three gut sections. Therefore, the sole change of diet was not sufficient to reverse the gut microbiota alterations (dysbiosis) induced by consumption of the HF diet,<sup>26</sup> whereas the diet shift and fructan supplementation favorably changed the intestinal microbiota and improved the overweight mice health.<sup>14</sup>

In this work, it was observed that only HF\_ST + A and HF\_ST + O groups reverted the metabolic disorders induced by



**Fig. 5** PCA. (A) Scores plot of all parameters investigated in this study in overweight mice fed with a standard diet (○), standard diet added with agavins (▲) or inulin (◇) for 5 weeks. The ST group (■) is healthy mice fed with a standard diet. (B) Loadings plot of the two first PCs. BW, Body Weight; GLU, Glucose; TG, triglycerides; COL, cholesterol; AAP, AAM and AAD, acetic acid concentration in the proximal, medial and distal gut respectively; PAP, PAM and PAD, propionic acid concentration in the proximal, medial and distal gut respectively; BAP, BAM and BAD, butyric acid concentration in the proximal, medial and distal gut respectively; pH P, pH M and pH D, pH values in the proximal, medial and distal gut respectively; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GHRE, ghrelin; INS, insulin; LEP, leptin.

the HF diet (Table 1). In other words, fructans selectively modulated the gut microbiota along the large intestine through SCFA (acetate, propionate and butyrate) production.<sup>27</sup>

Acetate and propionate are delivered to the liver *via* the portal vein where the rise in the ratio of propionate to acetate may potentially decrease lipogenesis.<sup>7</sup> In addition, propionic acid has been reported to inhibit fatty acid synthesis *in vitro* and has a positive influence on host metabolism by regulation of intestinal gluconeogenesis.<sup>28</sup> Then, the significant increment observed in propionic acid only in the gut content of

overweight mice that received the agavins and inulin (Fig. 3C) can be associated with the decrement in triglycerides and cholesterol, and these values were similar to those observed in healthy mice (ST group) (Table 1). Moreover, the HF\_ST group showed higher triglyceride and cholesterol concentrations, demonstrating or proving that a simple diet change is not enough to improve the overweight mice metabolic disorders.

On the other hand, butyrate is largely utilized in the colon by the L cells, these cells are responsible for releasing GLP-1 (potent insulinotropic hormone) which inhibits food intake (leading to reduce gain weight), lowers blood glucose, decreases glucagon secretion and enhances insulin secretion by pancreas  $\beta$ -cell.<sup>29–31</sup> Butyric acid increased significantly in the gut content of mice that consumed either fructans type. However, the HF\_ST + A group showed a higher butyric acid concentration in the medial and distal gut *versus* the HF\_ST + O group that presented a higher concentration of this acid in the proximal gut, and this behavior might be due to the prebiotic structural differences. Besides, both mice groups that consumed fructans showed a significant increment in GLP-1 levels in the portal vein when compared to HF\_ST and ST groups (Fig. 4A). The GLP-1 increment in HF\_ST + A and HF\_ST + O might be related to the low food intake, low body weight gain, glucose levels (Table 1) and the significantly higher insulin concentration in the portal vein (Fig. 4C).

Ghrelin is another hormone involved in food intake regulation, and in the HF\_ST + O group this hormone was inversely correlated to the GLP-1 in the portal vein.<sup>9,32,33</sup> Short DP linear fructans are fermented preferentially in the proximal colon and butyric acid is known to be responsible for the GLP-1 increment; these are the key events in the GLP-1 increment in the portal vein and consequently, a decrement in peripheral ghrelin.<sup>9</sup> The HF\_ST + A group presented a higher GLP-1 concentration (66%) and lower ghrelin (8%) but the HF\_ST + O group had a GLP-1 increment of 53% and ghrelin reduction of 43% when compared to HF\_ST and ST groups (Fig. 4B). The slight reduction of ghrelin concentration in the HF\_ST + A group might be due to the complex agavins structure, that induced fermentation principally in the medial and distal intestine compared to inulin.

A HF diet consumption has been associated with leptin resistance and since leptin is primarily involved in food intake and energy homeostasis, it is also linked to the regulation of glucose homeostasis and numerous gastrointestinal functions.<sup>34</sup> Interestingly, HF\_ST + A and HF\_ST + O groups showed a decrease in leptin concentration and moreover, these values were similar to those observed for the ST group (Fig. 4D). The reduction of leptin levels in mice that received either agavins or inulin might also be related to the lowered food intake and body weight observed in the animals.

The PCA plot confirmed that there was a remarkable difference between the overweight mice that consumed agavins or inulin and the other two mice groups (Fig. 5A). Despite the large structural differences and fermentation sites favored by HF\_ST + A or HF\_ST + O groups in the gut, the observed systemic effects by both fructans were similar. The PCA loading

indicate that the fructan consumption influenced the SCFA concentration and hormone (GLP-1 and insulin) secretion. Interestingly, the body weight, ghrelin and leptin were closely associated with the HF\_ST group (Fig. 5B). Finally, the PCA plot suggests that the SCFA increment, GLP-1 and insulin levels, as well as ghrelin and leptin decrement could be the most important parameters affected by HF\_ST + A and HF\_ST + O showing an overall decrease of the metabolic disorders (glucose, triglycerides, cholesterol and body weight) as shown in Table 1 and Fig. 1, 3 and 4.

## Conclusions

Agavins from *Agave tequilana* reverted the metabolic disorders induced by consumption of a HF diet, showing in general, similar systemic effects to inulin, despite the great structural differences between fructans. Agavins reduced food intake, body weight, glucose, triglycerides and cholesterol in overweight mice, and these effects were associated with the higher SCFA (propionic and butyric acid) levels in the gut content and hormones such as GLP-1, leptin and insulin in the portal vein. On the other hand, overweight mice that were only shifted to the ST diet showed a body weight loss, however, the metabolic alterations observed in these animals due to 5 weeks on the HF diet were not reverted. Therefore, a diet change along with a prebiotic consumption of such agavins present a huge potential to improve the metabolic disorders associated with being overweight.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

The authors deeply appreciate Casa Cuervo S. A. de C. V. for the *Agave* plants kind donation. AHG thanks CONACYT for her doctoral scholarship.

## References

- 1 S. Rössner, Obesity: the disease of the twenty-first century, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2002, **26**(suppl. 4), S2–S4.
- 2 D. Yach, D. Stuckler and K. D. Brownell, Epidemiologic and economic consequences of the global epidemic of obesity and diabetes, *Nat. Med.*, 2006, **12**, 62–66.
- 3 N. M. Delzenne, A. M. Neyrinck and P. D. Cani, Gut microbiota and metabolic disorders: how prebiotic can work?, *Br. J. Nutr.*, 2013, **109**(suppl. 2), S81–S85.
- 4 P. D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, *et al.*, Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, *Diabetes*, 2008, **57**, 1470–1481.
- 5 P. D. Cani, C. Knauf, M. A. Iglesias, *et al.*, Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor, *Diabetes*, 2006, **55**, 1484–1490.
- 6 E. Delmée, P. D. Cani, G. Gual, *et al.*, Relation between colonic proglucagon expression and metabolic response to oligofructose in high fat diet-fed mice, *Life Sci.*, 2006, **79**, 1007–1013.
- 7 C. Daubioul, N. Rousseau, R. Demeure, *et al.*, Dietary fructans, but not cellulose, decreases triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker *fafa* rats, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 967–973.
- 8 O. B. Chaudhri, V. Salem, K. G. Murphy, *et al.*, Gastrointestinal satiety signals, *Annu. Rev. Physiol.*, 2008, **70**, 239–255.
- 9 P. D. Cani, C. Dewever and N. M. Delzenne, Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats, *Br. J. Nutr.*, 2004, **92**, 521–526.
- 10 N. A. Mancilla-Margalli and M. G. López, Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasylium* species, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 7832–7839.
- 11 E. Mellado-Mojica and M. G. López, Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 11704–11713.
- 12 J. E. Urías-Silvas, P. D. Cani, E. Delmée, *et al.*, Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasylium* spp., *Br. J. Nutr.*, 2008, **99**, 254–261.
- 13 P. A. Santiago-García and M. G. López, Agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice, *Food Funct.*, 2014, **5**, 3311–3319.
- 14 A. Everard, V. Lazarevic, N. Gaña, *et al.*, Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity, *ISME J.*, 2014, **8**, 1–15.
- 15 A. Everard, C. Belzer, L. Geurts, *et al.*, Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**, 9066–9071.
- 16 A. Everard, V. Lazarevic, M. Derrien, *et al.*, Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice, *Diabetes*, 2011, **60**, 2775–2786.
- 17 A. P. Femia, C. Luceri, P. Dolara, *et al.*, Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoximethane-induced colon carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, 2002, **23**, 1953–1960.
- 18 R. T. Long, W. S. Zeng, L. Y. Chen, *et al.*, *Bifidobacterium* as an oral delivery carrier of oxyntomodulin for obesity therapy: inhibitory effects on food intake and body weight in overweight mice, *IJO*, 2010, **34**, 712–719.
- 19 F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, *et al.*, The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **44**, 15718–15723.

- 20 C. Y. Lee, The effect of high-fat diet-induced pathophysiological changes in the gut on obesity: what should be the ideal treatment?, *Clin. Transl. Gastroenterol.*, 2013, **4**, e39.
- 21 R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, *et al.*, Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity, *Nature*, 2006, **444**, 1022–1023.
- 22 P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, *et al.*, An obesity-associated gut microbiota with increased capacity for energy harvest, *Nature*, 2006, **444**, 1027–1031.
- 23 M. G. López, N. A. Mancilla-Margalli and G. Mendoza-Diaz, Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 7835–7840.
- 24 C. A. Cherrington, M. Hinton, G. R. Pearson, *et al.*, Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation, *J. Appl. Bacteriol.*, 1991, **70**, 161–165.
- 25 S. H. Duncan, P. Louis, J. M. Thomson, *et al.*, The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota, *Environ. Microbiol.*, 2009, **11**, 2112–2122.
- 26 D. Hannelore, A. Moghaddas, D. Berry, *et al.*, High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice, *ISME J.*, 2014, **8**, 295–308.
- 27 G. R. Gibson and M. B. Roberfroid, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *J. Nutr.*, 1995, **125**, 1401–1412.
- 28 F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, D. Goncalves, *et al.*, Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits, *Cell*, 2014, **156**, 84–96.
- 29 D. J. Drucker, Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides, *Gastroenterology*, 2002, **122**, 531–544.
- 30 D. J. Drucker, The biology of incretin hormones, *Cell Metab.*, 2006, **3**, 153–165.
- 31 J. J. Meier and M. A. Nauck, Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2005, **21**, 91–117.
- 32 P. D. Cani, A. M. Neyrinck, N. Maton, *et al.*, Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like peptide-1, *Obes. Res.*, 2005, **13**, 1000–1007.
- 33 P. D. Cani and N. M. Delzenne, The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease, *Curr. Pharm. Des.*, 2009, **15**, 1546–1558.
- 34 Y. Ravussin, O. Koren, A. Spor, *et al.*, Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice, *Obesity*, 2012, **20**, 738–747.