

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Caracterización de la funcionalidad de la microbiota del colon de individuos mexicanos con obesidad por análisis metabólico en modelo de fermentómetro”

Tesis que presenta

IBT. DANIELA RAMÍREZ SÁNCHEZ

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis

D. en C. Jaime García Mena

Ciudad de México

Agosto 2016

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. en C. Jaime García Mena en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.



Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con los reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio y a la Ing. Linda Zuleyma Quijano por su apoyo administrativo.

Se agradece al Dr. en C. Selvasankar Murugesan por su apoyo en la realización del trabajo experimental y al M. en C. Otonial Maya Lucas por el apoyo en el análisis bioinformático.

Para la realización de este trabajo se recibió apoyo del Cinvestav, CONACyT 163235 INFR-2011-01 y FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361. IBT. Daniela Ramírez Sánchez recibió la beca de Maestría CONACyT394921.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento al CINVESTAV por el apoyo otorgado durante el desarrollo de este proyecto.

Un agradecimiento a todas las personas involucradas en la realización de este proyecto:

Al director de este trabajo, Dr. Jaime García Mena por la supervisión, orientación y apoyo incondicional durante este tiempo.

A mi comité tutorial, Dr. Bulmaro Cisneros, Departamento de Genética y Biología Molecular, y el Dr. Carlos Hoyo Vadillo, Departamento de Farmacología, por la disponibilidad y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Selvasankar Murugesan y el Maestro Khemlal Nirmalkar, personal del Laboratorio de Referencia y Apoyo Para la Caracterización de Genomas Transcriptomas y Microbiomas, por su conocimiento, paciencia, amistad y sobre todo apoyo.

Al personal administrativo del Departamento de Genética y Biología Molecular, en especial a Gabriela Mora Macías por su destacada labor como secretaria de la coordinación académica.

A todos los donadores de muestra que hicieron posible éste proyecto.

Al laboratorio Avanzado de Microscopía Electrónica del LaNSE CINVESTAV, en especial a la Q.F.B. Sirenia González Posos por su enseñanza y conocimiento.

A mis padres y hermana por todo su amor, sus consejos y apoyo incondicional. Gracias por ser mi sustento más grande, los amo.

RESUMEN

La obesidad es reconocida actualmente como un problema de salud pública en el mundo, dada su magnitud, la rapidez de su incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que lo padece. Además del aumento significativo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles, la mortalidad prematura, y el costo social de la salud. México ocupa el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad en la población adulta (30%), más de 26 millones con sobrepeso y 22 millones con obesidad, lo que representa un reto muy importante para el sector salud. México debe planear e implementar estrategias y líneas de acción costo-efectivas, dirigidas a la prevención y el control de la obesidad. Estudios recientes han asociado a la microbiota como otro de los factores relacionado en el desarrollo de la patología. Por tal motivo tiene relevancia el estudio de la relación microbiota-obesidad, para continuar aportando conocimiento de otro factor que puede tener una implicación. El objetivo de este proyecto fue investigar si la microbiota de individuos con obesidad tenía mayor capacidad fermentativa que la de individuos en normopeso. De tal manera se desarrolló el modelo fermentómetro para caracterizar y analizar de una manera rápida la capacidad metabólica y las comunidades microbianas presentes. Encontrando que si bien cuatro horas no son suficiente para observar un cambio significativo en la producción de AGCC entre los dos grupos de estudio, sí es útil para ejemplificar cuales bacterias se están seleccionando a partir del sustrato, inulina, suministrado. El phylum Firmicutes se observó en mayor abundancia para el grupo normopeso, mientras que el phylum Bacteroidetes presento mayor abundancia en el grupo de obesidad. También se observó que la producción de ácido butírico a través del tiempo fue constante y mayor para el grupo normopeso, el cual presentó mayor porcentaje de abundancia del phylum Firmicutes, los cuales son los principales productores del ácido butírico, el cual a su vez se ha relacionado en generar un estado saludable en el colon, por sus beneficios antiinflamatorios.

Finalmente los AGCC que se analizaron de las mismas muestras, pero sin procesarlas en el fermentómetro, se les observó una diferencia significativa en la producción de ácido acético para el grupo de obesidad en comparación con el grupo normopeso.

Palabras clave: Obesidad, microbiota intestinal, fermentación, inulina.

ABSTRACT

Nowadays obesity is recognized as one of the most important challenges of public health in the world, given its size, speed of growth, and the negative effect on the population who suffers it. Likewise obesity increases significantly the risk of chronic non-communicable diseases and premature mortality, as well as the social cost of health. Today, Mexico has the second global prevalence of obesity in the adult population (30 %), around 26 million, overweight, and 22 million, obese. This implies a major challenge for the health sector. Mexico needs to plan and implement strategies and cost-effective actions for the prevention and control of obesity.

Recent studies have associated the Microbiota as another factor related with the pathology. For this reason is relevant to study the relation microbiota-obesity in order to improve the knowledge of this other factor implicated.

The aim of this project was to research if the microbiota of obese people had a major fermentative capacity than the one of normal weight. For this reason the fermentometer model was developed to characterize and analyze easily the metabolic capacity and the microbial communities present. Finding that four hours are not enough to observe a significant change in the production of the SCFA, between the two groups, but it works to evidence which are the selected bacteria with the specific substrate, inulin, used.

The Firmicutes phylum had a higher abundance for the normal weight group, while the Bacteroidetes phylum had a higher abundance in the obese group. Butyric acid production was higher and constant through time in the normal weight group, in which the abundance of Firmicutes was higher. Firmicutes are the principal producers of the butyric acid which is related in providing a healthy state in the colon because of its anti-inflammatory benefits.

Finally the SCFA analyzed in the same samples, but not processed in the fermentometer, showed a significant difference in the acetic acid production for the obese group compared with the normal weight one.

Key words: Obesity, intestinal microbiota, fermentation, inulin.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Generalidades de obesidad	1
I.2 Microbiota y Obesidad	3
I.3 Disbiosis microbiana intestinal	4
I.4 Tracto gastrointestinal	5
I.4 Metabolitos producidos en el colon	9
I.5 Fermentación oscura	10
I.6 Caracterización de la comunidad microbiana	11
I.7 Secuenciación masiva de una genoteca de 16S rDNA	11
II. ANTECEDENTES	12
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVO GENERAL	16
V.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS	16
VI. ALCANCE	17
VII. METODOLOGÍA	18
VII.1 Plan de trabajo	18
VII.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	18
VII.2.1 ACTIVIDADES	18
VII.2.2 Prueba de aseguramiento de la calidad del consorcio extraído	21
VII.2.3 Estandarización de protocolo para el modelo de fermentómetro	21
VII.2.3.1 Obtención del consorcio bacteriano fecal (CBF) a partir de una muestra de copro	22
VII.2.3.2 Cálculo de absorbancia y unidades formadoras de colonia	23
VII.2.3.3 Preparación de inóculo (CBF) para el fermentómetro	23
VII.2.3.4 Fermentómetro	23
VII.2.3.5 Medición del cambio de pH del fermentómetro en diferentes condiciones	24
VII.2.3.6 Preparación de genotecas de muestras extraídas de estandarización de fermentómetro para secuenciación	27
VII.2.3.7 Fraccionamiento electroforético para ácidos nucleicos y productos de amplificación por PCR.	31
VII. 2.3.8 Análisis de resultados de secuenciación de estandarización	35
VII.2.3.9 Índices de alfa diversidad contra tiempo	37
VII.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido	39

VIII. RESULTADOS	43
VIII.1 Muestras procesadas en fermentómetro	43
VIII.2 Gráficos de abundancia relativa de la secuenciación masiva	44
VIII.3 Índices de diversidad	47
VIII.4 Análisis de la capacidad fermentativa por medio de la técnica de HPLC	51
IX. DISCUSIÓN	54
X. CONCLUSIONES	57
XI. PERSPECTIVAS	58
XII. BIBLIOGRAFÍA	59
XIII. APÉNDICES	61
APÉNDICE A. Instructivo para toma de muestra	61
APÉNDICE B. Consentimiento Informado	63
APÉNDICE C. Tabla de Barcodes para secuenciación masiva semiconductora de iones	66
APÉNDICE D. Protocolos	67
APÉNDICE E. Geles de extracción de ácidos nucleicos	70
APÉNDICE F. Geles analíticos de PCR	72

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Generalidades de obesidad

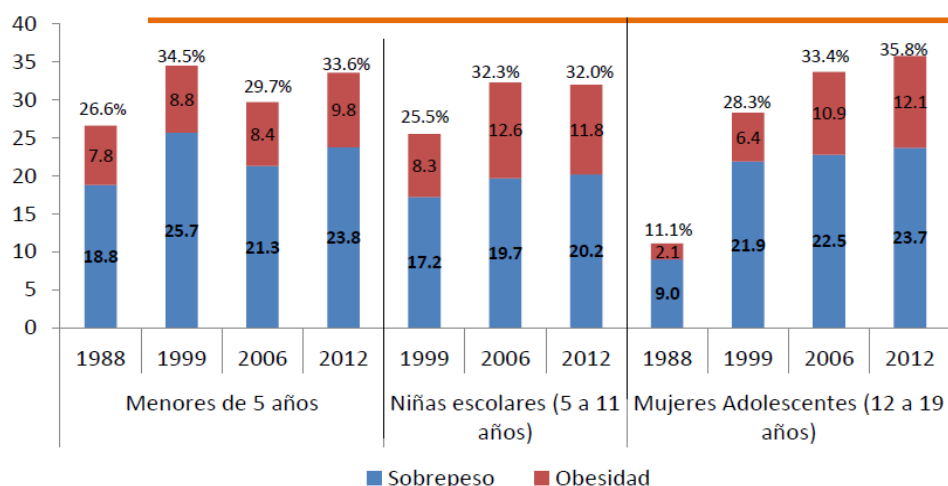
En la actualidad, México y Estados Unidos, ocupan los primeros lugares de prevalencia mundial de obesidad en la población adulta (30%), la cual es diez veces mayor que la de países como Japón y Corea (4%)(Barrera-cruz, *et al.*, 2013). Esta prevalencia ha ido en aumento, especialmente en los países con ingresos bajos y medios. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012), se encontró que alrededor de 30 % de la población mayor de 20 años (mujeres, 34.5 %, hombres, 24.2%) tiene obesidad. En la actualidad, más del 70 % de la población adulta (mujeres, 71.9%; hombres, 66.7 %), entre los 30 y los 60 años, tiene exceso de peso(Barrera-cruz *et al.*, 2013). La prevalencia de sobrepeso es más alta en hombres (42.5 %) que en mujeres (36.8 %), mientras que la prevalencia de obesidad es mayor en las mujeres (38.6 %) que en los hombres (32.5 %) como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad por grupo de edad

Grupo de edad	Sobrepeso (%)	Obesidad (%)
Niños menores de cinco años	12	5.2
Niños de cinco a nueve años	16.2	12.1
Adolescentes	26.5	11.9
Mujeres	36.8	38.6
Hombres	42.5	32.5

IMSS,SIAS, Octubre de 2012

En 2013, más de 42 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso (OMS, 2015). Mientras que en México el 33.6% de los niños menores a 5 años fueron reportados con obesidad y sobrepeso, y el 30% de niños entre 5 a 11 años presentan sobrepeso u obesidad. (ENSANUT, 2012), lo cual se puede observar mejor en la gráfica 1. Dichas cifras demuestran que la obesidad y sobrepeso se han convertido un problema de salud pública en nuestro país.



Gráfica 1. Prevalencia de riesgo de sobrepeso y obesidad en niños mexicanos. ENSANUT 2012.

La NORMA Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998, para el manejo integral de la obesidad, define a la obesidad incluyendo al sobrepeso como un estado pre-mórbido; la cual es una enfermedad crónica caracterizada por el almacenamiento en exceso de tejido adiposo en el organismo, acompañada de alteraciones metabólicas, que predisponen a la presentación de trastornos que deterioran el estado de salud, asociada en la mayoría de los casos a patología endócrina, cardiovascular, ortopédica y relacionada a factores biológicos, socioculturales y psicológicos. Para diagnosticar a un individuo con obesidad se hace uso del índice de masa corporal (IMC), el cual como su nombre lo define, es una medida de asociación entre la masa y la talla de un individuo y se obtiene dividiendo el peso de una persona en kilogramos entre el cuadrado de la talla en metros como se muestra en la unidades siguientes kg/m^2 . Una persona con un IMC igual o superior a 30 es considerada obesa y una con un IMC entre 25 y 29.9 es considerada con sobrepeso. (OMS, 2015). Sin embargo para los niños se deben usar los percentiles los cuales sirven para ser más específicos en conocer el estado de un menor, por lo que de acuerdo a la CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades), un niño con sobrepeso es aquel que está por arriba del percentil 90, mientras que un niño en normopeso se

encuentra dentro de un rango de 90 a 10 percentil y un niño con desnutrición tiene un percentil de 10 hacia abajo.

La obesidad por su etiología es una enfermedad metabólica multifactorial y su tratamiento debe ser apoyado en un grupo multidisciplinario. Dada su magnitud y trascendencia es considerada en México como un problema de salud pública, por lo tanto el establecimiento de lineamientos para su atención integral, podrá incidir de manera positiva en un adecuado manejo y desarrollo de estudios del importante número de pacientes que cursan con esta enfermedad. (NORMA Oficial Mexicana, 1998). Los factores de riesgo de la obesidad infantil incluyen la dieta, antecedentes de obesidad en padres, y disminución de la actividad física (Estrada-Velasco *et al.*, 2015).

El papel de la dieta en la etiología de la mayoría de las enfermedades no transmisibles está bien establecido. Los patrones de alimentación varían considerablemente entre las poblaciones, los individuos, grupos de edad y las clases sociales y culturales (Estrada-Velasco *et al.*, 2015).

I.2 Microbiota y Obesidad

La microbiota se define como el conjunto de microorganismos incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoarios que residen fuera y dentro de nuestro cuerpo, además varía dependiendo del hábitat que se quiera estudiar en el cuerpo humano.

Mientras que el microbioma se ha definido como “una comunidad ecológica formada por microorganismos comensales, simbióticos y patógenos”, que comparten el espacio del cuerpo humano. Ambos términos se pueden distinguir en que el microbioma incluye los genomas colectivos de estos microorganismos y cuya expresión tiene influencia en la funcionalidad sistémica del mismo (Jones *et al.*, 2014).

La microbiota humana consiste en alrededor de 10 a 100 billones de microorganismos, representando al menos 10 veces más el número de células humanas. La microbiota y su microbioma nos proveen de importantes funciones biológicas, inmunológicas y metabólicas que no pueden ser realizadas por el metabolismo humano como síntesis de aminoácidos esenciales, vitaminas y la digestión de componentes de la dieta como polisacáridos estructurales (Jones *et al.*, 2014).

I.3 Disbiosis microbiana intestinal

La disbiosis intestinal es un desequilibrio de la microbiota intestinal, de su actividad metabólica y de su distribución a lo largo del intestino. Además también se ha definido como cambios cuantitativos y cualitativos en la microbiota intestinal, los cuales producen un estado en el cual la microbiota produce efectos dañinos (Hawrelaket Myers, 2004). Lo cual se cree que es por una inestabilidad entre las especies de bacterias protectoras y las bacterias que dañan el intestino. Este desequilibrio puede tener su origen por diversas causas como los trastornos dietéticos (alto consumo de proteínas de origen animal, grasas, azúcares simples, etc.), estrés, fármacos, entre otros. Un funcionamiento inadecuado del sistema entero-hepático (intestino-hígado) da lugar a que las sustancias nocivas del intestino pasen a la sangre y que se acumulen en el cuerpo (Tamboli *et al.*, 2004).

El uso de pro-bióticos como terapia se ha usado para tratar diferentes enfermedades relacionadas al intestino como la enfermedad inflamatoria intestinal, mediante la alteración en la composición bacteriana, el estatus inmunológico y la inflamación. Además varios datos han asociado a las bacterias intestinales en el inicio y amplificación de las etapas de las enfermedades inflamatorias intestinales. Como un ejemplo se encuentra la enfermedad de Crohn, en la cual NOD2/CARD15 es un gen susceptible al reconocimiento fuerte de los peptidoglicanos de la bacteria, los cuales son el ligamiento entre la bacteria entérica y la inflamación de la mucosa (Tamboli *et al.*, 2004). Sin embargo a pesar de estos avances, el

papel preciso de las bacterias intestinales permanece sin elucidarse. Teorías mutuamente no excluyentes establecen que podría deberse: a un patógeno indefinido persistente, a una anormal barrera mucosa permeable llevando a una translocación excesiva de la bacteria, a un sistema inmune anormal en la activación de células o a una regulación de las células deficiente en respuesta a las bacterias del intestino (Tamboli *et al.*, 2004).(Szmulowicz, 2011).

I.4 Tracto gastrointestinal

El tracto digestivo es el órgano inmunológico más grande del adulto, midiendo aproximadamente 6.5 m, existiendo en él aproximadamente 100 billones de bacterias, y el reconocimiento de microorganismos que éste órgano hace entre comensales y patógenas es notorio (Belkaid & Hand, 2014). La comunicación entre las bacterias y las células de la pared del tracto digestivo que da lugar a este reconocimiento, se da a través de la interacción de componentes estructurales y metabolitos bacterianos, con receptores especializados (Murugesan *et al.*, 2015).

El tracto gastrointestinal digiere los alimentos para extraer energía y nutrientes y expulsar los residuos que quedan. Las principales funciones del tracto gastrointestinal son la ingestión, la digestión, la absorción y la excreción. El tracto intestinal inferior comprende el intestino y el ano. El intestino delgado, tiene tres partes: duodeno, yeyuno, íleon. Mientras que el Intestino grueso está compuesto por: ciego (el apéndice vermiforme está pegado al ciego), colon (colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide), recto, y ano (Murugesan *et al.*, 2015).

Embriología

El intestino es una estructura derivada del endodermo. Aproximadamente a los 16 días del desarrollo humano, el embrión comienza a plegarse ventralmente, en dos direcciones: los lados del embrión se doblan uno hacia el otro y la cabeza y la cola se pliegan hacia cada uno de ellos. El resultado es una pieza del saco vitelino, una

estructura revestida de endodermo en contacto con la cara ventral del embrión, comienza a ser pellizado para convertirse en el intestino primitivo.

Durante la vida fetal, el intestino primitivo puede ser dividido en tres segmentos: intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. Cada segmento del intestino primitivo da origen a una porción específica del intestino y estructuras relacionadas con el intestino en el adulto. Los componentes derivados del intestino propiamente, incluyendo el estómago y el colon, se desarrollan como dilataciones del intestino primitivo. Por el contrario, los derivados relacionados con el intestino, aquellas estructuras que derivan del intestino primitivo pero que no son parte del intestino propiamente, en general se desarrollan como brotes del intestino primitivo. Los vasos sanguíneos que irrigan estas estructuras permanecen constantes durante el desarrollo (Bruce M, 2004).

En el intestino anterior desde la faringe hasta la parte superior del duodeno da origen a: la faringe, esófago, estómago, duodeno superior, tracto respiratorio (incluyendo los pulmones), hígado, vesícula biliar y páncreas, con irrigación de las ramas de la arteria celíaca.

En el Intestino medio en la parte inferior del duodeno hasta la primera parte del colon transversal, da origen al duodeno inferior, yeyuno, íleo, ciego, apéndice, colon ascendente y primera parte del colon transversal, irrigado por las ramas de la serie mesentérica superior, como se puede observar en la figura 1. En el Intestino posterior da origen a la segunda mitad del colon transversal hasta la parte superior del canal anal, segunda mitad del colon transversal, colon descendente, recto y parte superior del canal anal, irrigado por las ramas de la arteria mesentérica inferior (Bruce M, 2004).

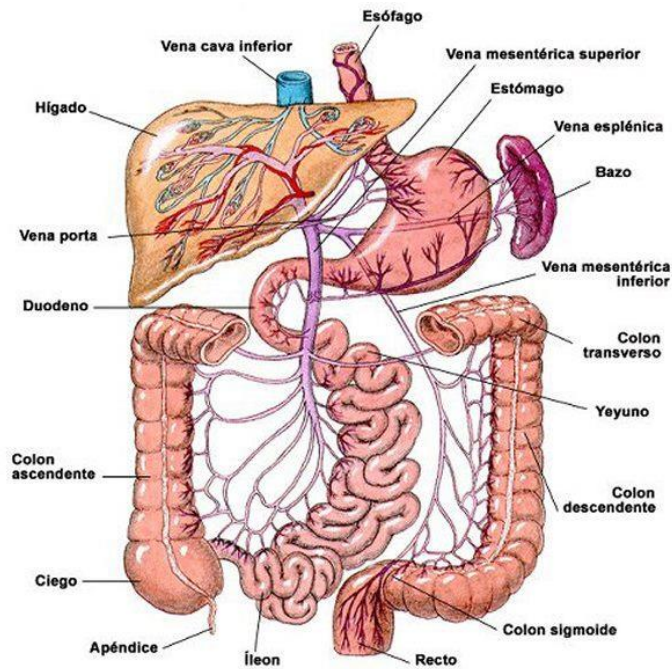


Fig.1. Tracto gastrointestinal

Fisiología: Especialización de órganos

- El primer órgano es la lengua, la cual está solamente presente en el phylum Chordata.
- El segundo órgano es el esófago.
- El tercer órgano es el estómago.
- El cuarto órgano es el colon o intestino grueso. Un brote del intestino grueso llamado el ciego.

Función inmune

El tracto gastrointestinal, es también una parte importante del sistema inmune. El pH bajo del estómago (entre 1-4) es fatal para muchos microorganismo que entran al estómago. Igualmente, el mucus (conteniendo IgA), neutraliza muchos de estos microorganismos. Otros factores en el tracto intestinal que ayudan con la función inmune incluyen enzimas en la saliva y la bilis. Enzimas tales como Cyp3A4, junto con la actividad anti-porte, son también instrumentos en el rol del intestino de detoxificación de antígenos y xenobióticos, tales como drogas, involucrados en el primer paso metabólico (Coicoet al., 2003).

Bacterias intestinales que mejoran la salud, sirven para prevenir la sobre-expresión de bacterias potencialmente dañinas en el intestino. Los microorganismos son también neutralizados por un extenso sistema inmune que comprende el tejido linfoide asociado con el intestino (Coicoet *al.*, 2003).

Fisiología del colon

El colon humano es la parte del tracto digestivo más densamente colonizado, manteniendo una amplia diversidad de consorcios de microorganismos específicos como huéspedes, que representan aproximadamente el 2% de la masa total del cuerpo. (Zihler Berner *et al.*, 2013). Además en el colon viven alrededor de 10^{11} – 10^{12} bacterias por gramo de contenido perteneciendo a un estimado de 1800 géneros y 15000-36000 especies diferentes, revelado por estudios meta-genómicos (Belkaid *et Hand*, 2014).

Esta comunidad microbiana contribuye decisivamente a las características morfológicas, inmunológicas y funciones nutrimentales del tracto digestivo y puede estar asociado con varias enfermedades, actuando directamente en la salud humana (Estrada-Velasco *et al.*, 2015). Por estas razones existe un considerable interés en explorar las funciones enzimáticas y metabólicas de las colonias microbianas que están directamente ligadas a la estructura de comunidades comensales y están a su vez altamente influenciadas por varios factores exógenos, por ejemplo: la dieta, los medicamentos y las enfermedades crónicas.

Por otro lado el colon humano es un órgano dinámico, involucrado en múltiples funciones, incluyendo la absorción de agua y electrolitos, acumulación de nutrientes no absorbidos, y transportación de las heces. A pesar de no ser considerado un órgano esencial, juega un papel clave en el mantenimiento de la salud general del cuerpo humano. Con una mejor comprensión de estas propiedades fisiología, se podrán generar tratamientos exitosos en las diferentes enfermedades asociadas al colon (Szmulowicz, 2011).

Para entender un poco más del complejo funcionamiento del colon y lo que él deriva, el desarrollo de un sistema biológico, que involucre parte in vitro, modelos in vivo con parte molecular y tecnología “ómica” puede ser lo más funcional. Por tal motivo el uso de un modelo de fermentómetro, secuenciación y el sustento de estudios antes mencionados, serán la base de este proyecto.

I.4 Metabolitos producidos en el colon

Si bien la digestión y la absorción tienen lugar principalmente en el estómago y en el intestino delgado, el colon también juega un papel en estos procesos. El colon procesa varios carbohidratos complejos y en menor cantidad proteínas que promueven resistencia para la digestión y absorción en el intestino más próximo (Zihler Berner *et al.*, 2013).

A diferencia del intestino delgado, el colon recicla nutrientes de estos carbohidratos y proteínas a través de la fermentación. La fermentación ocurre por los miembros sacarolíticos y proteolíticos de las más de 400 especies de bacterias, los cuales en su mayoría son anaerobios obligados presentes con el colon (Zihler Berner *et al.*, 2013).

Aproximadamente 10% de la ingesta de carbohidratos entra al ciego como material no digerido. Entre la diversidad de productos finales de la fermentación de bacterias de los carbohidratos complejos, principalmente de los residuos solubles de plantas (fibra), son los ácidos grasos de cadena corta, representados principalmente por acetato en 60%, propionato en 25% y butirato en un 15% (Wong *et al.*, 2006).

La ingesta de una dieta alta en carbohidratos complejos, como leguminosas, almidones resistentes y fibra soluble lleva a una salida de ácidos grasos de cadena corta mayor que la ingesta de fibra insoluble. La composición del microambiente de las bacterias también influye en la cantidad de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (Wong *et al.*, 2006).

I.5 Fermentación oscura

La fermentación oscura es un procesos de fermentación independiente de la luz, en él se emplean bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas para convertir los sustratos ricos en carbohidratos a H_2 y otros productos, principalmente ácidos (acético, láctico, butírico, etc.) y alcoholes (etanol, butanol y metanol). Durante la digestión anaerobia, todo el H_2 producido en los procesos fermentativos primarios es consumido inmediatamente por las bacterias metanogénicas, homoacetogénicas o reductoras de sulfato (estas últimas en ambientes con altas concentraciones de sulfato). Por lo tanto, al inhibir el proceso de metanogénesis se puede evitar la utilización de hidrógeno como precursor del metano y así permitir su acumulación (Das *et* Veziroglu, 2008).

Existen diversos factores que se deben de tomar en consideración para lograr rendimientos en la fermentación, entre ellos se encuentran: pH; temperatura de operación e incubación; tipo y concentración de sustrato, alcalinidad; método de enriquecimiento del inóculo, entre otros (CTC, 2004). Los factores en los que se enfoca esta investigación son el pH, la temperatura de incubación y el tipo de sustrato.

En la fase ácida o fermentación acidogénica, etapa posterior a la hidrólisis, las bacterias acidificantes transforman la materia orgánica en una gran variedad de productos de fermentación, como los ácidos grasos volátiles. En la acetogénesis los componentes más reducidos de la etapa anterior son oxidados a ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, que sirven de sustrato a bacterias metanogénicas. Esta oxidación es llevada a cabo por bacterias facultativas que viven en estrecha colaboración con las bacterias metanogénicas, son bacterias sintróficas denominadas “acetógenas” u “organismos protón-reductores obligados” (CTC, 2004).

La generación de biohidrógeno a través de la fermentación oscura es un proceso complejo en el que intervienen diferentes grupos microbianos que crecen en oscuridad, principalmente del género *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, los cuáles actúan de manera coordinada y secuencial, para

descomponer la materia orgánica, en ausencia de oxígeno libre (Das *et Veziroglu*, 2008). Este tipo de sistemas es del interés del proyecto dado que se debe simular el ambiente en el que viven las bacterias en el colon.

I.6 Caracterización de la comunidad microbiana

La caracterización de la comunidad microbiana en un bioreactor es fundamental para el entendimiento del proceso. Una de las formas de realizar esta caracterización es mediante el uso de técnicas cultivo-independientes que involucran el análisis de una pequeña parte del genoma, como un gen o una región intergénica específica del DNA. (Das *et Veziroglu*, 2008).

Entre las técnicas se incluyen: genotecas de clonas, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), hibridación fluorescente *in situ* (FISH), PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), análisis de espacio intergénico del DNA ribosomal y secuenciación masiva de una genoteca de 16S rDNA (Merriman *et al.*, 2012)

La técnica que se empleará para este trabajo será la secuenciación masiva de una genoteca de 16S rDNA región V3, ésta tecnología permite revelar la secuencia de millones y potencialmente billones de secuencias simultáneamente (Merriman *et al.*, 2012).

I.7 Secuenciación masiva de una genoteca de 16S rDNA

El concepto básico de este tipo de secuenciación es realizar un secuenciación mediante síntesis, con una detección electroquímica de la síntesis y cada reacción acoplada a su propio sensor, que a su vez es organizada en un arreglo masivo de sensores en paralelo en un chip. La base de la detección es que el sensor utilizado es capaz de detectar tanto el pirofosfato liberado por la incorporación de la polimerasa, como el ion H⁺ de la incorporación del OH⁻ en la cadena creciente producto químico de la síntesis incorporación de la polimerasa (Merriman *et al.*, 2012).

II. ANTECEDENTES

En el cuerpo humano existe toda una sucesión de comunidades microbianas con abundancias de lactobacilos o estafilococos según la vía de nacimiento; enterobacterias cerca del primer mes, posteriormente bifidobacterias y bacteroides hasta antes de los seis meses y finalmente a bacteroides y firmicutes desde los dos años (Murugesan *et al.*, 2015). En publicaciones recientes se ha descrito que además del componente genético cromosomal humano, existen en varios casos una influencia de este microbioma asociada a la obesidad, por tal motivo la importancia de su estudio. Además se ha demostrado que variaciones en la proporción relativa de al menos dos phyla de bacterias Firmicutes y Bacteroidetes, están relacionadas con la condición de acumulación de grasa corporal, ya que estas habitan en el colon y producen metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta, los cuales después se pueden ir a síntesis de lípidos y glucosa, y seguir absorbiéndose por el cuerpo (Murugesan *et al.*, 2015). Además del 70% al 90% de los ácidos grasos son metabolizados por los colonocitos y se absorben en el colon.

Por lo tanto la asociación de la microbiota intestinal puede ser un factor de riesgo de obesidad por su influencia en el metabolismo. También investigaciones recientes han sugerido que la microbiota intestinal puede ser factor importante que participa como mediador de la obesidad ya que puede incrementar la habilidad del hospedero para conseguir calorías de la dieta mediante la estimulación de la absorción de grasas y su capacidad de digerir carbohidratos no digeribles por nuestro organismo (Murugesan *et al.*, 2015). Así mismo se ha sugerido que interviene en la modulación de la inmunidad del hospedero, y en la inflamación asociada con la obesidad en ratones (Kim *et al.*, 2014).

Se ha atribuido un efecto anti-inflamatorio a los ácidos grasos de cadena corta, producto de la fermentación anaerobia realizada por algunas especies bacterianas en el tracto gastrointestinal. Estos ácidos grasos han sido utilizados tradicionalmente como terapia en enfermedades como la

colitis y la úlcera colítica (Whelan *et al.*, 2004).(Scheppach, 1996). Se especula que en su mecanismo de acción está involucrada la inhibición del factor NFκB. Así, estos metabolitos estarían relacionados con cascadas de señalización con influencia en el estado de inflamación sistémico (Murugesan *et al.*, 2015). Siendo la obesidad un proceso inflamatorio crónico de baja intensidad; es interesante pensar que una proporción importante de estos casos se deban a una disfuncionalidad entre la expresión genética del microbioma presente en la microbiota del colon, afectando la señalización sistémica en el cuerpo humano. Como referencia se puede observar en la figura 2 las múltiples funciones en las que se encuentra asociado el microbioma.

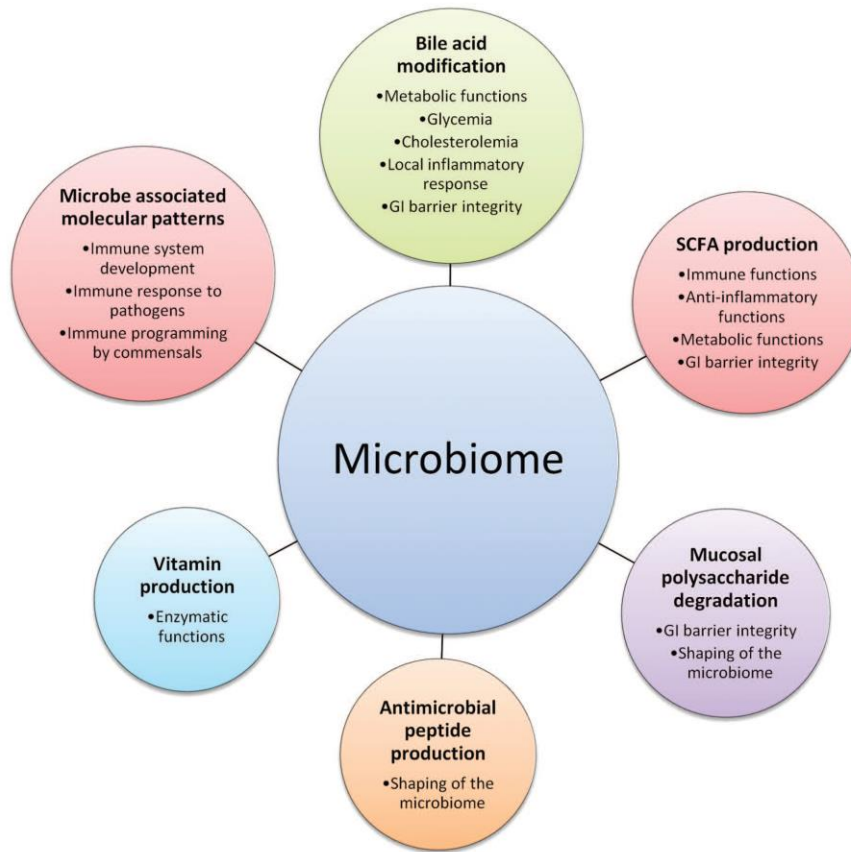


Fig 2. Asociación del Microbioma: inmunidad, inflamación, y funciones metabólicas. (Whelan *et al.*, 2004).

La inulina es un carbohidrato no digerible que consiste en cadenas lineales de fructosa unidas mediante un enlace $\beta(2\rightarrow1)$, usualmente con una unidad terminal de glucosa (figura 3), y ha sido estudiado como prebiótico, un alimento que selectivamente altera la mezcla de la flora bacteriana del colon; aunque su aditamento en la dieta se ha visto que incrementa la proporción de bifidobacterias benéficas en las heces, su impacto bueno o malo en otras especies bacterias no ha sido dilucidada(Wong *et al.*, 2006). La fermentación bacteriana de carbohidratos complejos se lleva a cabo en el colon ascendente transverso proximal. En contraste la dieta de proteínas no digerible que llegan al colon, como las proteínas de la mucosa y las células epiteliales desprendidas, son fermentadas en el colon distal, primordialmente por los carbohidratos, los nutrientes de mayor preferencia por las bacterias.

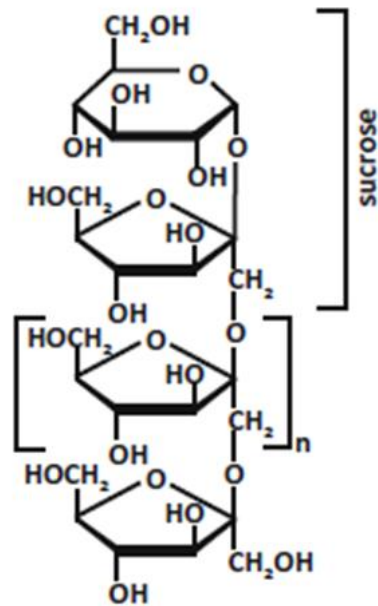


Fig.3 Estructura de la inulina. Unidades de fructosa enlace β (2 \rightarrow 1)

III. JUSTIFICACIÓN

Realizar este trabajo se justifica, porque es necesario documentar comparativamente, cómo fermentan polisacáridos insolubles, las comunidades microbianas provenientes de individuos sanos, e individuos con obesidad. Si existe diferencia entre el desempeño fermentativo de estas comunidades, se tendrá información útil para el desarrollo de estrategias de tratamiento para combatir la obesidad.

Siendo la obesidad un padecimiento de origen multifactorial, el principal valor de un estudio de este tipo, es aportar conocimiento fundamentado sobre una causa del padecimiento que converge en los mexicanos y que puede manejarse a través de la dieta y el uso de prebióticos y probióticos en campañas promovidas por el sector salud. Además una microbiota obesogénica debe distinguirse por un conjunto de genes particulares en su microbioma lo que abre una aplicación inmediata

para el desarrollo de perfiles de marcadores genéticos bacterianos que pueden detectarse en el copro DNA. También un perfil de ácidos grasos o el desempeño de una microbiota del colon sospechosa de estar en disbiosis en un individuo, pueden ser excelentes biomarcadores para detectar este tipo de situaciones.

IV. HIPÓTESIS

La microbiota del colon distal de individuos mexicanos con obesidad tiene mayor capacidad fermentativa que la de individuos en normopeso.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la diversidad y la capacidad fermentativa de la microbiota del colon distal de individuos con obesidad, y normopeso en un modelo de fermentómetro.

V.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1.** Estandarizar protocolo para un modelo de fermentómetro.
- 2.** Recolectar muestras de pacientes con obesidad y sus controles respectivos.
- 3.** Medir la capacidad fermentativa obscura de la microbiota proveniente de los casos y los controles en modelo de fermentómetro.
- 4.** Caracterizar la diversidad de las comunidades microbianas a través del tiempo por secuenciación masiva
- 5.** Establecer una genoteca de ácidos nucleicos extraídos de las muestras de fermentación.

5. Caracterizar la capacidad fermentativa de las comunidades microbianas por la producción de ácidos grasos de cadena corta, por medio de la técnica HPLC, a partir de un sustrato dado.

6. Realizar la interpretación de resultados y el análisis estadístico.

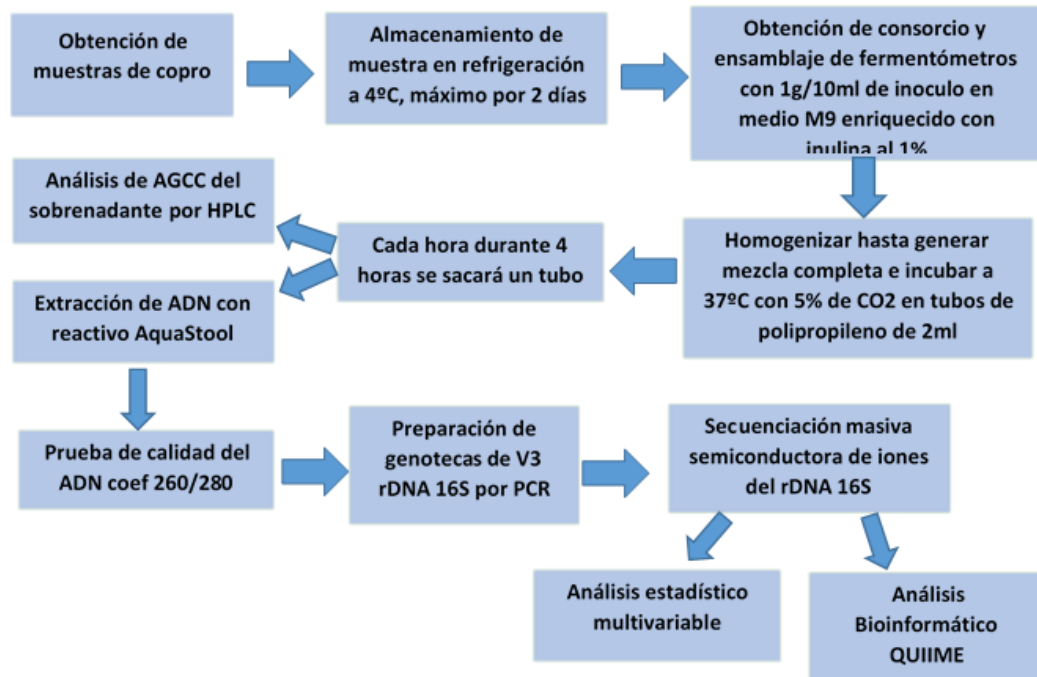
VI. ALCANCE

Para el siguiente protocolo se desarrollará la estandarización de un modelo de fermentómetro a partir de muestras de copro. Las muestras consistirán del consorcio bacteriano fecal de 20 adultos: diez con obesidad y sus respectivos controles. Las cuales se analizarán individualmente por duplicados para obtener los grupos correspondientes (normopeso, y obesidad) durante 4 horas (t0-t4), dando así un total de 200 muestras. El fermentómetro se alimentará con medio mínimo M9 enriquecido con inulina.

Al término del experimento se evaluarán los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la diversidad microbiana correspondiente.

VII. METODOLOGÍA

VII.1 Plan de trabajo



VII.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

VII.2.1 ACTIVIDADES

Fase 1.

Seleccionar 10 adultos con obesidad y sus respectivos controles entre 25 y 45 años de edad, participantes de una cohorte de estudio.

1a. Se considerarán los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- Individuos mexicanos de la ciudad de México entre 25 y 45 años de edad que estén dentro de los rangos de obesidad, y normopeso establecidos por el índice de masa corporal (IMC).

Criterios de exclusión:

- Tratamiento con algún antibiótico menor a tres meses.
- Padecimiento adicional a la obesidad.

Se les dará a los participantes, un consentimiento informado, y un aviso de privacidad, los cuales deberán ser firmados y entregados para poder realizar el estudio. Además se les dará el material necesario para recolectar la muestra de copro (ANEXO 1), la cual deberán almacenar en refrigeración (4°C) hasta ser entregada.

1b. Recolectar muestras de copro de los individuos seleccionados.

Fase 2.

Estandarización del modelo de fermentómetro para medir la capacidad fermentativa oscura de la microbiota proveniente de los casos y los controles.

2a. Obtención del consorcio bacteriano fecal (CBF).

Se usará medio M9 enriquecido con inulina al 1% para alimentar los fermentómetros, se generará un stock del medio en tubos falcon de 50ml, se inocularán con 0.1gr de muestra de copro por cada 10ml de medio. Después usar vortex hasta homogenizar lo máximo posible y alicuotar en tubos de 2ml para después incubarlos a 37°C durante 4 horas. Se sacará un tubo cada hora para evaluar características físico-químicas (pH, temperatura, color, y solubilidad), hacer extracción de ADN y análisis de ácidos grasos de cadena corta por medio de HPLC.

2b. Del modelo de fermentómetro se cuantificará la producción de los principales ácidos grasos de cadena corta como; ácido acético, ácido propiónico, y ácido butírico por medio de cromatografía líquida de alta resolución por sus siglas en inglés HPLC.

Fase 3

Caracterizar la diversidad de las comunidades microbianas y su asociación con la producción de ácidos grasos de cadena corta

3a. Extracción de ADN de las alicuotas obtenidas del fermentómetro, con el reactivo AquaStool. El DNA extraído se cuantificará por absorbancia 260/280 utilizando un Nanodrop y la integridad se evaluará por fraccionamiento electroforético en 0.5% agarosa.

3b. Para la secuenciación masiva es necesario generar una genoteca, para la cual se usará el DNA extraído de las alicuotas de los fermentómetros.

Generación genotecas:

Para cada muestra, se generará genoteca 16S rDNA conteniendo regiones polimórficas V3, y un barcode particular. Se analizará la calidad de los amplicones de 281 pb generados en cada muestra por fraccionamiento electroforético 2.0% agarosa. (sin barcode 194pb para E.coli) Se purificará cada muestra por electroforesis en geles preparativos de agarosa.

Se hará análisis y acondicionamiento de cada genoteca de casos y controles para su secuenciación en equipo Ion Torrent utilizando Chip 318, 1 Gb y una lectura de 400 pb.

Fase 4

Interpretación de datos y análisis estadístico

4a. El archivo de secuencias será analizado utilizando software Qiime y comparando con base de datos 16S rDNA Green Genes.

4b. Se usará el programa Minitab 17 para el análisis estadístico

VII.2.2 Prueba de aseguramiento de la calidad del consorcio extraído

Se procedió a realizar tinción Gram del CBF en diferentes condiciones, primero sin hacer ningún lavado de la muestra, después haciendo un lavado y finalmente con diluciones como se puede observar en las imágenes siguientes que se obtuvieron con el microscopio LEICA MD 500, usando el objetivo de 100x/1.25, el cual es de inmersión.

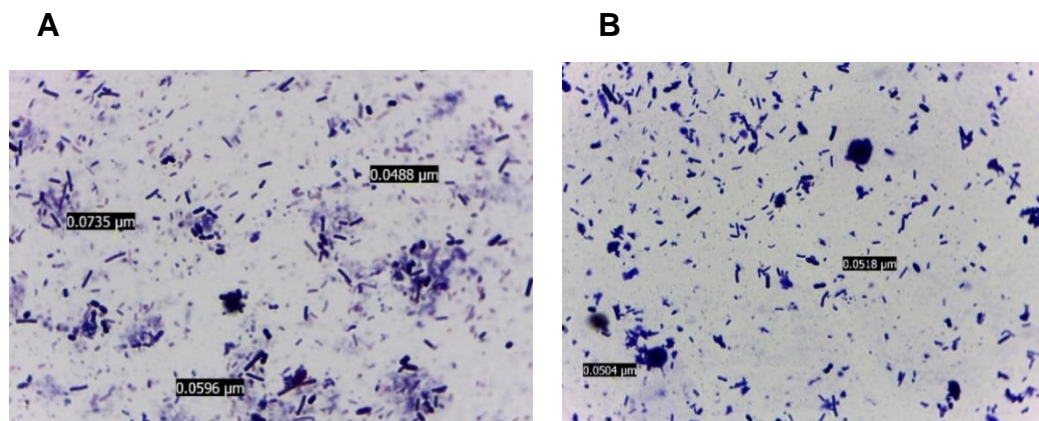


Fig. 4 Tinción gram del CBF (A) Muestra fecal no lavada. (B) Muestra fecal lavada.

En la figura 4 se puede observar que hay bacterias gram positivas y negativas y que el lavado del consorcio sí es útil para eliminar restos de materia orgánica.

VII.2.3 Estandarización de protocolo para el modelo de fermentómetro

Aplicación del Fermentómetro para medir la velocidad de fermentación de consorcios microbianos aislados de copro. A continuación se detalla la metodología de la estandarización del modelo de fermentómetro.

VII.2.3.1 Obtención del consorcio bacteriano fecal (CBF) a partir de una muestra de copro

- 2.1. Pesar por separado para cada caso de estudio 1.0 g de copro por cada 10ml de sales M9 1X, según el volumen que se requiera, en un tubo de polipropileno estéril de 50 mL obtenido como se detalla en la sección “Instructivo para toma de muestra” (ANEXO 2).
- 2.2. A cada tubo conteniendo el copro, adicionar 30mL de sales M9 1X preparadas como se detalla en el protocolo de “Preparación de sales M9”.
- 2.3. Dispersar y homogenizar el copro utilizando un agitador tipo “vortex” a máxima velocidad durante 2 min.
- 2.4. Para eliminar partículas de materia orgánica restantes del copro, centrifugar el tubo durante 1min en una centrífuga Eppendorf 5804R a 3000 rpm (1,157gs) 5° C, utilizando adaptadores.
- 2.5. Transferir cada sobrenadante a otro tubo rotulado adecuadamente.
- 2.6. Repetir paso 2.2 al 2.5 dos veces más.
- 2.7. Empastillar las bacterias de 30.0 mL ajustados como se indica anteriormente por centrifugación durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5804R a 10,500 rpm (14,175 gs) 5° C, utilizando adaptadores.
- 2.8. Recuperar la pastilla y re suspenderla con 30.0 mL de sales M9 1X y homogenizar por 1 min en vortex a máxima velocidad.
- 2.9. Repetir paso 2.7 y 2.8 dos veces más.
- 2.10. Centrifugar el tubo durante 1min en una centrífuga Eppendorf 5804R a 3000 rpm (1,157gs) 5° C, utilizando adaptadores.
- 2.11. Recuperar el sobrenadante, aforar a 48.0 mL.
- 2.12. Medir la densidad óptica a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Spectronic 20D y ajustar la densidad óptica a 1.7.
- 2.13. Empastillar las bacterias de 48.0 mL ajustados como se indica anteriormente por centrifugación durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5804R a 10,5000 rpm (14,175 gs) 10° C, utilizando adaptadores.

2.14. Desechar el sobrenadante y re suspender el botón bacteriano utilizando 16mL medio mínimo M9 enriquecido con inulina a pH 7.0 preparado como se indica en el protocolo “preparación de medio M9” enriquecido con fuente de carbono. Para obtener al final una OD de aproximadamente 4.

VII.2.3.2 Cálculo de absorbancia y unidades formadoras de colonia

Se realizó una estandarización de la densidad óptica (OD) que se desea para todos los tubos que se usaran, lo que permite tener aproximadamente la misma cantidad de bacterias en cada experimento y de cada caso a tratar.

Ajustar todos los tubos a 1.7 de OD con el equipo Spectronic 20D. Con esta OD se puede hacer el cálculo de las unidades formadoras de colonia (CFU) que habrá (OD= 0.5 representa 1×10^8 células) (Li M, 2015). Por lo tanto para nuestro caso a partir de una OD de aproximadamente de 4, tenemos 8×10^8 CFUs.

VII.2.3.3 Preparación de inoculo (CBF) para el fermentómetro

3.1. Preparar 300ml de medio mínimo M9 enriquecido con inulina al 1% como se detalla en la sección “Protocolo de medio mínimo M9”.

3.2. Re suspender y homogenizar el CBF obtenido, en vortex a máxima velocidad por 2 minutos.

3.3. Agregar 1.56ml del indicador de pH purpura de bromocresol como se detalla en la sección “Protocolo purpura de bromocresol”.

VII.2.3.4 Fermentómetro

4.1. Agregar 1.5ml del medio con el inoculo en cada tubo.

4.2. Incubar en campana de CO₂ al 5% a 37°C.

4.3. Sacar un tubo cada hora para medirle pH con tiras de pH Hydrion.

4.4. Centrifugar el tubo por 3 minutos a 12, 000 r.p.m, 4°C.

4.5. Recuperar el sobrenadante en otro tubo de 2.0 mL y del pellet hacer extracción de DNA con AquaStool como se detalla en la sección “Protocolo de extracción de DNA”.

4.6. Repetir punto 4.5 cada hora durante 4hrs.

4.7. Guardar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ los sobrenadantes de cada tubo, para medir metabolitos producidos por las bacterias como pueden ser ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato, acetato y propionato. Mientras que de la extracción de DNA, se procederá a hacer genotecas de cada tiempo para meter a secuenciación.

En la figura 4 se puede observar el diagrama del modelo de fermentómetro antes descrito.

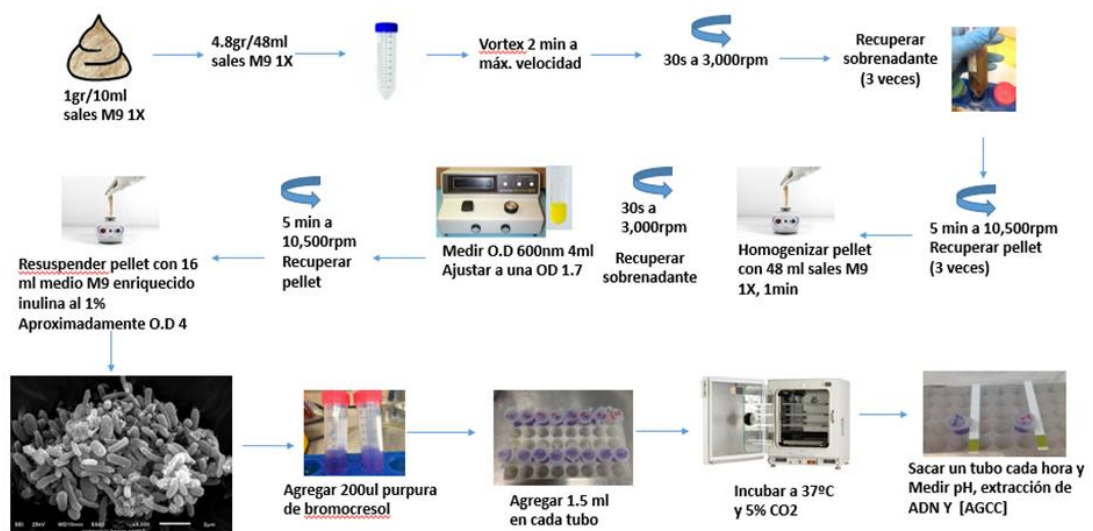
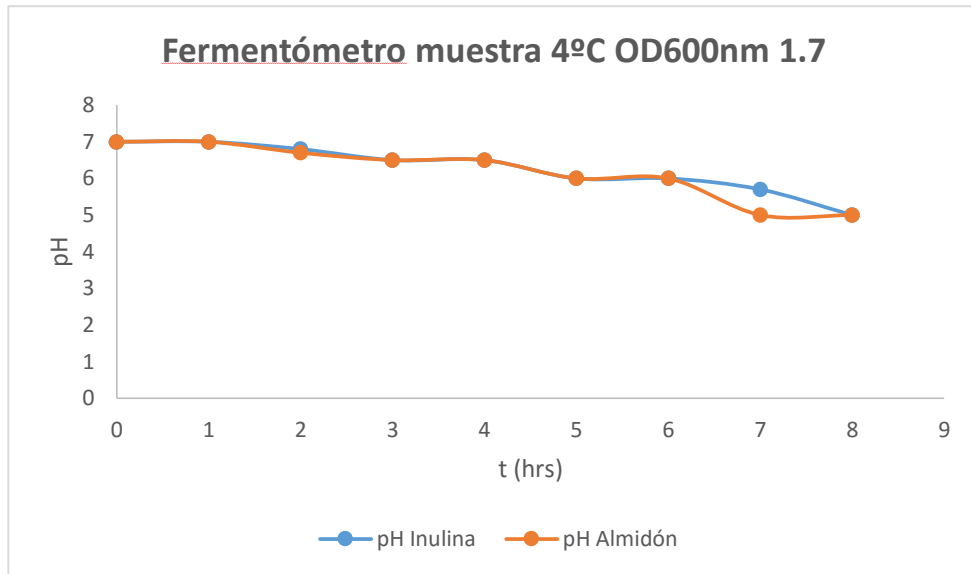


Fig. 5 Diagrama experimental del modelo de fermentómetro.

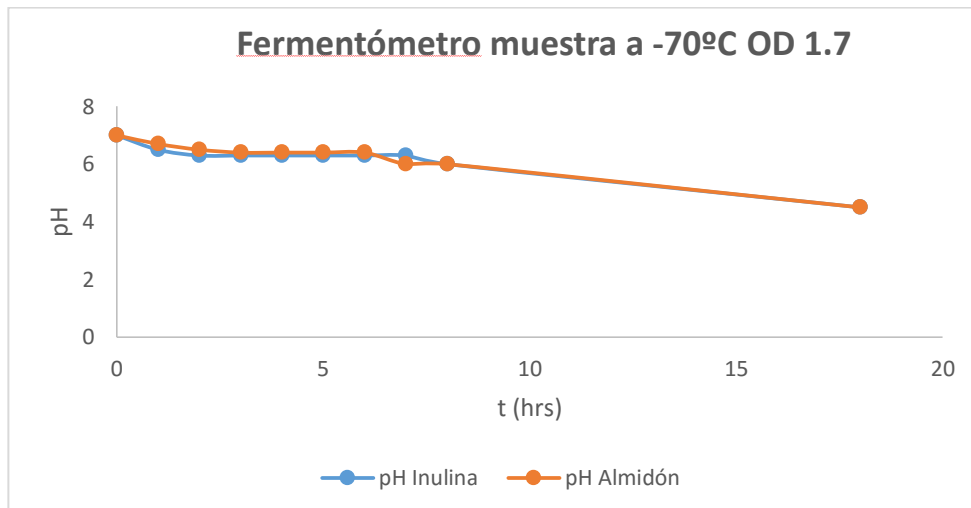
VII.2.3.5 Medición del cambio de pH del fermentómetro en diferentes condiciones

Se midió el pH cada hora en cada caso bajo las diferentes condiciones que se muestran a continuación en las gráficas:

A

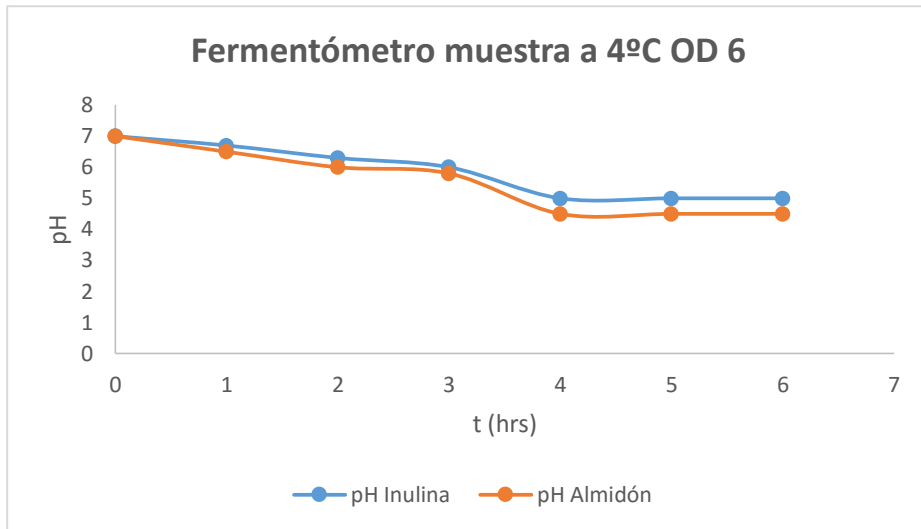


B

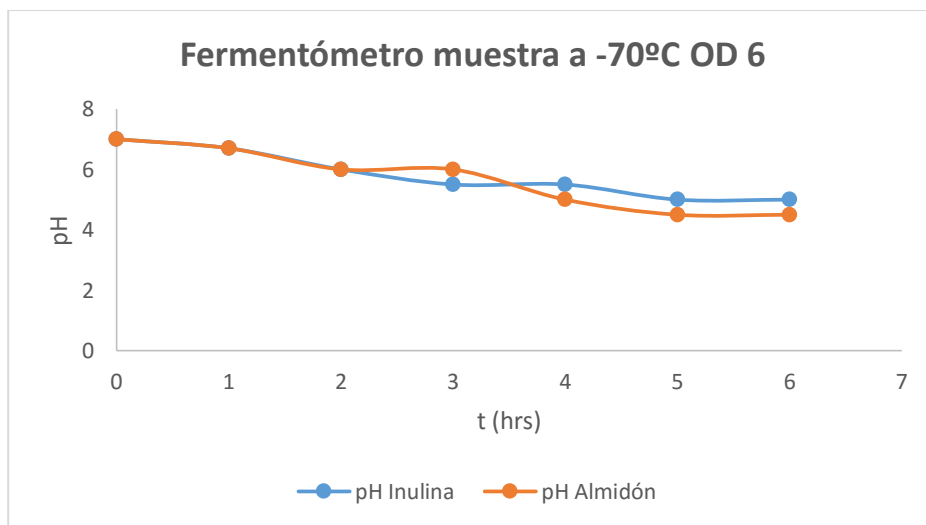


Con las gráficas A y B se pudo concluir que la muestra congelada a la densidad óptica de 1.7 no es suficiente para que cambie el pH a 5 como la muestra fresca. Sin embargo después de 18 horas que se volvió a medir el pH la muestra si bajo de pH a 5, lo que podría sugerir que no todas las bacterias están muertas, y esto indica que sólo requieren de mayor tiempo en lo que se aclimatan después de haber estado congeladas. Por lo tanto se planteó volver a correr el fermentómetro pero ahora dejando más tiempo de descongelación y agregando más inóculo. Los resultados se pueden observar en las gráficas C y D, a continuación.

C



D



Con las gráficas C y D se puede concluir que aumentando el inoculo y dejando descongelar por más tiempo, la fermentación se lleva igual de eficiente en la muestra congelada como en la no congelada. Sin embargo éste resultado no es suficiente para concluir que las bacterias congeladas siguen siendo las mismas de una muestra fresca, falta verificar los resultados de secuenciación.

VII.2.3.6 Preparación de genotecas de muestras extraídas de estandarización de fermentómetro para secuenciación

Para realizar las genotecas de las muestras, primero es necesario hacer extracción de ADN (figura 6), esta se realizó siguiendo el “Protocolo de extracción de ADN de muestra de heces con AquaStool” que se puede encontrar en el APÉNDICE 3.

Después se procedió a medir concentración de ADN, por medio de Nanodrop y hacer electroforesis capilar para ver la calidad del ADN. Una vez cuantificado el ADN, se realizó PCR diagnóstica (figura 7) para verificar presencia de bacterias, con la región polimórfica V3, la cual se puede esquematizar en la figura 5.

Posteriormente se procedió a hacer PCR con barcodes (figura 8) y una vez que amplificaron para 281pb, se procedió a hacer PCR masiva (4 PCR de cada muestra de 50ul cada una) de las muestras. Las condiciones tanto para la PCR diagnóstica como para la de barcode se pueden observar en la tabla 2 y 3 respectivamente.

Se cuantificaron las PCRs masivas por medio de Nanodrop y se calculó los microlitros necesarios para tener una concentración de 10ng por muestra y con esa cantidad correr un gel preparativo (figura 9), para purificar la banda y tener lista la genoteca para la secuenciación.

Como control positivo para la presencia de DNA bacteriano se utilizó la cepa Escherichia coli SK10019 y como control negativo la mezcla de reacción sin DNA molde.

Las amplificaciones se hicieron en un termociclador “2720 ThermalCycler de AppliedBiosystems”. Los productos de reacción se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.70 uL de colorante Midori Green advanced (1:15) utilizando 1uL de agua grado PCR y 5uL del producto de reacción, se utilizó un

marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). Se aplicaron 90 Volts durante 50 minutos y se generó la imagen en el sistema “MolecularImager® Gel Doc™ XR de Bio-Rad”.

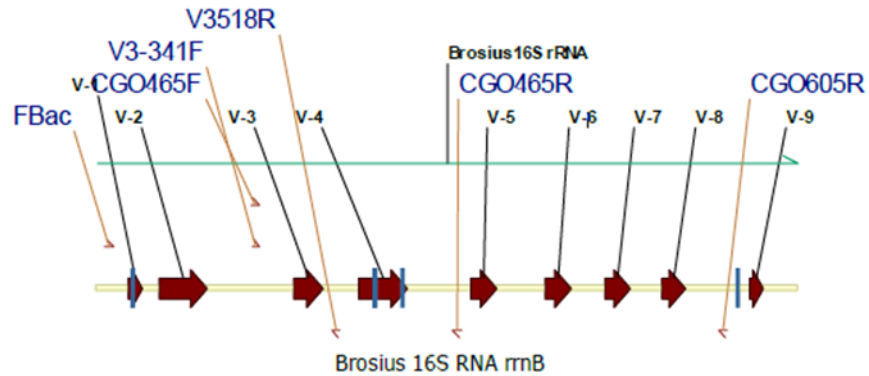


Fig. 5 Regiones polimórficas del gen 16S rRNA de *Escherichia coli* K-12. Se puede observar el gen de RNA ribosomal 16S del cistrommB de *E. coli*. Regiones polimórficas de V1 a V9 y en letras azules y líneas doradas se ubican los pares de iniciadores para las distintas pruebas que se deseen.

Tabla 2. Condiciones de amplificación para la región V3 y V4 del gen 16S (PCR diagnóstica)

Primer	Secuencia
CGO 465 Forward	5'- CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
CGO 465 Reverse	5'-CTACCACCCTATCTAATCCTG-3'

Concentración de reactivos empleados por una reacción de PCR

Reactivo	Concentración Final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2.0 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM
Primer CGO 465 Forward 10 µM	0.2 µM
Primer CGO 465 Reverse 10 µM	0.2 µM
TaqPolimerasa 5U/ µL	0.025 U/ µL
DNA	10 ng por reacción

Programa de Amplificación de PCR

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	95	5.0	
Desnaturalización	94	30seg	
Alineamiento	55.3	30 seg	25 ciclos
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	10.0	
	10	10.0	

Tabla 3. Iniciadores y condiciones empleadas para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA insertando “Barcodes”

Primer	Secuencia
V3 341Forward	5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
V3 518 Reverse	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Concentración de reactivos empleados por una reacción de PCR

Reactivo	Concentración Final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2.0 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM
Primer CGO 465 Forward 10 µM	0.2 µM
Primer CGO 465 Reverse 10 µM	0.2 µM
TaqPolimerasa 5U/ µL	0.025 U/ µL
DNA	10 ng porreacción

Programa de Amplificación de PCR

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	95	5.0	
Desnaturalización	94	15seg	
Alineamiento	55.3	15seg	25 ciclos
Extensión	72	15seg	
Extensión final	72	10.0	
	10	10.0	

VII.2.3.7 Fraccionamiento electroforético para ácidos nucleicos y productos de amplificación por PCR.

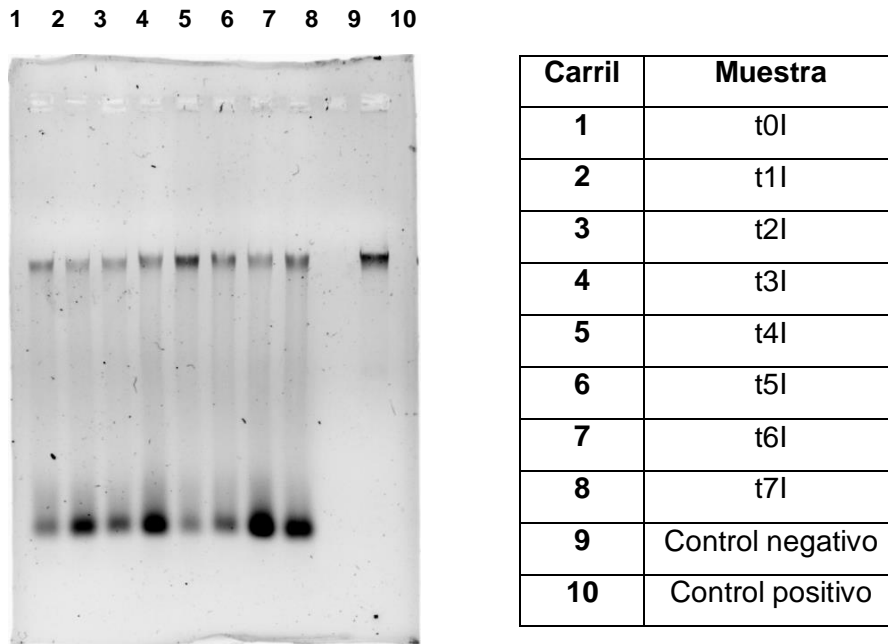
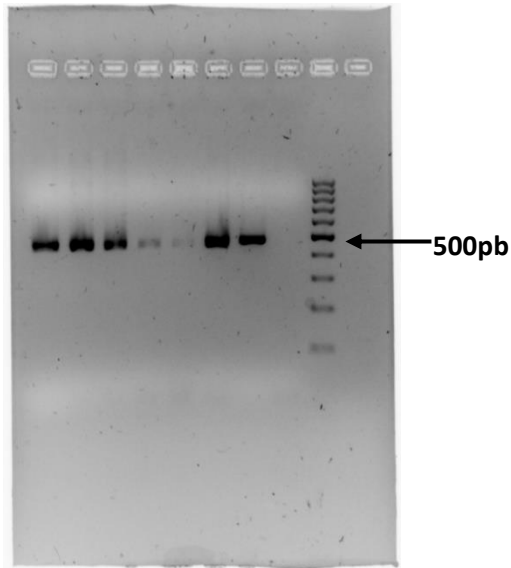


Fig 6. Fraccionamiento electroforético de ácidos nucleicos.

Las muestras de copro corresponden a individuo normopeso procesadas en fermentómetro con inulina como sustrato. Gel de agarosa al 0.5 % teñido con 0.7 uL de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 100 V/45 min. Cada pozo se cargó con 2 uL de muestra, 1 uL de buffer 6X. En la tabla se describen las muestras de copro en cada carril.

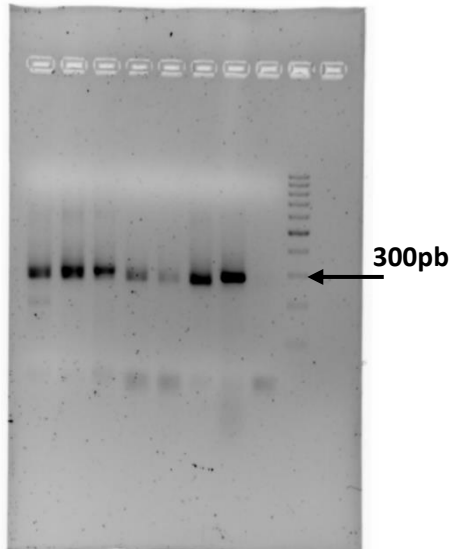
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Carril	Muestra
1	t0l
2	t1l
3	t2l
4	t3l
5	t4l
6	t5l
7	Control positivo
8	Control negativo
9	Marcador de peso molecular

Fig 7. Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando primers CGO 465, por lo que se espera un producto de 465 pb. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7 mL de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 90V /50min. Cada pozo se cargó con 5uL de muestra, y 2uL de buffer 6X. En la tabla se describen las muestras de copro en cada carril, así como el

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Carril	Muestra	No. Barcode
1	t0l	F-29
2	t1l	F-30
3	t2l	F-34
4	t3l	F-43
5	t4l	F-45
6	t5l	F-48
7	Control positivo	F-48
8	Control negativo	F-48
9	Marcador 100pb	-

Fig. 8 Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando primers V3 341F – V3 518R, por lo que se espera un producto de 281pb. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7 uL de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 90V /50min. Cada pozo se cargó con 5uL de muestra, 2uL de buffer 6X. En la tabla se describen las muestras de los diferentes tiempos de fermentación en cada carril, así como control positivo, negativo, marcador de peso molecular y el número de barcode colocado a cada muestra.

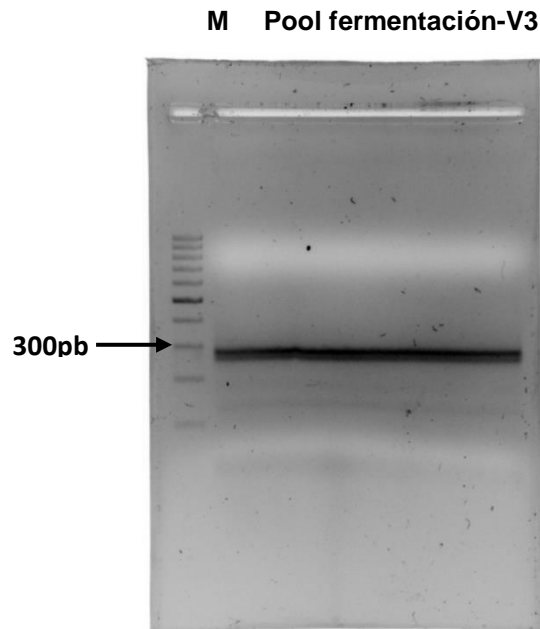


Fig. 9 Fraccionamiento electroforético de preparación de genotecas V3 de rDNA 16S. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7 uL de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 90V /50minse observa el tamaño cercano a 300 pb en la mezcla de las muestras (POOL LV-V3), comparando con el marcador 100 pb.

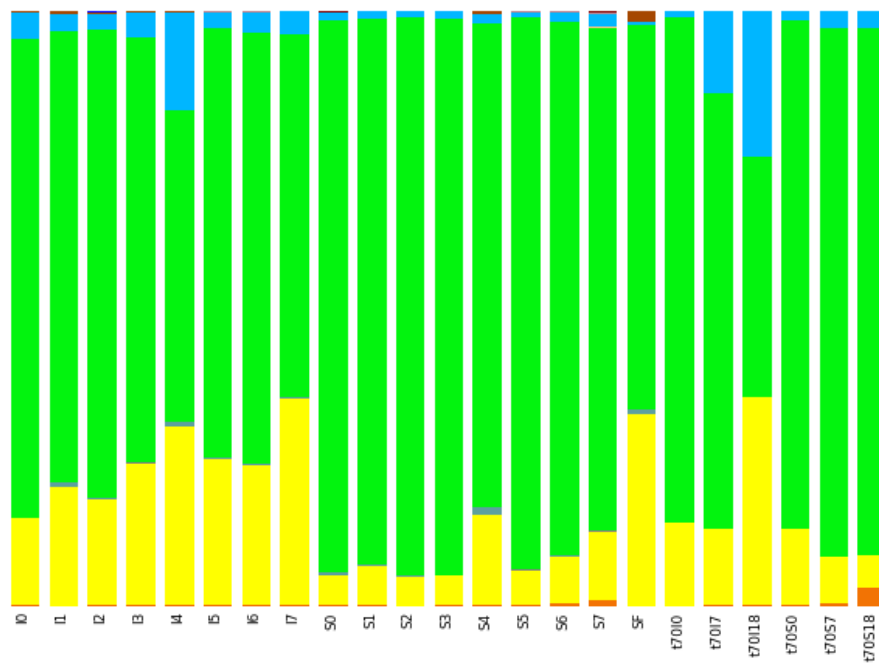
Después de que se determinó la concentración de DNA final de las genotecas, éstas fueron entregadas para llevar a cabo la secuenciación masiva, las muestras se sometieron a análisis de calidad previos al acondicionamiento para llevar acabo la secuenciación y finalmente se cargó el chip para el análisis en el equipo PGM Ion Torrent.

Tabla 4. Primers (barcodes) que se utilizaron y la cuantificación de PCRs masivas para estandarización de fermentómetro.

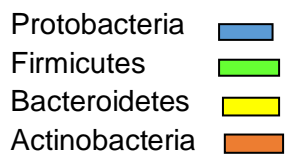
Barcodes	Muestras	A260/280	A260/280 ng/μl
F-29	t0I	1.45	469.1
F-30	t1I	1.45	453.6
F-34	t2I	1.45	367.8
F-43	t3I	1.45	468.4
F-45	t4I	1.45	445.9
F-48	t5I	1.46	479.7
F-49	t6I	1.45	474.1
F-50	t7I	1.45	460.2
F-18	t0A	1.45	456
F-21	t1A	1.44	429
F-23	t2A	1.40	455.7
F-24	t3A	1.43	346.9
F-25	t4A	1.42	420.6
F-26	t5A	1.45	329.4
F-27	t6A	1.46	431.5
F-28	t7A	1.45	419.7
F-03	t0I -70grados	1.50	204.5
F-06	t7I -70grados	1.60	300.5
F-08	t18I -70grados	1.60	428
F-20	t0A -70grados	1.60	200
F-46	t7A -70grados	1.62	345.7
F-47	t18I -70grados	1.60	450.6

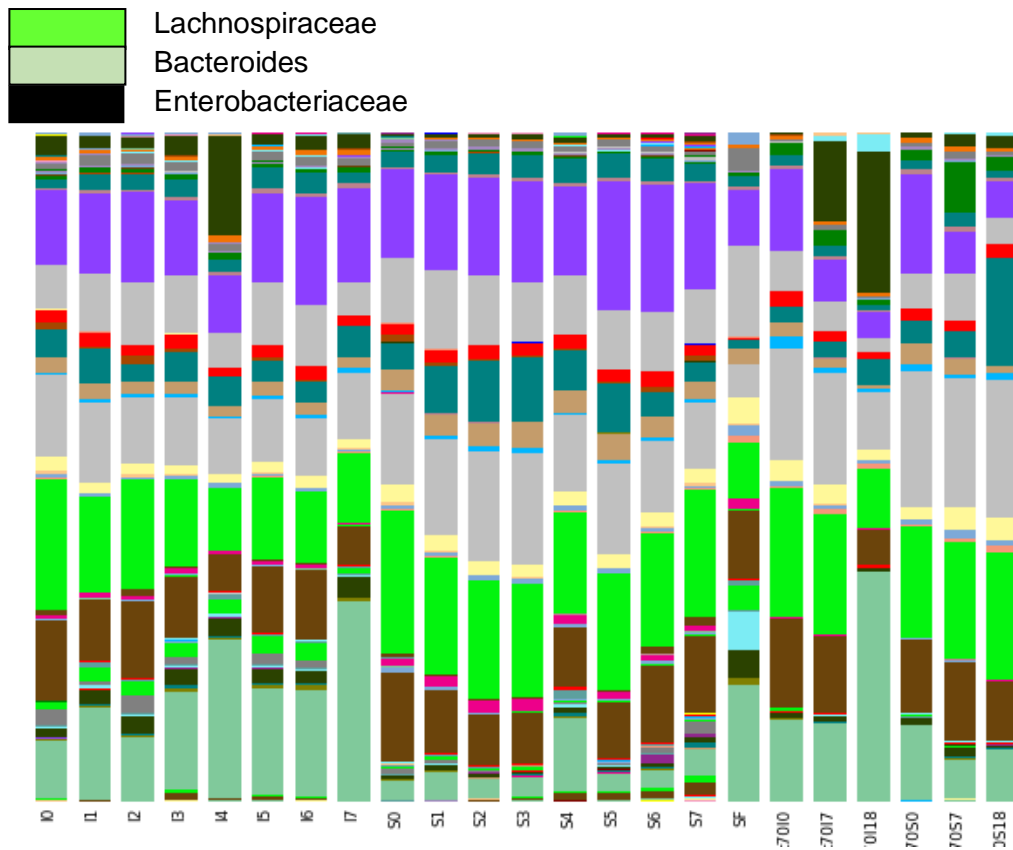
Las secuencias de todos los primers (barcodes) se pueden observar en el ANEXO 2, tabla de Barcodes para secuenciación masiva semiconductora de iones.

VII. 2.3.8 Análisis de resultados de secuenciación de estandarización



Gráfica 2. Abundancia relativa nivel phylum a través del tiempo para inulina y almidón. Estandarización de modelo fermentómetro.





Gráfica 3. Abundancia relativa nivel género a través del tiempo para inulina y almidón. Estandarización de modelo fermentómetro.

Con las gráficas de abundancia relativa se pudo observar, la diversidad a nivel tanto de phylum como de género y se puede sugerir que no existe una disbiosis significativa durante las 7 horas en las que se evaluó la fermentación del consorcio bacteriano, sin embargo dado que sí se observa un cambio al paso del tiempo y más con la muestra que no se le evaluó en el modelo de fermentómetro, es necesario graficar los diferentes índices de diversidad contra el tiempo para definir con mayor certeza durante el tiempo en que se evaluará.

VII.2.3.9 Índices de alfa diversidad contra tiempo

Los índices de diversidad de la estandarización se pueden observar en la gráfica 4, donde el índice Chao1 nos indica el número de especies esperadas de la muestra comparándolo con el número de especies observadas, quitando el sesgo de que algunas muestras tengan más lecturas que otras.

Por otra parte el índice Shannon, nos indica que tan diversas son las muestras y para el tiempo cero, podemos observar que la muestra sin fermentar es más diversa en comparación con la muestra procesada con inulina y esta a su vez es más diversa que la procesada con almidón lo que nos indica que hay una pérdida de la diversidad de especies durante el proceso de fermentación. De manera general la muestra tratada con almidón es menos diversa que la tratada con inulina.

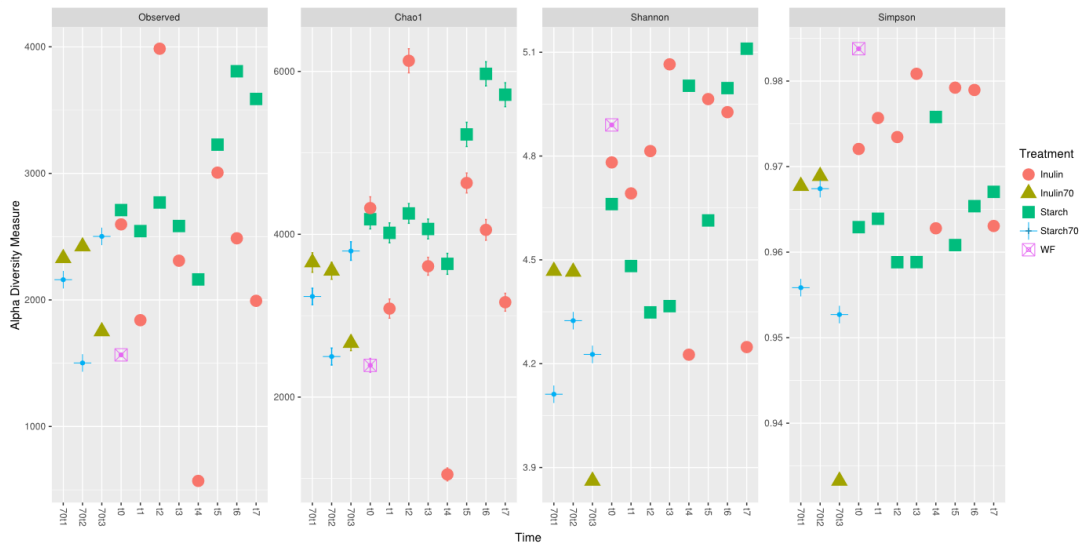
Por último el índice Simpson nos indica la dominancia de las especies en la muestra, entre más se acerque el valor a uno, hay dominancia de alguna de las especies, por lo tanto podemos observar que la muestra sin fermentar presenta una mayor dominancia con respecto a la de inulina y almidón, y a su vez inulina más que la muestra tratada con almidón. Esto nos surge que hay alguna o algunas especies en mayor abundancia.

Para el caso de la muestra sin fermentar los phylum dominantes son los Bacteroidetes del genero Bacteriodes, al igual que las muestras tratadas con inulina, mientras que con almidón son los Firmicutes del genero Lachnospiraceae.

Dado que los firmicutes están siendo beneficiados con el sustrato de almidón, se procederá sólo a usar inulina como sustrato, partiendo del hecho que los firmicutes están asociados a un perfil de obesidad. (Murugesan *et al.*, 2015)

Además de que los índices de diversidad indican que con almidón como sustrato se pierde diversidad, con respecto a la inulina.

Para las muestras con almidón e inulina a -70°C se puede observar que se comportan completamente diferentes que las muestras almacenadas a 4°C , y tienen menor diversidad.



Gráfica 4. Gráfica de los diferentes índices de alfa diversidad contra tiempo para inulina y almidón. Estandarización de modelo fermentómetro.

Se puede concluir que la diversidad cambia de una muestra procesada en el fermentómetro con respecto a una sin procesar y a su vez esta diversidad es dependiente del sustrato usado, y del tiempo de fermentación. Por lo tanto, se debe evaluar el CBF en el menor tiempo posible y las muestras deben ser procesadas al momento, debido a que hay una disminución de la diversidad en muestras almacenadas a -70°C . Lo que indica que a pesar de que el pH haya disminuido igual que una muestra fresca, no quiere decir que sean las mismas bacterias presentes y que la diversidad se mantenga.

Finalmente después de la estandarización del modelo de fermentómetro y con base a los resultados obtenidos, se determinó trabajar sólo con el sustrato inulina, durante un periodo de 4 horas y con una muestra sin almacenarla a -70°C antes de ser procesada.

VII.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido

Se realizó microscopía electrónica de barrido a la extracción del consorcio bacteriano fecal, y a los tratamientos con inulina y almidón de t0 y t4 para los casos y sus controles. Esto con la finalidad de observar la morfología y ver si existían cambios significativos entre ambos.

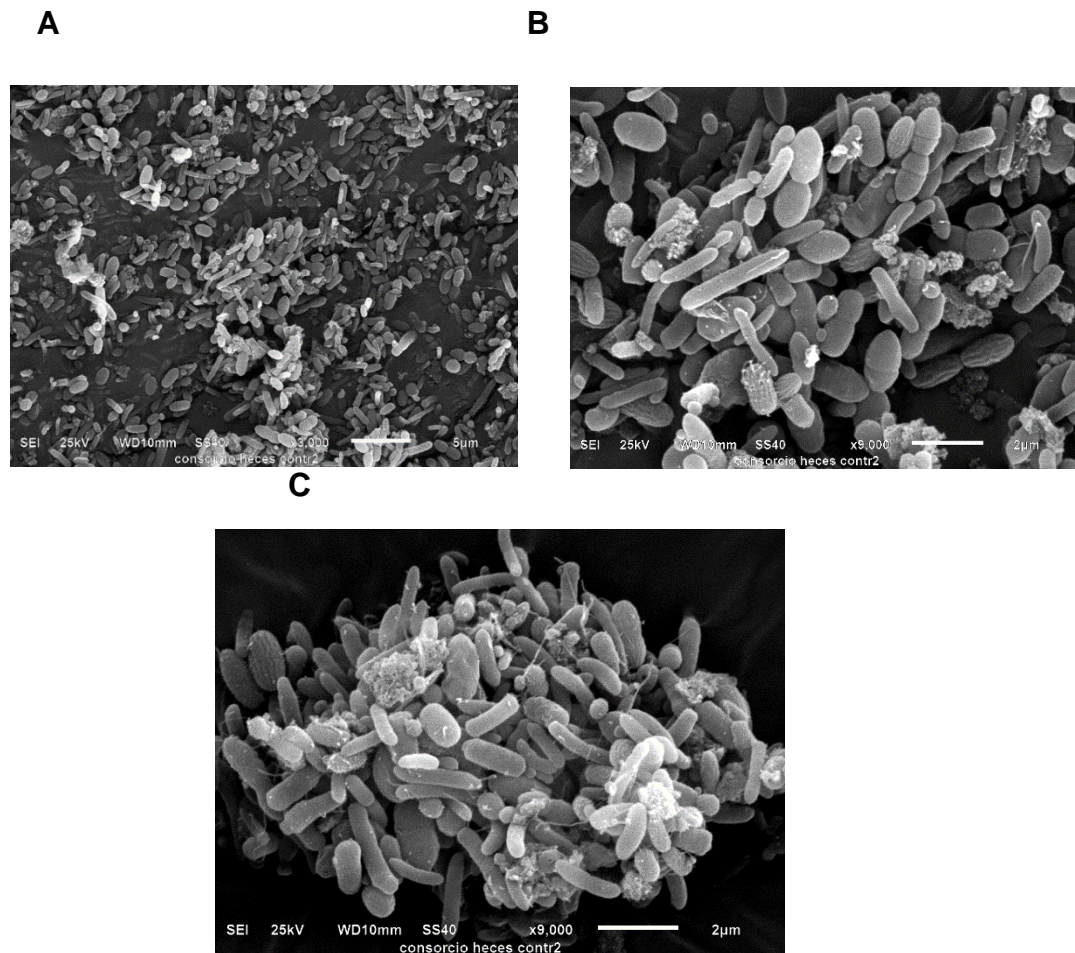


Figura 6. A) Consorcio Bacteriano Fecal (CBF) x3,000. B) Consorcio Bacteriano Fecal (CBF) x9,000.

En la figura 6 A podemos observar la extracción del consorcio bacteriano fecal (CBF) a una amplificación de x3,000, en la B se muestra lo mismo pero a una amplificación de x9,000 y en la C también es una amplificación a x9,000, pero se tomó de un granillo que se formó. En ambas se observan diferentes tipos de bacterias como cocos, diplococos, y diferentes bacillos. Además de algunos restos sobrantes de materia orgánica.

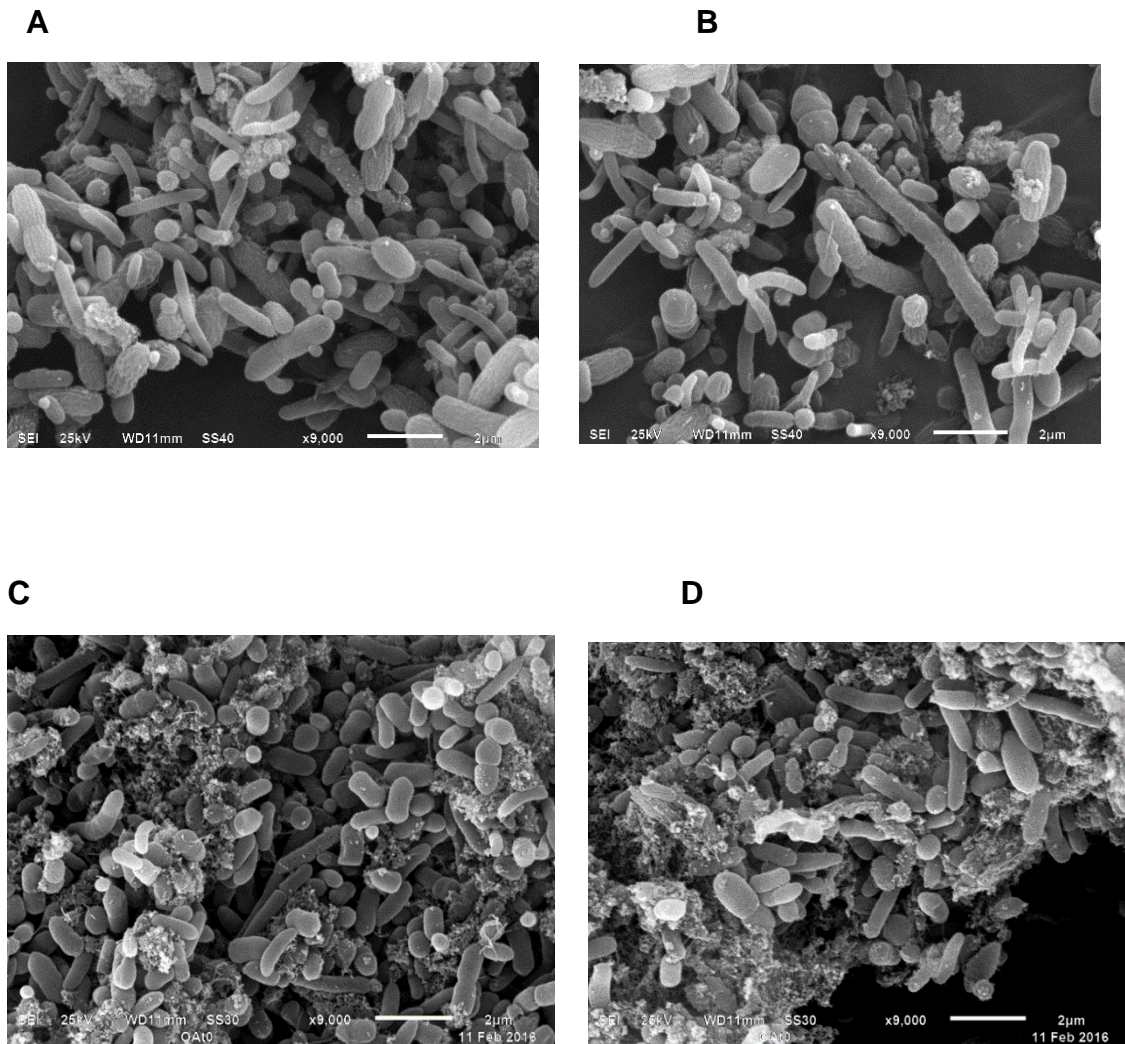
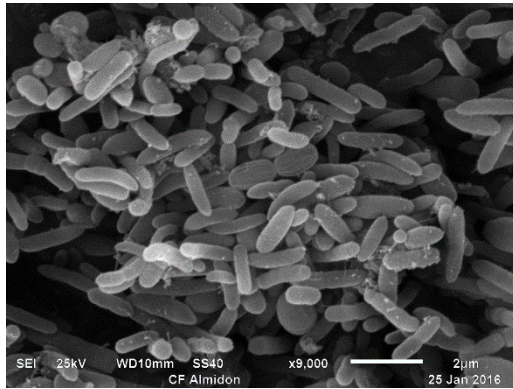


Figura 7. A) CBF Normopeso t0Almidón. B) CBF Normopeso t0Almidón. C) CBF Obesidad t0Almidón D) CBF Obesidad t0Almidón. Todas a x9,000.

En la figura 7 podemos observar la extracción del CBF en el tiempo cero de fermentación con almidón a una amplificación de x9,000 con los diferentes casos de estudio normopeso, y obesidad. En los dos casos se mantiene un patrón de las diferentes bacterias presentes, como; cocos, diplococos, y diferentes bacilos sin embargo un ligero cambio que se observa es que en la muestra de normopeso hay un poco más de bacilos largos con respecto a los de obesidad. Además en la muestra de obesidad se ve una mayor cantidad de almidón que no se pudo eliminar por completo después del lavado.

A



B

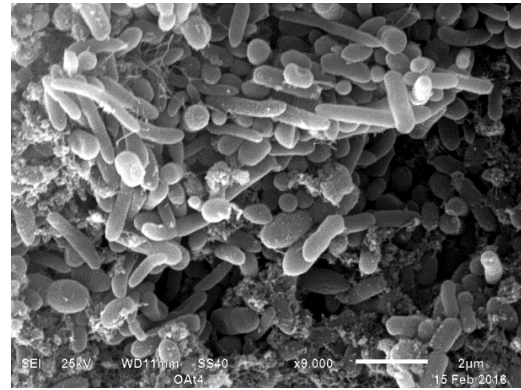
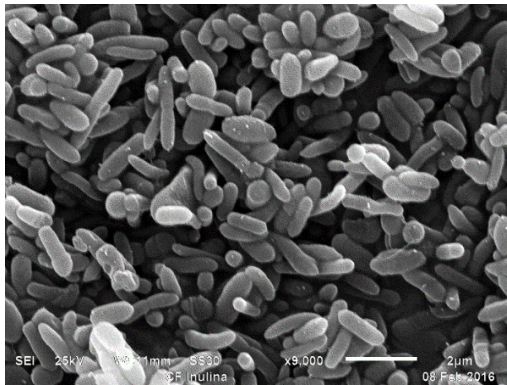
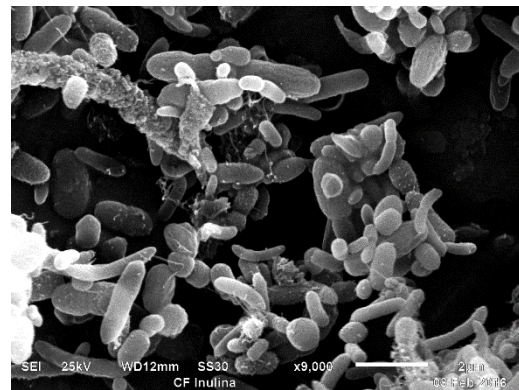


Figura 8. A) CBF Normopeso t4 Almidón. B) CBF Obesidad t4 Almidón. x9,000

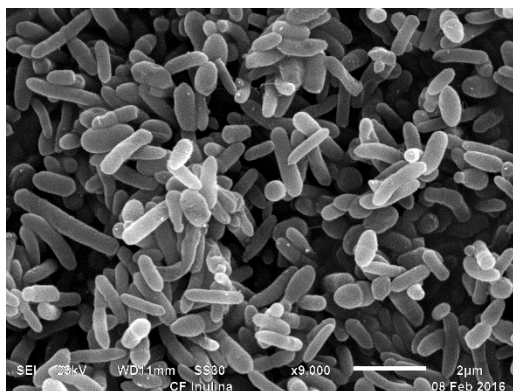
A



B



C



D

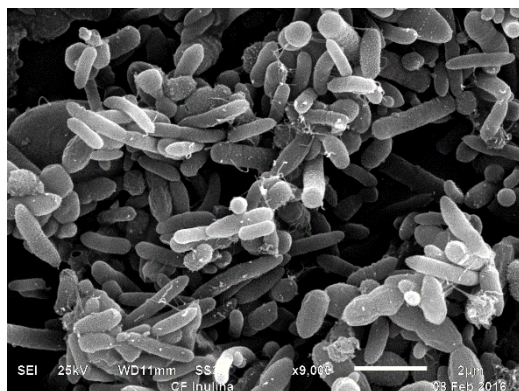


Figura 9. A) CBF Normopeso t0 Inulina x9,000. B) CBF Obesidad t0 Inulina x9,000 C) CBF Normopeso t4 Inulina x9,000. D) CBF Obesidad t4 Inulina x9,000.

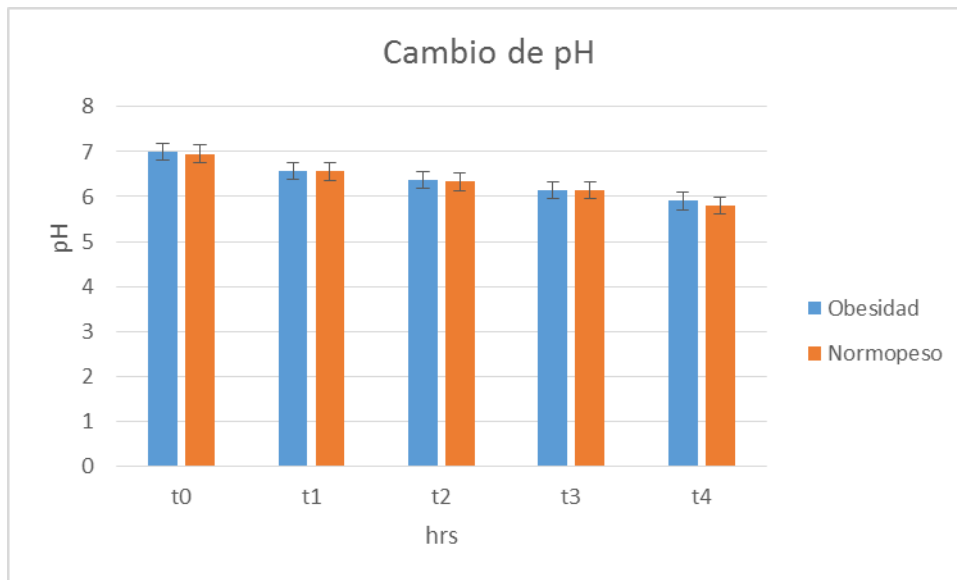
En la figura 8 se puede observar la extracción del CBF después de haber transcurrido cuatro horas de fermentación con almidón para la muestra de normopeso y obesidad. La muestra de normopeso después de la fermentación no presenta cambios notables, sin embargo la muestra de obesidad del tiempo cuatro con respecto al tiempo cero, se observa más limpia lo que sugiere que el consorcio pudiera estar consumiendo el sustrato.

En la figura 9 se puede observar la extracción del CBF en el tiempo cero y después de haber transcurrido cuatro horas de fermentación con inulina para la muestra de normopeso y obesidad. La muestra de normopeso después de la fermentación no presenta cambios notables, como con el sustrato almidón, pero para la muestra de obesidad del tiempo cuatro con respecto al tiempo cero, se observa más limpia y con un poco más de cocos comparados con normopeso. Además una ligera diferencia en que parece que las bacterias tratadas con inulina tienen un menor tamaño en comparación con las tratadas con almidón.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Muestras procesadas en fermentómetro

Lo primero que se analizó en las muestras obtenidas cada hora del fermentómetro fue el cambio de pH, dicho cambio se puede observar en la gráfica 3 en la cual se muestra que entre los dos grupos analizados, obesidad y normopeso, no existe una disminución significativa de éste, $p \geq 0.05$, a través del tiempo en el que se estableció (4 horas). A los datos obtenidos se les realizó un test de normalidad para verificar si eran datos paramétricos o no paramétricos, obteniendo que eran paramétricos, por lo tanto se procedió a hacer una prueba de ANOVA obteniendo un valor de $p \geq 0.05$.



Gráfica 5. Cambio de pH a través del tiempo para ambos grupos

VIII.2 Gráficos de abundancia relativa de la secuenciación masiva

Cuando se compararon los OTUS generados por la secuenciación contra la base de datos de Green genes, se obtuvieron gráficos de la abundancia relativa de microorganismos encontrados en las distintas muestras en los seis niveles taxonómicos como son: Reino, Phyla, Clase, Orden, Familia y Género.

En la figura 9 se observa la abundancia relativa en porcentaje de los phyla representados en las muestras procesadas en el modelo de fermentómetro, se graficaron para cada grupo por el conjunto total de todas las muestras de cada tiempo, estos phyla fueron Bacteroidetes 15.05% para normopeso y 39.9% para obesidad, Actinobacteria 0.68% para normopeso y 0.46% para obesidad, Firmicutes 81.97% para normopeso y 53.87% para obesidad y Proteobacteria 1.81% para normopeso y 5.49% para obesidad.

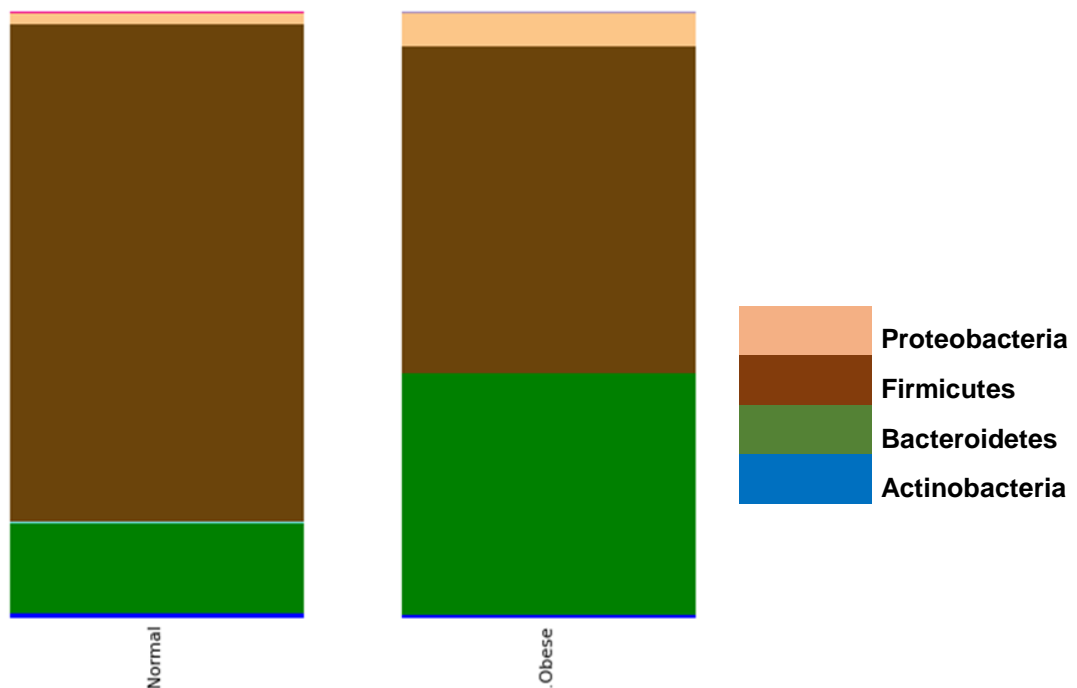


Fig. 9 Abundancia relativa de microorganismos a nivel de phylum en las muestras de fermentación de los dos grupos con inulina como sustrato. Cada barra representa 100%.

En la figura 10 se observa la abundancia relativa en porcentaje a nivel de géneros representados en las muestras procesadas en el fermentómetro. Se graficaron para cada grupo (normopeso y obesidad) el total de las muestras de cada tiempo, los géneros con mayor porcentaje fueron Feacalibacterium 18.46% para normopeso y 10.27% para obesidad, Lachnospiraceae 16.92% para normopeso y 10.26% para obesidad, Prevotella 2.22% para normopeso y 23.20% para obesidad, Dorea 7.97% para normopeso y 5.77% para obesidad y Bacteroides 10.56% para normopeso y 13.93% para obesidad.

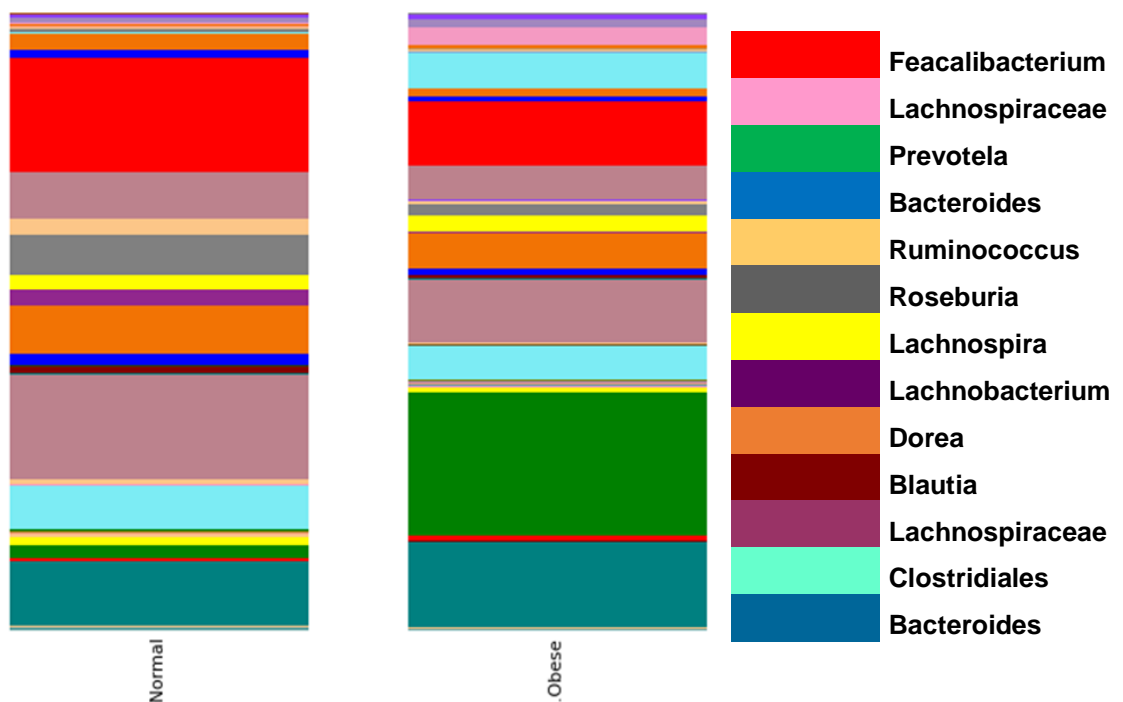


Fig. 10 Abundancia relativa de microorganismos a nivel de género en las muestras de fermentación de los dos grupos con inulina como sustrato. Cada barra representa 100%.

En la figura 11 se observa la abundancia relativa en porcentaje de los phyla representados en las muestras procesadas en el fermentómetro a través del tiempo.

Las muestras provenientes de individuos normopeso tienen mayor porcentaje de firmicutes que los individuos con obesidad y a su vez menor

porcentaje de Bacteroidetes. En ambos casos la abundancia permaneció prácticamente constante a través del tiempo.

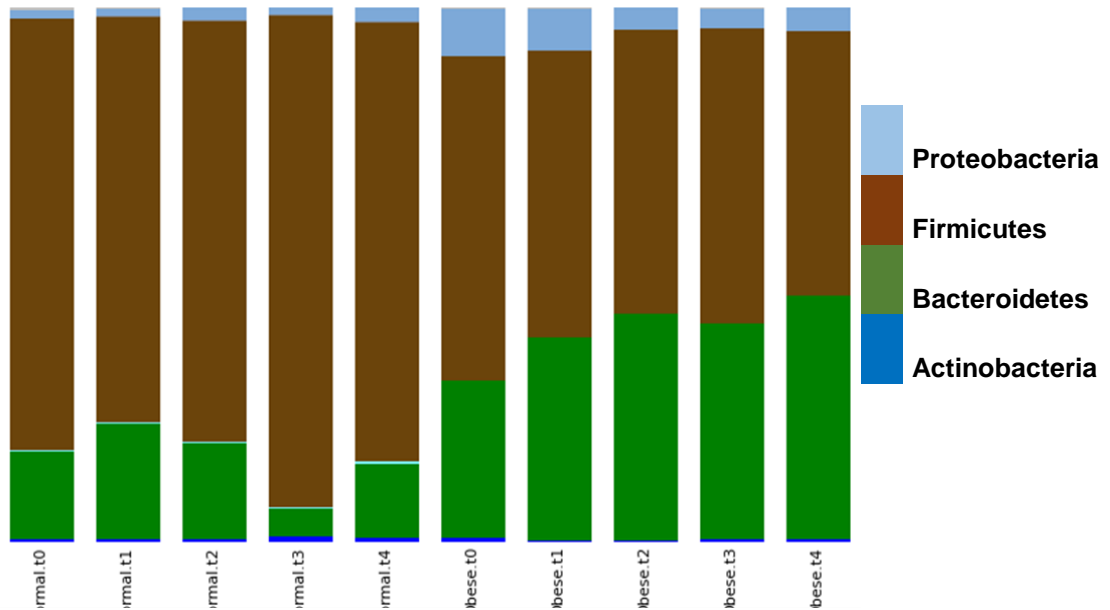


Fig. 11 Abundancia relativa de microorganismos a nivel de phylum en las muestras de fermentación de los dos grupos con inulina como sustrato a través del tiempo.

En la figura 12 se observa la abundancia relativa en porcentaje a nivel de géneros representados en las muestras procesadas en el fermentómetro. Se graficaron para cada grupo (normopeso y obesidad) el total de las muestras a través del tiempo. El género *Feacalibacterium* y *Lachnospiraceae* se observaron en mayor abundancia para el grupo de normopeso con respecto al grupo de obesidad, mientras que *prevotella* se observó en mayor abundancia en el grupo de obesidad con respecto al de normopeso. Finalmente el género *Bacteroides* mantuvo una abundancia constante a través del tiempo, a excepción del tiempo 3 en el grupo de normopeso, ya que incrementa el género *Feacalibacterium* y disminuye el género *Bacteroides*.

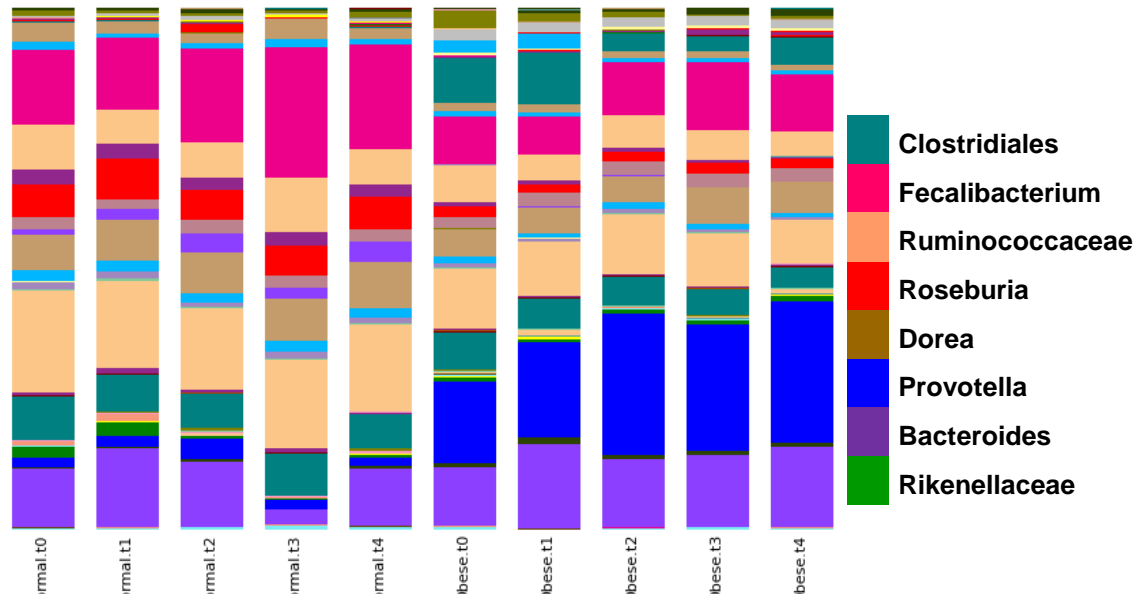


Fig. 12 Abundancia relativa de microorganismos a nivel de géneros a través del tiempo en las muestras de fermentación de los dos grupos con inulina como sustrato.

VIII. 3 Índices de diversidad

En la figura 13 se pueden observar los índices de diversidad, los cuales permiten analizar el muestreo, la dominancia y la diversidad de la población de estudio.

El índice observado indica la cantidad de OTUS que hay en la muestra, además de permitir comparar los valores de éste con los del índice Chao1 y saber si el muestreo fue adecuado, ya que Chao1 indica cuantas especies nuevas esperabas comparándolas con el índice observado. Por lo tanto si dichos valores siguen un patrón bastante similar, significa que el muestreo fue adecuado porque no aparecieron más OTUS de los que se esperaban, como se observa para éste caso.

Por otra parte el índice Shannon, nos indica que tan diversa es la población entre ella misma, ya que mide la distribución de la abundancia, por lo tanto entre más grande sea el valor más diversa será, el rango es de 0.0076 a 8.7. (Alcaraz *et al.*, 2016) Podemos observar que tanto el grupo normopeso como obesidad, mantienen una diversidad no tan grande y muy parecida con un valor aproximado a 4.74 y 4.72 respectivamente.

Por último el índice Simpson nos indica la dominancia de las especies en la muestra, entre más se acerque el valor a uno, hay dominancia de alguno de los phylum, por lo tanto podemos observar que el grupo de obesidad tiene mayor dominancia de algún phylum, con un valor de 0.971, que pudieran ser los bacteroidetes (*g_prevotella*), en comparación con el grupo normopeso con un valor de 0.967.

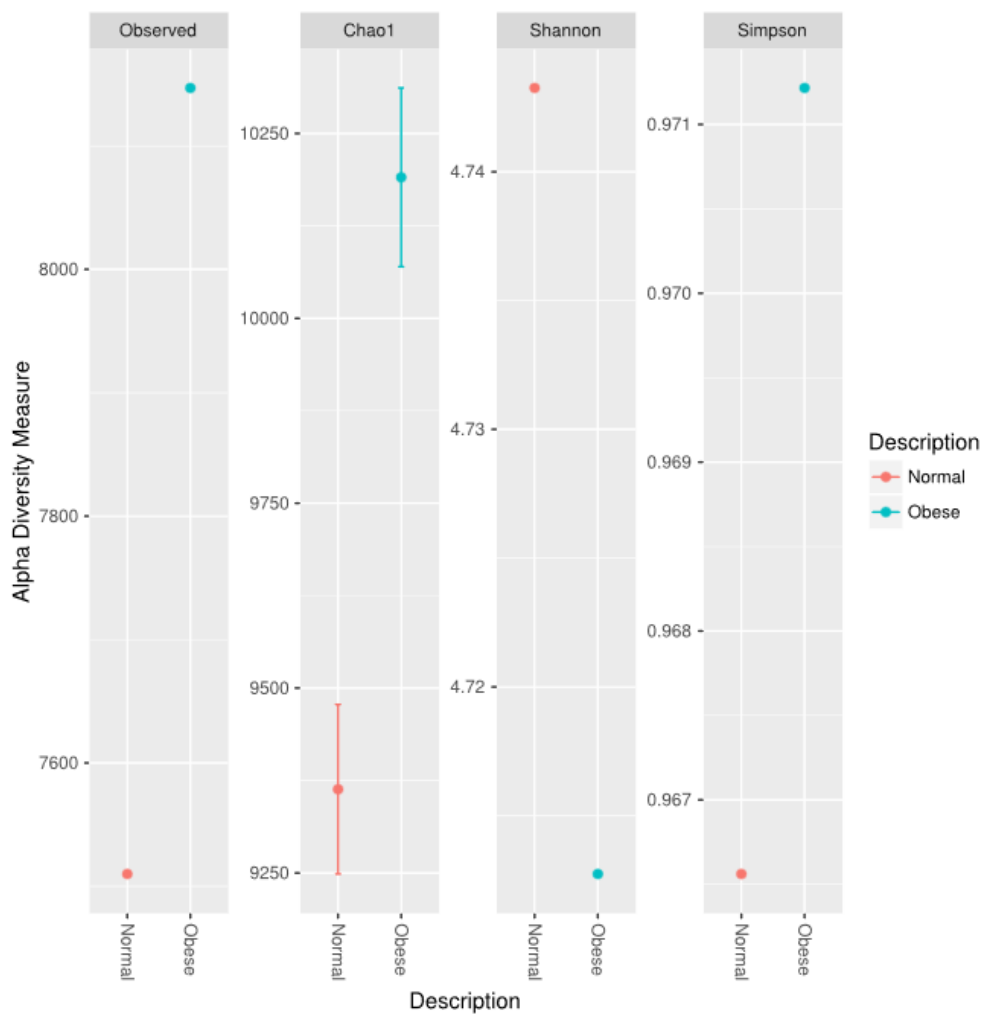


Fig. 13 Índices de diversidad, provenientes de la diversidad alfa. Los índices de diversidad analizados son Observado, Chao1, Shannon y Simpson.

Dado que el resultado de abundancias relativas sólo es sugerente de como se está comportando la población analizada, se llevó a cabo también un análisis de las abundancias absolutas. Una vez que se tuvieron estos valores se usó el software Minitab 17 para aplicar un test de normalidad para ver si eran datos paramétricos o no paramétricos, dado que fueron datos no paramétricos se procedió a hacer una prueba de Kruskal-Wallis por OTUS, para determinar sólo aquellos que tienen diferencia significativa, aquellos que obtuvieron un valor de $p \leq 0.05$, se analizaron por medio de la tasa de descubrimiento de falsos, por sus siglas en inglés FDR, la cual permite conceptualizar la tasa de errores de tipo I en la hipótesis nula, quitando falsos positivos cuando se realizan comparaciones múltiples. Posteriormente a los OTUS que quedaron se les aplicó la corrección de Bonferroni, con la finalidad de generar un mayor ajuste de la p , encontrando que sólo los géneros, Blautia, Coprococcus, Lachnobacterium, Faecalibacterium, Ruminococcus, o_Clostridiales y f_Lachnospiraceae fueron significativos. Dichos géneros se pueden observar en la figura 14 comparándolos entre ambos grupos.

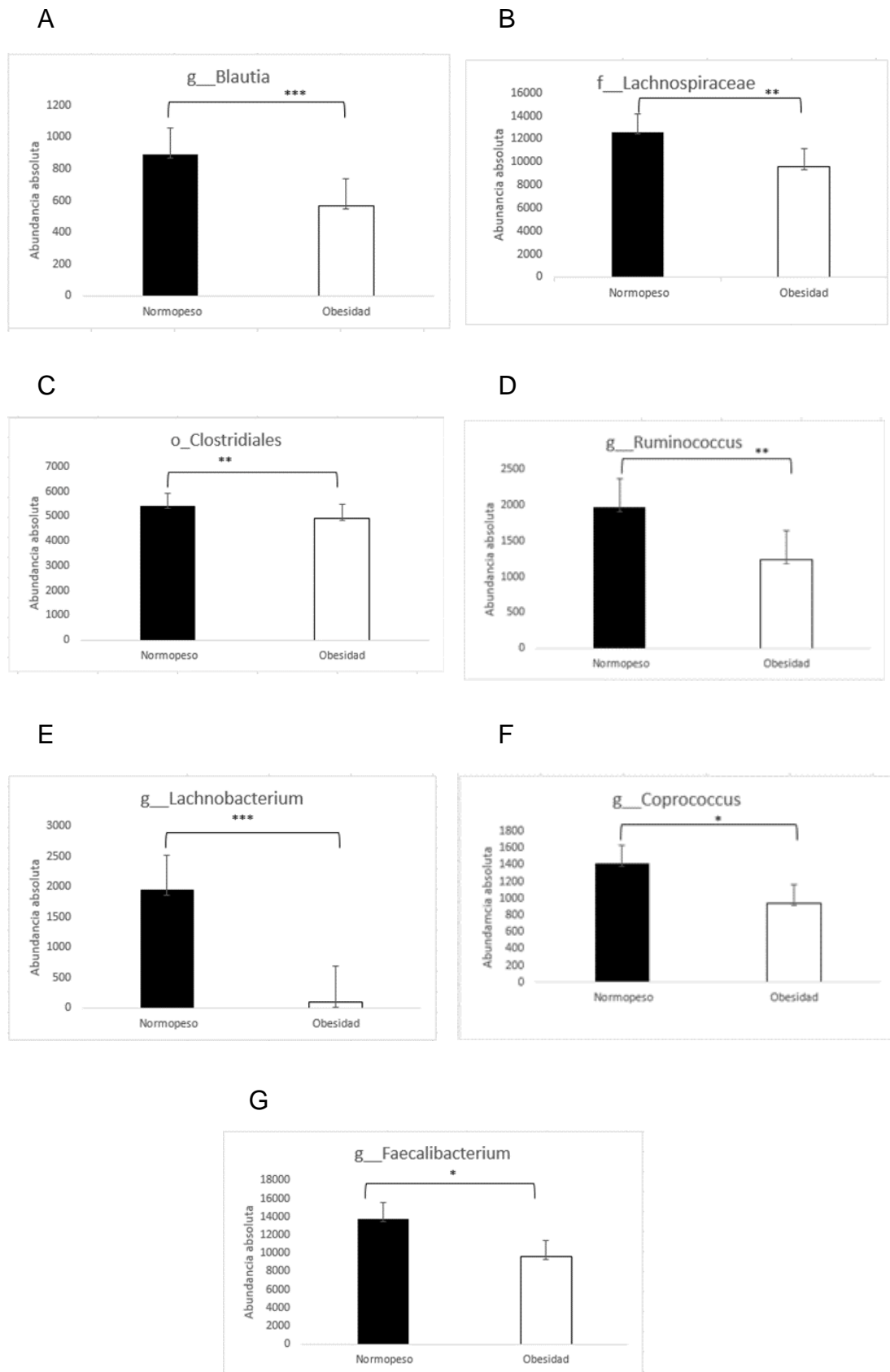


Fig. 14 Gráficas de abundancia absoluta para cada bacteria significativa con valor de $p \leq 0.05$, de cada grupo. La barra de error representa la media del error estándar. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

VIII. 4 Análisis de la capacidad fermentativa por medio de la técnica de HPLC

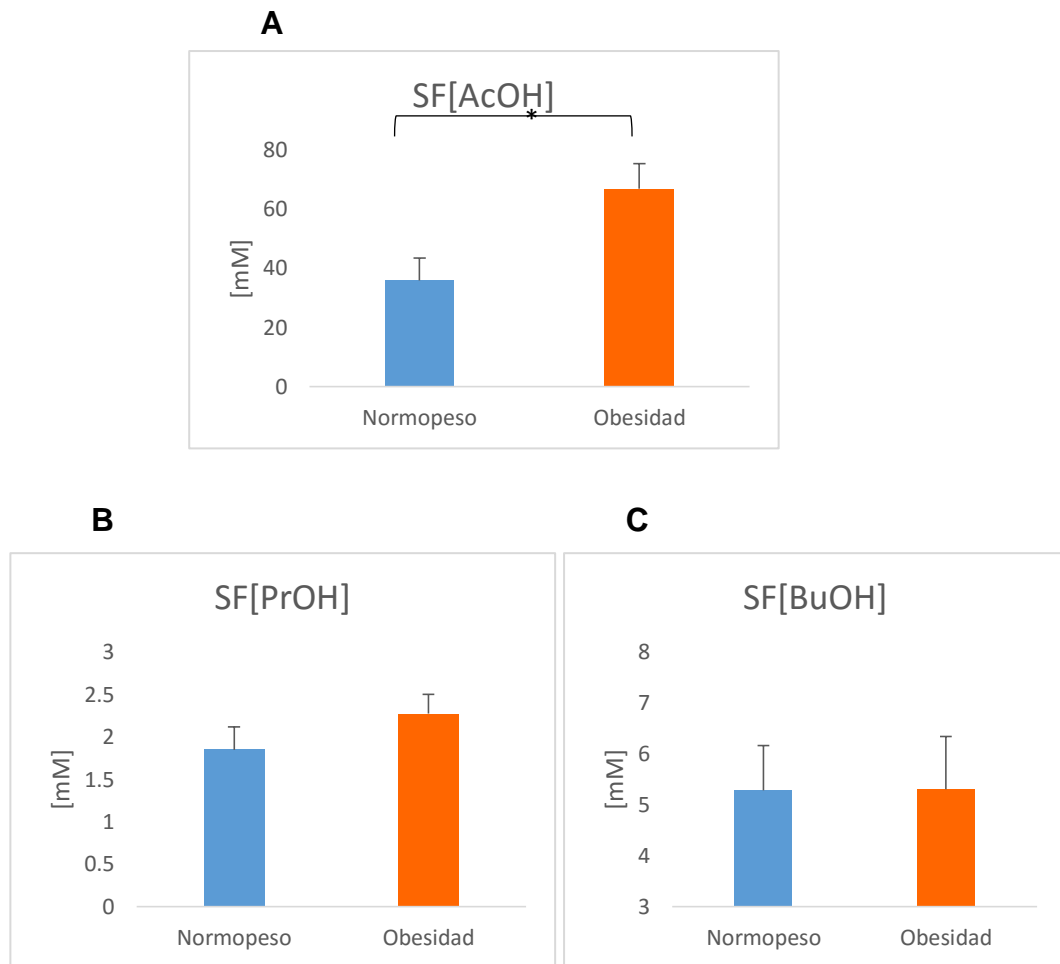


Fig. 15 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por medio de HPLC, para muestras sin procesar en fermentómetro (SF). A. [AcOH], B. [PrOH] C. [BuOH]. El grupo de obesidad representa mayor concentración de ácido acético, significativamente $p \leq 0.001$ respecto al grupo normopeso. Mientras que el ácido butírico y el propiónico no presenta una diferencia significativa entre los grupos.

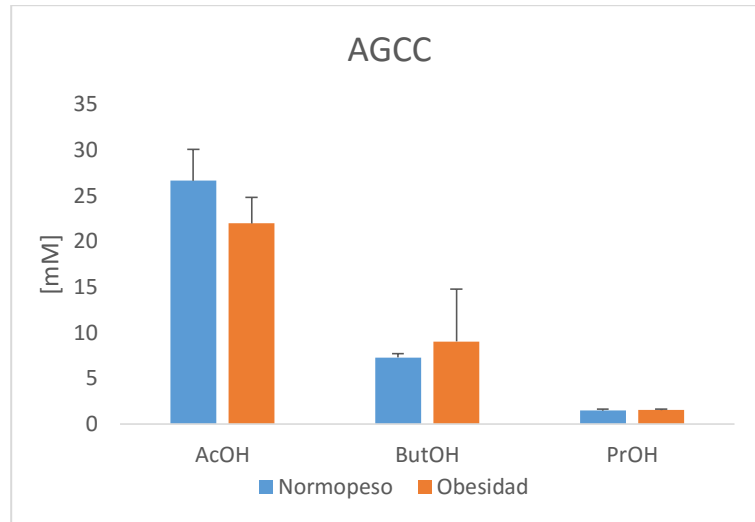
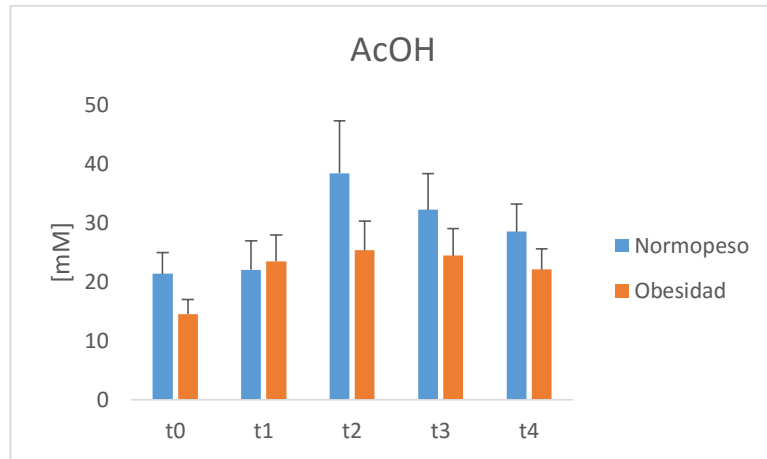
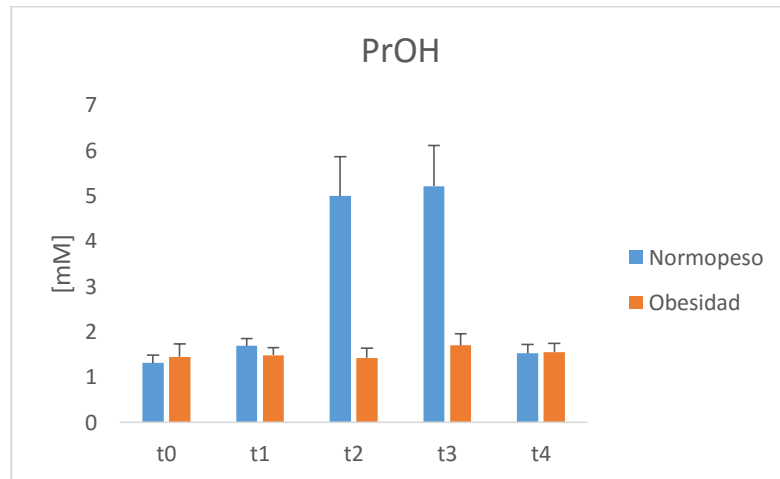


Fig. 16 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por medio de HPLC, de las muestras totales procesadas en fermentómetro para ambos grupos. Comparado entre los dos grupos, la concentración de ningún ácido graso es significativa.

A



B



C

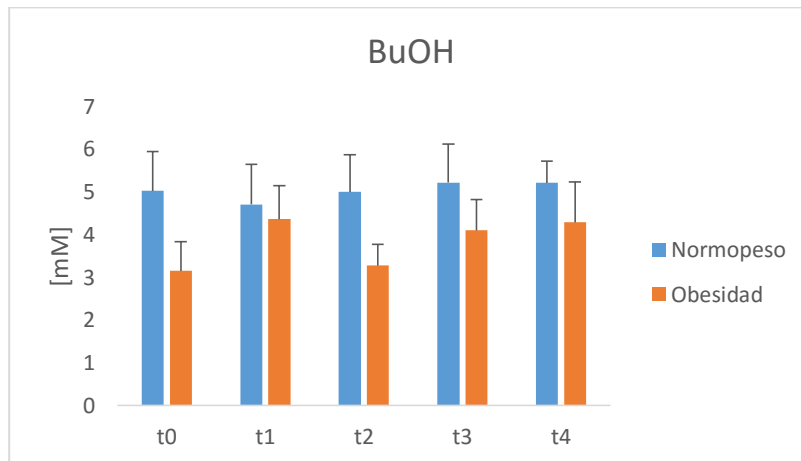


Fig. 17 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por medio de HPLC, para muestras procesadas en fermentómetro a través del tiempo para cada grupo. A. [AcOH], B. [PrOH] C. [BuOH].

IX. DISCUSIÓN

Actualmente el estudio de la capacidad fermentativa de la microbiota proveniente del colon distal de individuos, se ha tratado de elucidar a través de diferentes metodologías que van desde sistemas complejos de biorreactores hasta sólo análisis de ácidos grasos de cadena corta de muestras fecales, sin embargo no es tarea fácil por la complejidad que el mismo colon presenta y las diferentes funciones e interacciones que lleva a cabo. El interés tan grande de estudiar esta capacidad fermentativa va relacionada a entender con mayor profundidad si los principales metabolitos de la microbiota del colon, los ácidos grasos, están directamente relacionados con el acumulo extra de grasa en el cuerpo o no, porque como se mencionó en el marco teórico, la síntesis de estos ácidos grasos puede ir a síntesis de Novo de glucosa y triglicéridos (Murugesan *et al.*, 2015).

Sin embargo los AGCC no solo están relacionados de manera negativa, ya que estos también presentan beneficios a la salud, como ejemplo el ácido butírico que se ha descrito como preventivo de cáncer de colon, ya que es consumido principalmente por los colonocitos que habitan la pared epitelial de éste generando baja inflamación en el colon (Załęski *et al.*, 2013).

Con el desarrollo del modelo de fermentómetro se pretendía diferenciar con un sistema sencillo y rápido la capacidad fermentativa entre dos grupos, por lo que el cambio de pH sería un primer indicio de que se está llevando a cabo fermentación de un sustrato suministrado. Por lo tanto al probar por 4 horas, el pH cambio de 7 a 5 aproximadamente, sin embargo esta disminución no fue igual en todos los individuos, y por tal motivo al hacer la media de todas las muestras de ambos grupos, la disminución de éste no fue significativa para el grupo de obesidad como se esperaba. Esto pudo haber ocurrido por la dieta en particular a la que está acostumbrado cada individuo, y por ende cada microbiota. En aquellos que el pH disminuyó más durante este tiempo es probable que las bacterias estén más acostumbradas al consumo de fibra como la inulina con respecto a los que no disminuyeron con la misma velocidad.

Sorpresivamente los resultados de la secuenciación demuestran que los controles (grupo normopeso) tienen mayor porcentaje del phylum Firmicutes en comparación con los casos (obesidad) firmicutes 81.97% para normopeso y 53.87% para obesidad.

Lo cual podría estar ocurriendo porque el sustrato inulina está seleccionando este phylum. Además de que se ha relacionado que un consumo elevado en grasas y proteínas animales, genera una prevalencia de Bacteroides (Schwiertz, 2016). Así mismo se han descrito 3 tipos generales de dieta que determinan un tipo específico de población microbiana (Schwiertz, 2016). El tipo uno está relacionado con una dieta omnívora basado en granos, frutas, vegetales y carne. Este tipo está dominado por clusters de la bacteria Clostridium, las cuales en su mayoría producen butirato, y especialmente el número de Faecalibacterium es alto en este tipo de dieta.

El tipo dos está relacionado a un consumo alto en fibra con muy poca cantidad de productos animales, encontrando que este tipo está dominado por Prevotella y Dialister-Veillonella, las cuales son miembros de un cluster de Clostridium, especialmente rumminococci.

El tipo tres está relacionado al consumo alto en grasas y proteínas animales. Este tipo está dominado por Bacteroides y niveles altos de clusters Clostridium Faecalibacterium y clusters de Clostridium XIVa Ruminococcus gnavus. Por lo tanto esto podría ser una explicación del porque en los controles están en mayor proporción los Firmicutes en comparación con los Bacteroidetes, ya que estos individuos pudieran consumir más la dieta tipo uno y los individuos con obesidad la dieta tipo tres. Con lo cual las bacterias presentes ya están acostumbradas a una fermentación eficiente o no de fibras como en este caso la inulina. Además de que la abundancia de los mismos phylum desde el principio estará en diferente razón, como se observa en la figura 9 y 11, el porcentaje de Bacteroidetes para los casos normopeso está en menor proporción con respecto a los casos de obesidad y para ambos el porcentaje permanece relativamente constante a través del tiempo.

Los géneros, *Blautia*, *Coprococcus*, *Lachnobacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, o_Clostridiales y f__Lachnospiraceae fueron significativos para el grupo normopeso, y todos estos géneros pertenecen al phylum de Firmicutes, lo cual se relaciona con el mayor porcentaje de estos en las gráficas de abundancia relativa. Lo que demuestra que el sustrato inulina está favoreciendo este phylum, que a su vez está relacionado con que se haya observado una mayor concentración de ácido butírico con respecto al ácido propiónico a través del tiempo. Esto se puede entender porque el género *Faecalibacterium*, es el principal Firmicute anaerobio productor del ácido butírico. *Coprococcus* también está relacionada con la producción de butirato, pero a partir de acetato y lactato. (Schwiertz, 2016). Lo que también comprueba que el fermentómetro permite mantener condiciones de anaerobiosis básica para que estos phylum puedan crecer. También se ha observado que nivel más bajos de lo usual en *Faecalibacterium Prausnitzii*, está relacionado con la obesidad, y con la enfermedad de Crohn (Schwiertz, 2016). En el estudio de Ramirez-Fariaset *al.*, 2009, también se demostró que el tratamiento con inulina favoreció a al género bifidobacteria como a *F. prausnitzii* en de las muestras de heces, en sujetos sanos.

Los Bacteroidetes son los principales productores del ácido acético y en menor producción del ácido propiónico, por tal motivo se pudo observar una concentración significativa de éste en los individuos con obesidad con respecto a los normopeso y a su vez en estos individuos (obesidad) en las gráficas de abundancia relativa se observa un mayor porcentaje de Bacteroidetes.

A través del tiempo específicamente en los tiempos 2 y 3 (figura 18A) la producción de ácido acético aumento para el caso de los controles, sin embargo este aumento no es significativo, valor de $p \geq 0.05$. A su vez se puede relacionar que la concentración fue constante porque también las poblaciones así se mantuvieron.

X. CONCLUSIONES

Con el modelo de fermentómetro se pudo observar un cambio en la producción de los ácidos grasos de cadena corta, que si bien no fue significativo entre los grupos analizados, como se planteó en la hipótesis, sirvió para demostrar como un sustrato en corto tiempo puede comenzar a seleccionar un tipo de phylum, sin embargo esta selección también dependerá de la composición inicial que tenga cada individuo como se pudo observar en las gráficas de abundancia relativa a nivel de phylum.

El cambio en la producción de ácidos grasos pudo haber sido significativo en caso de haber alargado el tiempo de fermentación, sin embargo no se realizó de esta forma dado que en la estandarización mediante los índices de diversidad relativa, a través del tiempo indicaron que con el paso de éste se generaba una disbiosis, con lo que ya no se estaría analizando el inóculo inicial, sino un tipo específico de bacterias a partir del sustrato dado. Lo más relevante es que con el modelo se pudo observar y relacionar el aumento en la producción de butirato con el phylum Firmicutes y el fenotipo de normopeso a través del tiempo (figura 17C).

El desarrollo de la obtención del consorcio bacteriano fecal, es una técnica que permite analizar el desempeño de la microbiota a nivel metabólico de una manera más precisa, y facilita la amplificación de los productos de PCR, ya que ésta elimina gran parte de los restos de materia orgánica que pudiera estar interfiriendo en una buena amplificación.

También es útil para analizar de manera rápida, y barata que tipos de microorganismos se están viendo beneficiados dependiendo de que sustrato, y así generar una dieta mejor balanceada, rica en diferentes fibras para desarrollar una alta diversidad microbiana, ya que el principal factor para el desarrollo de diferentes patologías se encuentra en la poca diversidad bacteriana (Adamberg *et al.*, 2015). Porque si bien es cierto que los AGCC son una fuente más de energía para el cuerpo, no sólo serán almacenados, sino gran parte será absorbida principalmente por las células epiteliales y a su vez serán precursores de síntesis de otras moléculas benéficas para la salud.

Esta falta de diversidad y abundancia principalmente se puede observar en que las bacterias que fueron significativas todas tuvieron mayor abundancia para los normopeso y no para los casos de obesidad, y estas bacterias en general son benéficas para la salud. Por tal motivo un simple cambio de dieta más diversa y el aumento en diferentes fibras insolubles sería de gran ayuda para comenzar a combatir la obesidad que día a día va deteriorando la calidad de vida de los individuos que la padecen. Una microbiota sana es importante para mantener un hospedero sano, ya que una microbiota aberrante lentamente podrá causar enfermedades de diferente naturaleza.

XI. PERSPECTIVAS

- Realizar las mismas pruebas con diferentes sustratos como almidón o algún xilano, combinados y por separado.
- Ampliar el tiempo de corrida en el fermentómetro al menos a 6 horas.
- Realizar las mismas pruebas pero combinando la muestra de todos los individuos por grupos.
- Mejorar la generación de ambiente anaeróbico.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaraz, L. D., Martínez-Sánchez, S., Torres, I., Ibarra-Laclette, E., & Herrera-Estrella, L. (2016). The metagenome of *utricularia gibba*'s traps: Into the microbial input to a carnivorous plant. *PLoS ONE*, *11*(2), 1–21. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148979>
- Barrera-cruz, A., Molina-ayala, M. A., & Rodríguez-gonzález, A. (2013). Escenario actual de la obesidad en México. *Revista Medica Instituto de Mexico*, *51*(3), 292–299.
- Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, *157*(1), 121–41. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
- CTC. (2004). Fermentación oscura. *AGRO WASTE*. Retrieved from <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/FERMENTACION-OSCURA.pdf>
- Das, D., & Veziroglu, T. N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*(21), 6046–6057. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>
- Ixchel Estrada-Velasco, B., Cruz, M., García-Mena, J., Salgado, A. V., Peralta Romero, J., De Los Remedios, M., ... Burguete-García, A. I. (2015). La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutr Hosp. Nutr Hosp*, *31*(3), 1074–1081. <http://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8302>
- Merriman, B., Torrent, I., & Rothberg, J. M. (2012). Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, *33*(23), 3397–3417. <http://doi.org/10.1002/elps.201200424>
- Murugesan, S., Ulloa-Martínez, M., Martínez-Rojano, H., Galván-Rodríguez, F. M., Miranda-Brito, C., Romano, M. C., ... García-Mena, J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.1007/s10096-015-2355-4>
- Scheppach, W. (1996). Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Digestive Diseases and Sciences*, *41*(11), 2254–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943981>
- Schwartz, A. (2016). *Microbiota of the Human Body* (Vol. 902). <http://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4>
- Szumulowicz, U. (2011). *Colonic physiology*. Retrieved from [file:///C:/Users/Dany/Desktop/DRJGM/Colonic Physiology.pdf](file:///C:/Users/Dany/Desktop/DRJGM/Colonic%20Physiology.pdf)
- Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P., & Colombel, J. F. (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, *53*(1), 1–4. <http://doi.org/10.1136/gut.2007.134668>
- Whelan, K., Judd, P. A., Preedy, V. R., & Taylor, M. A. (2004). Enteral feeding: the effect on faecal output, the faecal microflora and SCFA

- concentrations. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 63(1), 105–113. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099408>
- Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., & Jenkins, D. J. a. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235–243. <http://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>
- Załęski, A., Banaszekiewicz, A., & Walkowiak, J. (2013). Butyric acid in irritable bowel syndrome. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 8(6), 350–353. <http://doi.org/10.5114/pg.2013.39917>
- Zihler Berner, A., Fuentes, S., Dostal, A., Payne, A. N., Vazquez Gutierrez, P., Chassard, C., ... Lacroix, C. (2013). Novel Polyfermentor intestinal model (PolyFermS) for controlled ecological studies: validation and effect of pH. *PloS One*, 8(10), e77772. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077772>

XIII. APÉNDICES

APÉNDICE A. Instructivo para toma de muestra

Instrucciones para toma de muestra de heces en el baño de su casa

- Debe proveérsele un **recipiente limpio** para coleccionar la muestra y una **palita** (en caso de requerir un cómodo hospitalario, solicítelo a su médico).
- Para la recolección de la muestra se requiere **plástico para envolver** (del transparente empleado en la cocina) en caso de no contar con él puede utilizar un **cómodo hospitalario** provisto previamente.
- Tome la muestra de heces un día antes a su siguiente cita



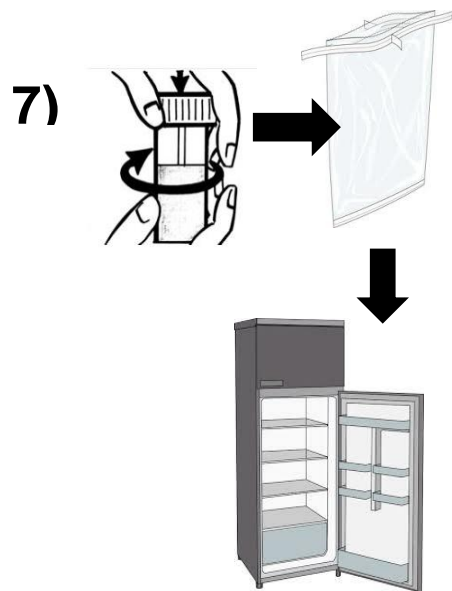
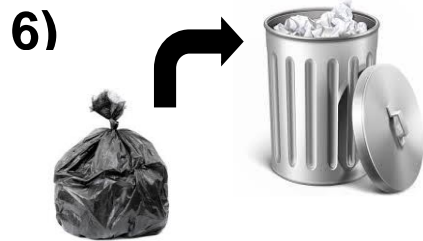
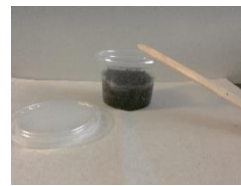
Las heces contienen material que propaga enfermedades por ello **lave sus manos antes y después** del procedimiento.

Indicaciones:

- 1) Rotule el frasco con su nombre
- 2) Orine **previamente** en otro lado antes de coleccionar la muestra de heces. **Evite** orinar durante su evacuación para no contaminar la muestra de heces con orina.
- 3) Levante la tapa y el asiento del baño y cubra la taza con 2 pedazos largos del plástico envolvente, dejando ligeramente hundido en el centro, baje el asiento para asegurar el plástico.
- 4) Evacúe sobre el plástico.
Alternativamente, puede evacuar directamente sobre el frasco o utilizando el cómodo hospitalario limpio previamente colocado encima de una silla o taza del baño.
- 5) Coloque su muestra directamente del plástico (o del cómodo) dentro del recipiente para muestra utilizando la palita **sin importar el tipo de consistencia** que tenga.
Llene el frasco aproximadamente a la mitad de su capacidad y cierre con firmeza.
Evite que las heces tengan contacto con agua, papel o jabón.
- 6) Retire el plástico de la taza del baño y haga un nudo en la parte superior para desecharlo en el bote de basura. Si utilizó cómodo hospitalario, retire las heces con papel y proceda a lavarlo con agua y jabón.
- 7) Lave sus manos. Coloque el recipiente en una bolsa de plástico y manténganlo en **refrigeración** máximo 24 horas antes de su siguiente cita.



O BIEN USE:



APÉNDICE B. Consentimiento Informado

Título del proyecto:

“CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LA MICROBIOTA DEL COLON DISTAL DE INDIVIDUOS MEXICANOS CON OBESIDAD POR ANÁLISIS METABÓLICO EN MODELO DE FERMENTÓMETRO”

Investigador Principal:

DR. JAIME GARCÍA MENA
igmena@cinvestav.mx

Le estamos invitando a participar en un estudio que es realizado por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco. El objetivo es conocer la diversidad de los microorganismos que habitan en el colon de adultos con diferentes estados nutricionales, como normopeso y obesidad, y determinar si existen diferencias entre ellos. En este estudio no se le realizará ningún tratamiento médico ni nutricional.

Si usted acepta participar, le solicitaremos nos pueda proporcionar material fecal, la cual puede recolectar con un kit que le daremos. Este estudio nos permitirá avanzar en el conocimiento de las características de la población mexicana de acuerdo a su estado nutricional, lo cual nos ayudará en un futuro a darles un tratamiento integral a las personas con obesidad que incluya medidas preventivas. La participación es absolutamente voluntaria.

PROCEDIMIENTOS DEL PROTOCOLO DE ESTUDIO

Si usted acepta participar se analizará una muestra de materia fecal. La muestra se transportará hasta las instalaciones del Laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco, en donde será procesada para la determinación de los microorganismos que habitan estas localizaciones anatómicas.

RESPONSABILIDADES DEL PACIENTE

Al aceptar participar en el estudio, se compromete a lo siguiente:

1. Brindar datos verdaderos acerca de su edad, talla, peso y si tiene algún padecimiento en el que esté siendo tratado.
2. Permitir que su muestra sea procesada en Laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco.

Si su muestra no se encuentra en condiciones necesarias para realizar las pruebas para este estudio o si usted retira su consentimiento, se finalizará su participación en el mismo.

RIESGOS Y MALESTAR ESPERABLES

Al participar en este estudio NO TIENE NINGÚN RIESGO, y su participación no interferirá en su estilo de vida ni costumbres.

BENEFICIOS

Los resultados del presente estudio contribuirán a estudiar y desarrollar nuevas terapias preventivas para la obesidad, uno de los principales problemas de salud de nuestro país. El beneficio personal que obtendrá será el conocer la diversidad de los microorganismos que habitan su colon y si estos están relacionados con un aumento de peso patológico o se encuentran dentro del perfil considerado como sano en la actualidad.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

Usted no recibirá ningún pago por donar su muestra, entendemos esto como un regalo de su parte a la investigación. Las muestras se utilizarán exclusivamente para los fines de investigación.

CONFIDENCIALIDAD

En ningún momento se conocerá su nombre, ya que a las muestras se les asignará una clave. LA INFORMACIÓN QUE SE OBTENGA DE LAS MUESTRAS SERÁ Estrictamente CONFIDENCIAL.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y RETIRO DEL CONSENTIMIENTO

Usted es libre de escoger donar o no su muestra, la donación es voluntaria. En caso de que después de haber aceptado la donación cambie de opinión, la muestra se destruirá. En caso de haber realizado alguna investigación y si existen resultados sobre la muestra antes de que haya cambiado de opinión, estos datos si serán utilizados.

PREGUNTAS

Es posible que existan palabras técnicas que no entiende en este documento. Por favor pregunte todo lo que no entiende y tome su tiempo para decidir hacer la donación de la muestra.

Si antes o durante su participación en este estudio, usted tiene alguna pregunta puede contactar al Dr. Jaime García Mena al 5747 3800 Ext. 5327, correo electrónico: jgmena@cinvestav.mx del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco.

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE

He leído la información que se me ha dado para participar en la CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LA MICROBIOTA DEL COLON DISTAL DE INDIVIDUOS MEXICANOS CON OBESIDAD POR ANÁLISIS METABÓLICO EN MODELO DE FERMENTÓMETRO. El propósito general y mi participación en particular han sido explicadas, al igual que los posibles riesgos. Al firmar este documento, doy permiso para usar mi muestra para los fines que el documento describe. Al firmar este documento no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

Nombre completo del paciente: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma:

APÉNDICE C. Tabla de Barcodes para secuenciación masiva
semiconductora de iones

NAME OF PRIMER	ION TORRENT LINKER	GOLAY BARCODE	SPACER	16S rRNA Primer (5'-3')
V3-341 F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GATCTGCGATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGCTCATCAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAACAACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCAACACCATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCGATATATCGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGCAATCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCGTGCACAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GTATCTGCGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGGGAAGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAATTCGGGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATTGACCAAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTTACGAGCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCATATGCACTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAACTCCCCTGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGCGTTAGCAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGAGCCCTAA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CACTACGCTAGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGCAGTCCTCGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCATAGCTCCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGGACATCTCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAACACTTTGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAGCCATCTGTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGGGTACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGGCGCTCCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAATACGGATCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGGAATTAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGTGAATTCGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CATTCTGTCGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACGCACGCTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACTGTTTCATG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGACGATGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCTCATGGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCACGGTATG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACCGTCAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCACGAGCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGACCACTCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGCGACTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGATCGTCAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCTTGACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACTGTGCGTAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCGCAGAGTCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGTGAGTGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGATTGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACTGCGTACT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCAGTCGCGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGACGACTGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F47	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGAGATGTCGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F48	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGCAGTGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F49	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTAAGTCTAGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F50	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGCACAGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-518 R FULL	CCACTACGCCTCCGCTTCTCTATGGGAGTCGGTGTAT	NOT APPLICABLE	CC	ATTACCGCGGCTGCTGG

APÉNDICE D. Protocolos

*Protocolo de medio mínimo M9

Esterilizar 15min a 15lb (121°C)

Para 300ml totales:

- 270ml de H₂O destilada estéril
- 30ml de sales M9 10X
- 0.612ml de MgSO₄ 1M
- 0.396ml de CaCl₂ 1M
- Fuente de carbón 1% almidón o inulina

Preparación de las sales M9 10X:

- Na₂HPO₄ 60g
- KH₂PO₄ 30g
- NaCl 10g
- NH₄Cl 10g

Aforar a 1lt con agua destilada y estéril.

Para preparar 300ml de medio mínimo M9 enriquecido con inulina o almidón al 1%

- 150ml de almidón
- 0.612ml de MgSO₄ 1M
- 0.396ml de CaCl₂ 1M
- 30ml de sales M9 a 1X
- 120ml de H₂O destilada estéril

**Protocolo para el indicador de pH púrpura de bromocresol

Se usa 0.025g de púrpura de bromocresol para 1lt de algún medio, por lo tanto para preparar 50ml se usará:

0.025g \longrightarrow 1000ml

50ml = **0.005g de bromocresol**

La concentración a la que está el reactivo es de 0.04 wt % H₂O, por lo tanto:

$V_{\text{bromocresol}} = (0.0005\text{g}) (16\text{ml}) / (0.04\text{g}) = 0.2\text{ml} = \mathbf{200\mu\text{l}}$ de **bromocresol** en 16ml de medio M9 enriquecido con inulina o almidón.

*****Protocolo de extracción de ADN de muestra de heces con AquaStool:**

Relación para cantidad de copro/reactivo

El protocolo establece agregar por cada 1g/10ml de AquaStool

-Se colocará 0.1g copro/10 ml de medio M9/inulina

Por lo tanto: 100mg de copro por cada 10ml de M9/inulina

10mg copro/1ml de medio

20mg copro/2ml de medio (tubo eppendorf)

1000mg → 10ml Aqua Stool

20mg → **0.2ml** → **200µl de AquaStool**

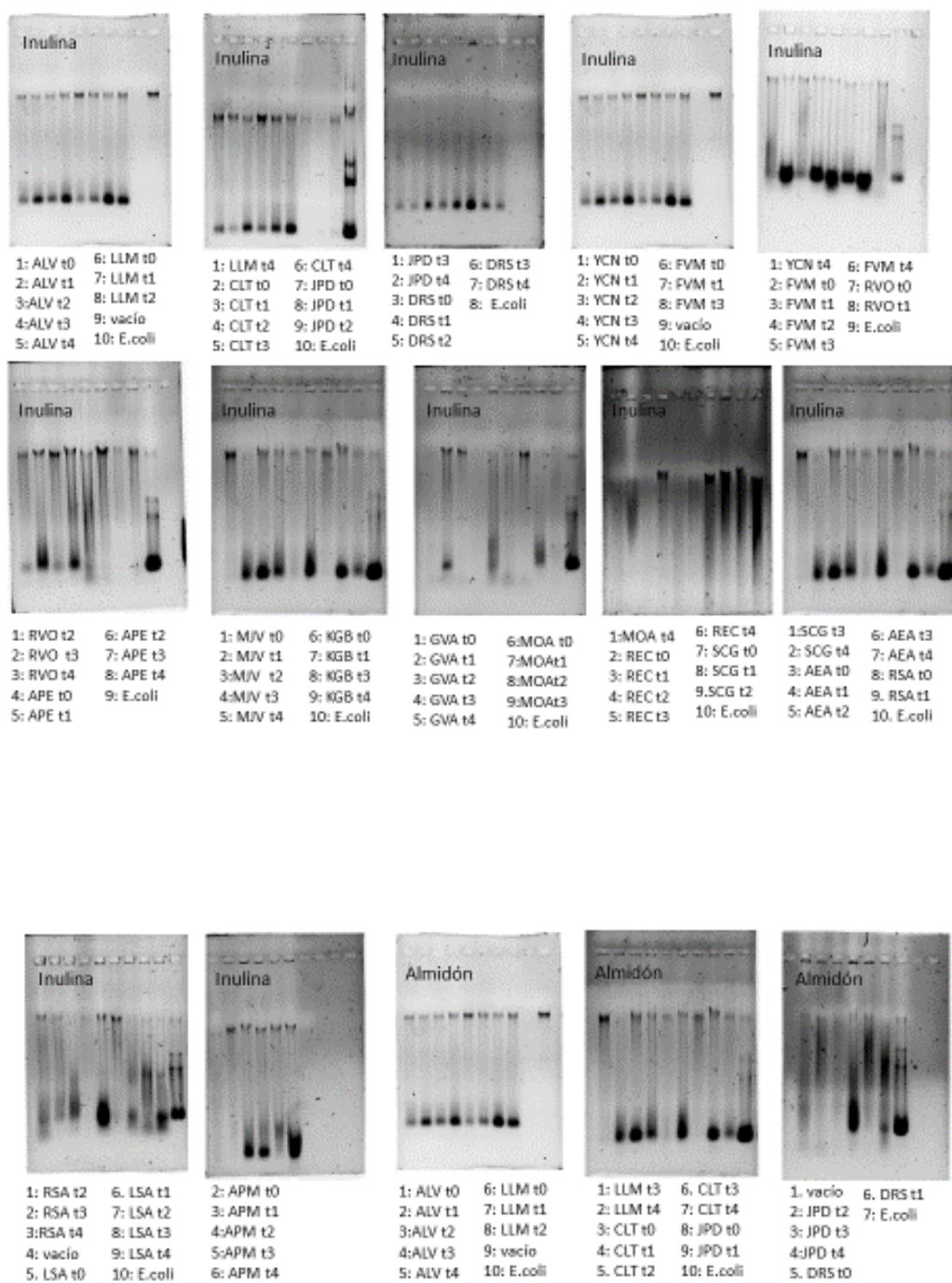
- 1.-Centrifugar 5min a máxima velocidad para generar el pellet de bacterias, desechar el sobrenadante.
- 2.- Agregar al pellet 200µl de AquaStool
- 3.- Homogenizar por 1min.
- 4.-Agregar la mitad de una tapa de tubo de PCR de arena y vortex 1min.
- 5.-Incubar 15min, a 65°C.
- 6.- Vortex por 1min.
- 7.- Centrifugar a máxima velocidad por 5 min. Recuperar sobrenadante 0.4ml=400µl (rotular tubo eppendorf).
- 8.- Agregar isopropanol =0.28ml=280µl. Relación de isopropanol 0.7 volúmenes de muestra.
- 9.- Vortex 1 min y centrifugar por 5 min a máxima velocidad.
- 10.-Desechar el sobrenadante y recuperar el pellet.
- 11.-Lavar con etanol al 70%=300µl (3 veces)
- 12.- Dejar secar el etanol por 10min.
- 13.-Resuspender en 200µl de agua PCR desionizada.
- 14.-Incubar 15min a 22°C.
- 15.- Centrifugar a máxima velocidad por 5 min.
- 16.-Recuperar el sobrenadante y congelar a -20°C.

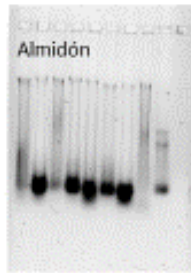
******Protocolo para medir [AGCC] por HPLC**

Del sobrenadante que se recupera después de cada hora de los tubos que están en la incubadora:

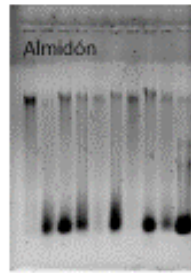
Se debe tomar 1.5ml de la suspensión de la alícuota, la cual se deberá centrifugar a 15,800gx durante 5 min, el pH ajustado a 6.0 con 0.1 M HCl. La solución se filtra a través de columnas C-18 max Grace Pure Reversed-Phase SPE. Los ácidos grasos son eluidos usando etanol absoluto. Los extractos son analizados por medio de cromatografía HPLC utilizando 0.1 M glicina con ácido clorhídrico como fase móvil y. Se establecerá una curva para cada ácido.

APÉNDICE E. Geles de extracción de ácidos nucleicos

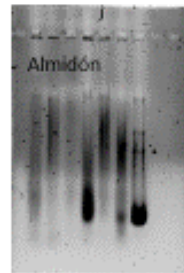




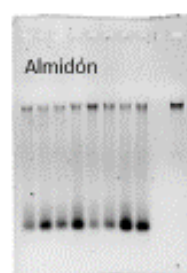
1: YCN t0 6: FVM t0
2: YCN t1 7: FVM t1
3: YCN t2 8: FVM t3
4: YCN t3 9: vacío
5: YCN t4 10: E.coli



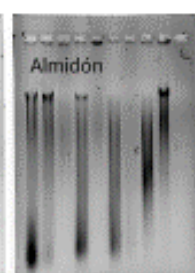
1: FVM t4 6: RVO t4
2: RVO t0 7: APE t0
3: RVO t1 8: APE t1
4: RVO t2 9: APE t2
5: RVO t3 10: E.coli



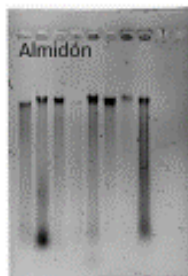
1: vacío 6: MIV t3
2: APE t3 7: MIV t4
3: APE t4 8: E.coli
4: MIV t0
5: MIV t1



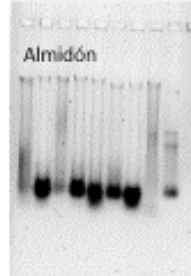
1: KGB t0 6: GVA t0
2: KGB t1 7: GVA t1
3: KGB t2 8: GVA t2
4: KGB t3 9: vacío
5: KGB t4 10: E.coli



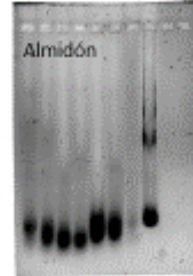
1: GVA t3 6: MOA t3
2: GVA t4 7: vacío
3: MOA t0 8: MOA t4
4: MOA t1 9: E.coli
5: MOA t2



1: REC t0 6: SCG t0
2: REC t1 7: SCG t1
3: REC t2 8: E.coli
4: REC t3
5: REC t4

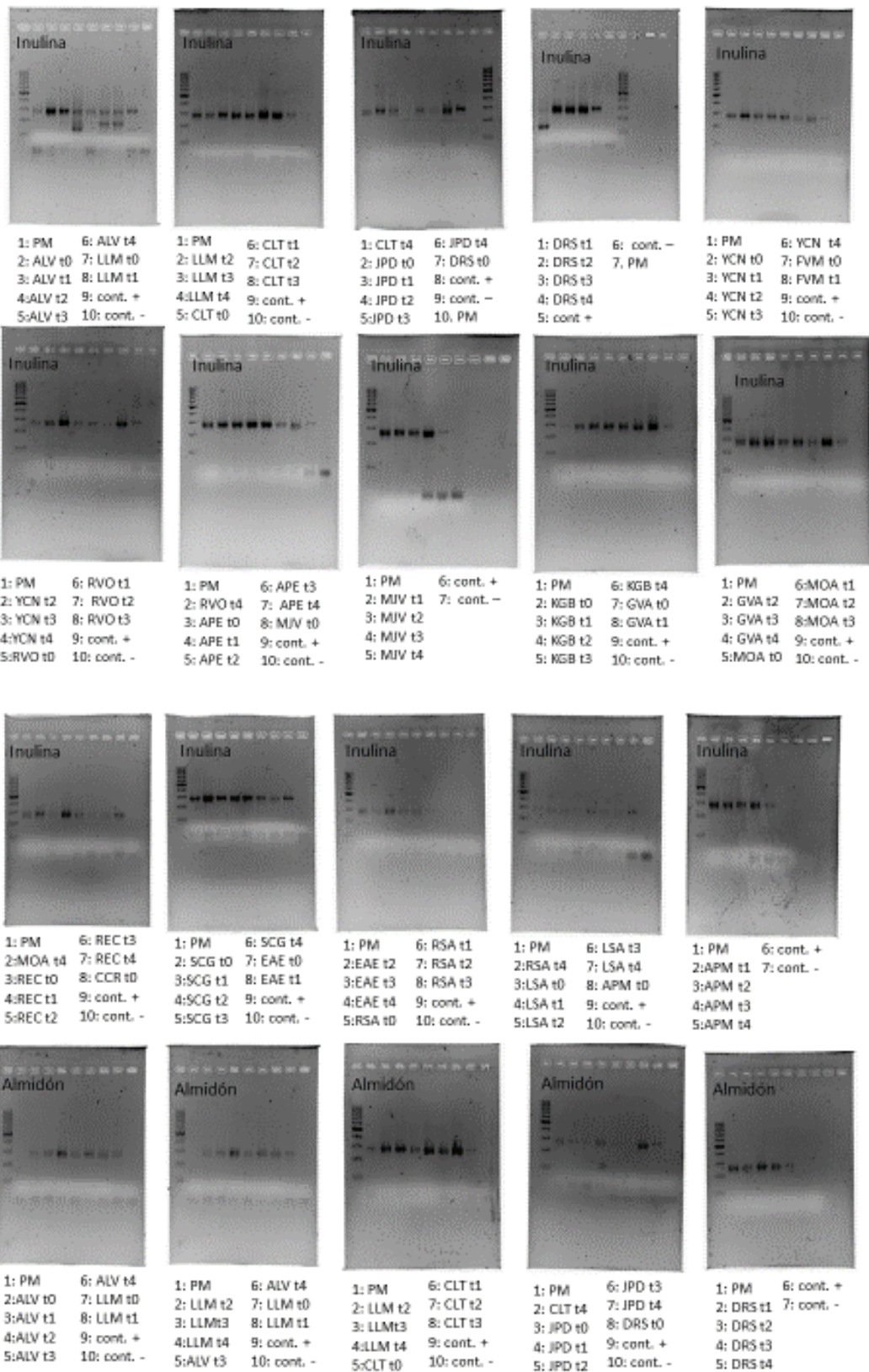


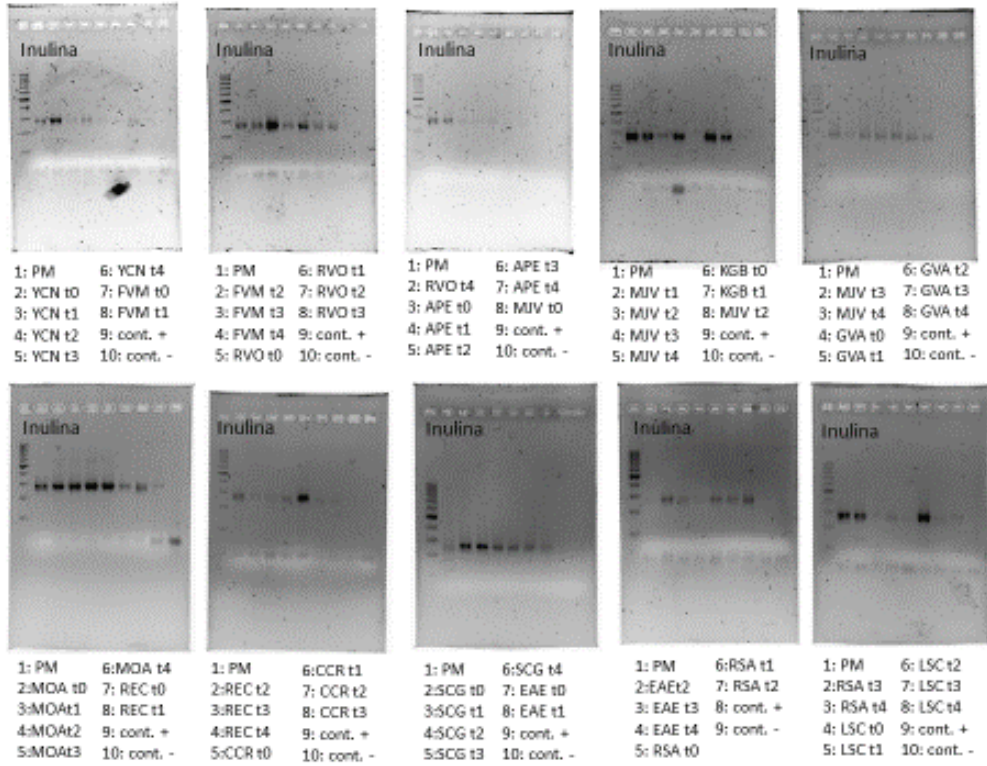
1: SCG t2 6: AEA t2
2: SCG t3 7: AEA t3
3: SCG t4 8: AEA t4
4: AEA t0 9: E.coli
5: AEA t1



1: RSA t0
2: RSA t1
3: RSA t2
4: RSA t3
5: RSA t4

APÉNDICE F. Geles analíticos de PCR





--fin de texto--