



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Influencia del consumo moderado de cerveza sobre la salud a través de la
funcionalidad del bioma microbiano del tracto digestivo”**

Tesis que presenta:

QFB. Fernando Hernández Quiroz

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis

Dr. Jaime García Mena

Ciudad de México

Agosto 2017

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. 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 Ing. Linda Zuleyma Quijano por su apoyo administrativo.

Para la realización de este trabajo se recibió apoyo del Cinvestav, CONACyT 163235 INFR-2011-01 y del Premio Fomento a la Investigación 2015, otorgado por el Consejo de Investigación sobre Salud y Cerveza de México, A. C.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se recibió apoyo del Cinvestav, CONACyT 163235 INFR-2011-01 y del Premio Fomento a la Investigación 2015, otorgado por el Consejo de Investigación sobre Salud y Cerveza de México, A. C.

A los miembros de mi comité tutorial:

- Dr. Bulmaro Cisneros Vega por su apoyo como parte del comité tutorial.
- Dr. Carlos Hoyo Vadillo por facilitarme los reactivos y equipos de su laboratorio.
- Dr. Jaime García Mena por aceptarme en su equipo de trabajo y brindarme su tutoría y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada durante el transcurso de la maestría (CVU: 705105).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Estoy muy agradecido con mis compañeros del laboratorio cero: el Dr. Jaime por su apoyo y confianza brindadas, Alberto por su apoyo en la secuenciación y dudas, Rodrigo por su apoyo con el material del laboratorio, Selva por su apoyo en el trabajo experimental y redacción de textos, Noé por los buenos ratos que hemos pasado tomando cervezas, Daniela por las buenas bromas (por cierto, ¡muchas gracias Dany), Daniel por el apoyo con el HPLC de diodos, Kari por el “bully” a todo lo que da en el laboratorio y su apoyo durante la ejecución del proyecto, Khem por la buena comida y su apoyo en él trabajo, Samuel por escuchar, Alejandra por su apoyo y buena comida, Marcos por su asesoría tanto en trabajo como cosas de “gamers”, Fernandito por los momentos chidos, Dayana por los ratos que salimos a pasear, Loan por su asesoría en los análisis bioinformáticos junto con Khem, Brenda y Karina (lote 2) por su buen sentido del humor en memes y videojuegos, Aida por los buenos ratos y bromas. En general un agradecimiento muy grande para todos los del laboratorio cero por su apoyo durante el proyecto de cerveza, y no sólo eso, sino también por las excusas y pretextos para convivir, aunque sea un momento y alegrarnos el día.

Un agradecimiento a mis compañeros de maestría: Noé el primero que conocí, desde el primer día del propedéutico y su típica frase “No, sí, quien sabe, a lo mejor”, por su apoyo moral, Karlita, por los paseos, idas a comer y por los buenos ratos que pasamos, Cafeína por esos buenos momentos con un buen café o cerveza, Carlos, por las buenas bromas y comentarios fuera de lugar que hacemos, Gerson por esa carne asada, amistad y buenos consejos, Ulises por los buenos ratos y bromas. Y en general por los buenos momentos que pasamos cuando nos juntamos.

Sin olvidar a los “Gremlins” (Berenice, Deyanira, Fedra, Monse y Jaime), que compartimos buenos ratos durante la comida y el trabajo.

Finalmente el más importante de todos, a Dios, por darme las fuerzas y lo que siempre necesito en su justo momento, sobre todo por la vida, guía y una gran familia que he aprendido a ser quien soy; unos excelentes padres: Brígido

Hernández Ramírez (trabajo duro) y María Quiroz Muñoz (responsabilidad), buenos hermanos, Hipolito (perseverancia), Jesús (generosidad), Martín (observación) y José Guadalupe (sentido del humor); Hermanas: Juana (respeto), Leticia (sinceridad), Ana María (paciencia), María de los Ángeles (organización) y Graciela (razonamiento lógico matemático) y unos muy agradables sobrinos (21) que no menciono, ya que necesitaría otra tesis para eso.

También agradecimeintos especiales a la secretaria Gabriela Mora Macías, la cual me apoyo asesorándome durante la maestría en todos los tramites que realicé.

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT2	Diabetes tipo 2
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
H	Hora
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HGM	Hemoglobina globular media
LDL	Lipoproteína de baja densidad
HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humana
Homa/IR	Homeostatic model assessment/ Insulin resistance
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IL	Interleucina
ICC	Índice cintura cadera
IMC	Índice de masa corporal
LEfSe	Linear discriminant analysis effect size
LPS	Lipopolisacáridos
MaAsLin	Multivariate Association with Linear Models
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
Mg	Miligramo
mL	Mililitro

mM	Milimolar
FCβ	Porcentaje de células beta funcionales
PICRUSt	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Polisacárido A
RDW	Red blood cell distribution
TLR	Receptor tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias
VLDL	Lipoproteína de muy baja desidad
VSG	Velocidad de sedimentación globular
VGM	Volumen globular medio
VPM	Volumen plaquetario medio

Índice de figuras

Figura 1	Proceso de elaboración de cerveza	6
Figura 2	Materia prima usada en la elaboración de cerveza	7
Figura 3	Estructura de los compuestos polifenólicos en la cerveza	8
Figura 4	Representación esquemática de los microorganismos que habitan el ser humano	10
Figura 5	La microbiota es dinámica a lo largo de la vida del ser humano	11
Figura 6	Representación esquemática de las principales vías metabólicas de una dieta basada poli- y oligosacáridos en el ecosistema intestinal	13
Figura 7	Diagrama esquemático de las vías de señalización que son desencadenadas por los componentes bacterianos para activar la respuesta innata del sistema inmune	14
Figura 8	Esquema del metabolismo por la microbiota cuando se tiene una dieta con alto contenido energético	15
Figura 9.	Parámetros bioquímicos modificados por el consumo de cerveza.	28
Figura 10	Esquema de la región del gen 16S ribosomal amplificada	31
Figura 11	Gel de agarosa al 0.5 % para DNA genómico y gel de agarosa al 2 % para productos de PCR de la región V3 del gen 16S ribosomal con barcodes.	32
Figura 12	Abundancia relativa por <i>phylum</i> de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol por grupo.	32
Figura 13	Abundancia relativa por <i>phylum</i> de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol por género.	33
Figura 14	Abundancia relativa por género bacteriano de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol por grupo.	34
Figura 15	Abundancia relativa por género bacteriano de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol en género femenino.	35
Figura 16	Abundancia relativa por género bacteriano de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol en género masculino.	36
Figura 17	Cromatograma de estándares de AGCC.	37
Figura 18	Cuantificación de los AGCC, acetato, propionato y butirato.	38
Figura 19	Curva de calibración para xantohumol	39
Figura 20	Análisis de los componentes de cerveza.	40
Figura 21	Análisis LEfSe de las abundancias relativas y β diversidad.	42

Figura 22	Análisis LEfSe de las abundancias relativas por género (femenino).	44
Figura 23	Análisis LEfSe de las abundancias relativas por género (masculino).	46
Figura 24	Análisis de alfa diversidad de los participantes por grupo.	47
Figura 25	Análisis de alfa diversidad de los participantes por género.	48
Figura 26	Análisis MaAsLin de los participantes por grupo.	49
Figura 27	Análisis MaAsLin de los participantes por grupo.	50
Figura 28	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa.	51
Figura 29	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa.	52
Figura 30	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa.	52
Figura 31	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa.	53
Figura 32	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa.	53
Figura 33	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	54
Figura 34	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	55
Figura 35	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina indirecta.	56
Figura 36	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina indirecta.	56
Figura 37	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol.	57
Figura 38	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	58
Figura 39	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra HDL.	59
Figura 40	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra índice aterogénico.	60
Figura 41	Análisis PICRUST de las abundancias relativas de las bacterias de los 35 participantes contra tiempo (día 1, 15 y 30).	63

Índice de tablas

Tabla 1	Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA con BARCODE	22
Tabla 2	Condiciones para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA con BARCODE	22
Tabla 3	Características antropométricas y clínicas	26
Tabla 4	Biometría hemática	29
Tabla 5	Perfil hepático	29
Tabla 6	Bioquímica sanguínea	30
Tabla 7	Perfil lipídico	30
Tabla 8	Perfil de inflamación	31
Tabla 9	Bacterias con aumento en su abundancia relativa con el consumo de cerveza sin alcohol durante 30 días analizando con LEfSe	41
Tabla 10	Bacterias con aumento en su abundancia relativa en el grupo femenino que consumió una cerveza sin alcohol durante 30 días analizando con LEfSe	43
Tabla 11	Bacterias con aumento en su abundancia relativa en el grupo masculino que consumió una cerveza sin alcohol durante 30 días analizando con LEfSe	45
Tabla 12	Bacterias analizadas por MaAsLin que no se variaron significativamente durante la intervención con base al valor de p y q simultáneamente	50
Tabla 13	Bacterias analizadas por MaAsLin que no se asociaron significativamente a metadatos con base al valor de p y q simultáneamente	60

Índice

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	iii
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	iv
ABREVIATURAS	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Historia de la cerveza.....	3
1.2. Elaboración	4
1.3. Composición	6
1.4. Propiedades en relación a la salud	8
1.5. Microbiota del tracto digestivo	10
1.6. Propiedades de la microbiota del tracto digestivo en relación con la salud	11
1.7. Interacción de los componentes de la cerveza con la microbiota del tracto digestivo	16
2. ANTECEDENTES	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVO GENERAL.....	19
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
7. ALCANCE.....	20
8. METODOLOGÍA.....	20
8.1 Plan de trabajo.....	23
8.2 Diseño experimental	24
9. RESULTADOS.....	26
10. DISCUSIÓN	64
11. CONCLUSIÓN.....	66
12. BIBLIOGRAFÍA.....	67
13. ANEXOS.....	71
Anexo 1: Lista de métodos	71
Anexo 2. Tablas.....	78

Anexo 3. Figuras.	83
Anexo 4. Carta de consentimiento.....	120
Anexo 5. Carta de aviso de privacidad	123

RESUMEN

La cerveza es una bebida que ha sido consumida desde hace miles de años por diversas circunstancias, desde razones sociales hasta por razones religiosas, atribuyéndole a la cerveza que es buena para la salud. Recientemente se han caracterizado los componentes de la cerveza; los cuales son componentes polifenólicos (ácidos α , humulona e isohumulona, 8-prenilnaringenia y xantohumol principalmente), estos componentes se le atribuyen diversas actividades funcionales. Hay estudios *in vitro* donde los componentes polifenólicos derivados del té verde presentan actividad contra los Firmicutes en comparación con los Bacteroidetes; y estudios *in vivo*, han mostrado que el resveratrol del vino puede modificar la microbiota en ratones sanos. Con base en los resultados conocidos de los componentes polifenólicos este trabajo se analizó la actividad de los componentes polifenólicos presentes en la cerveza pueden modificar la composición de la microbiota intestinal cuando se consumen durante 30 días favoreciendo el desarrollo de los Bacteroidetes respecto a los Firmicutes. Además, se observó que durante la intervención con la cerveza no se modifican los valores de biometría hemática, perfil hepático, lipídico, de inflamación, valores antropométricos (peso, medida de la cintura y cadera); además, interesantemente se observó disminución de la glucosa en suero sanguíneo y aumentó el porcentaje de células β funcionales.

ABSTRACT

Beer is a drink that has been consumed for thousands of years by various circumstances, from social reasons to religious reasons, attributed to beer that is good for health. Recently the components of beer have been characterized; which are polyphenolic components (α acids humulone and isohumulone, 8-prenylnaringenin and xanthohumol mainly), these components are attributed diverse functional activities. There are *in vitro* studies in which polyphenolic components derived from green tea exhibit activity against Firmicutes compared to Bacteroidetes; And *in vivo* studies, they have found that wine resveratrol can modify the microbiota in healthy mice. Based on the known results of the polyphenolic components this work analyzed the activity of the polyphenolic components present in beer can modify the composition of the intestinal microbiota when consumed for 30 days that favor the development of Bacteroidetes with respect to Firmicutes. It was also observed that during the intervention with the beer did not change the values of hematic biometrics, hepatic profile, lipid, and inflammation, anthropometric values (weight, waist and hip measurement); in addition, it was interesting to observe a decrease in glucose in blood serum and an increase in the percentage of functional cells.

1. INTRODUCCIÓN

Según la reglamentación Técnico-Sanitaria Española, "la cerveza es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto procedente de malta de cebada, sola o mezclada con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción. La malta puede ser sustituida por cereales, granos crudos que contengan féculas, así como azúcares, siempre que las sustancias añadidas no excedan del 50% en masa de la materia prima utilizada" (Cerveceros de España, 2001).

1.1 Historia de la cerveza

El origen de la cerveza se relaciona al descubrimiento de la agricultura (alrededor del 12,000 A. C.), en esta época el hombre va dejando la cacería y se empieza a dedicar a la agricultura. Sin embargo, no se tiene información que confirme que la cerveza tuvo origen en esta época, sin embargo, un estudio reciente en cerámica encontrada en China se encontró datos de posible elaboración de cerveza entre 9,000 y 7,000 A. C. (Cabras & Higgins, 2016).

Otra evidencia de fabricación de cerveza está ligada a Mesopotamia, donde se encontraron fragmentos arqueológicos de cerámica que datan del año 6,000 A. C. También se tiene evidencia de que se dedicaban al comercio de cerveza, la cual llamaban Sikaru. Los egipcios a su vez lo atribuyen a su deidad Osiris y la llamaron Zythum, que significa vino de cebada. Era usado como bebida social y se usaba como ofrenda para los difuntos y como forma de pago. Los griegos conocen la elaboración de la cerveza a través de los egipcios; sin embargo, en Grecia la cerveza tenía poca importancia religiosa debido a que ellos le daban más importancia al vino en este aspecto (Cabras & Higgins, 2016; Carbajal-Martínez & Insuasti-Andrade, 2010; Cerveceros de España, 2001).

Roma conoció la cerveza a través de Grecia; aquí fue donde se comenzó a acuñar el nombre de cerveza, ya que era llamada *Cerevisia*, derivado del nombre de su deidad de los cultivos (Ceres). No obstante, se terminó por despreciar la

cerveza y a optar por el vino, y en su conquista propagaron el consumo de vino (Cabras & Higgins, 2016; Carbajal-Martínez & Insuasti-Andrade, 2010).

Durante el Siglo V D. C. la cerveza comenzó a ser producida en los monasterios de toda Europa. Los monjes son los responsables de mejorar el proceso de su fabricación al adicionarle lúpulo, lo cual contrarrestó el sabor dulce de la malta, le da un buen aroma y se añaden conservadores. En esta época esta bebida era popular entre los alemanes y los celtas. Con la conquista española se extiende la cerveza al continente americano desplazando a la Chicha, la cuál era una bebida Inca similar a la cerveza, pero usaba diferente grano y tenía menor cantidad de alcohol (Cabras & Higgins, 2016).

Con el desarrollo de la industria la elaboración de cerveza aumenta considerablemente; sin embargo, tuvo dos eventos adversos para su desarrollo, la primera y segunda guerra mundial, en donde se escasearon las materias primas para su elaboración. Actualmente la cerveza se elabora a gran escala a nivel mundial (Cabras & Higgins, 2016; Carbajal-Martínez & Insuasti-Andrade, 2010; Cerveceros de España, 2001).

1.2. Elaboración

La cerveza se obtiene de la fermentación de un mosto elaborado a partir de malta de cebada, con o sin la adición de otros cereales no malteados (adjuntos). La mezcla de estos cereales con agua se transforma en azúcares mediante la digestión enzimática. Posteriormente se agrega a la mezcla el lúpulo y/o sus derivados y finalmente es sometida a un proceso de cocción (Sánchez-Miguel A., 2011).

Malteado: El grano de cebada tiene que ser puesto a germinar a una temperatura de 10 a 16° C, una humedad de 42 a 46 % y un tiempo de 60 horas. Después, la cebada germinada se seca usando aire caliente iniciando con un calentamiento suave hasta alcanzar la temperatura final dependiendo de las características que se deseen en la malta. Normalmente las temperaturas de secado para maltas Lager son de 55 a 70° C y de 60 a 95°

C para maltas Ale. Finalmente se realiza la fragmentación de los granos tostados para obtener la malta en polvo. Al final de este proceso se obtiene un polvo rico en enzimas (Sánchez-Miguel A., 2011).

Producción del mosto: La malta se mezcla con agua; opcionalmente se pueden adicionar otros tipos de grano para dar diferentes sabores a la cerveza. La mezcla se calienta gradualmente hasta una temperatura de 48 ° C por aproximadamente 20 minutos, con el objetivo de activar enzimas del mosto: proteasas, β -glucanasas y β -amilasa. Se continúa el calentamiento progresivo por etapas a temperaturas de 60° C por 30 minutos y posteriormente a 72° C por 30 minutos más, estas temperaturas corresponden a las temperaturas de activación de las amilasas. La solución se filtra y al líquido obtenido se le añade el lúpulo. Finalmente, la solución se somete a ebullición por una hora para obtener el mosto.

Fermentación: En esta etapa las levaduras metabolizan los carbohidratos del mosto para la generación de etanol y CO₂ principalmente. Se aplica en dos tiempos la fermentación primaria y fermentación secundaria (maduración).

Existen dos tipos de fermentación primaria:

Fermentación alta: Empleada en la elaboración de cerveza tipo Ale. Durante esta fermentación las levaduras forman un aglomerado que flota en el líquido o pueden flocular a inicios de la fermentación y hundirse el líquido a. 15 a 22° C.

Fermentación baja: Empleada en la elaboración de cerveza tipo Lager. En este tipo de fermentación las levaduras floculan al finalizar la etapa, en aglomerados que se hunden en el líquido a 7 a 15° C.

El proceso de maduración consiste en someter al mosto fermentado a bajas temperaturas que van desde 4 a 10 ° C por un tiempo de 5 a 10 días. La maduración proporciona a la cerveza sus características finales de olor, color,

sabor y brillantez. Una vez concluida la maduración, la cerveza es clarificada, carbonatada, envasada y pasteurizada para su embalaje y distribución (Figura 1) (Sánchez-Miguel A., 2011).



Figura 1. Proceso de elaboración de cerveza (Cerveceros de España, 2001).

1.3. Composición

La cerveza contiene principalmente cebada, lúpulo, levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) y agua. Los extractos de cebada (70-80%) y lúpulo (20-30%) (Figura 2) contienen abundantes polifenoles tales como kaempferol, quercetina, tirosol, ácidos

felúrico, xantohumol, isoxantohumol, 8-prenilarigenina, α ácidos (humulona) y β ácidos (lupulona) (Chen *et al.*, 2014; Gerhäuser, C., 2005).



Figura 2. Materia prima usada en la elaboración de cerveza: cebada, lúpulo, *Sacharomyces cerevisiae*, levadura comercial y cerveza artesanal (Sánchez-Miguel A., 2011; Carbajal-Marínez & Insuasti-Andrade, 2010).

Los ácidos iso α ácidos (humulona) se isomerizan espontáneamente cuando se someten a una temperatura alta (70-120° C). Los β ácidos (lupulona) tienen una estructura similar, pero difieren en sus ramificaciones, lo que los hace más hidrofóbicos y poseen una actividad bacteriostática mayor, sin embargo, no están presentes en la cerveza debido a su sensibilidad a la oxidación. Los derivados del xantohumol son chalconas preniladas y flavonoides que son solubles en compuestos polares (Figura 3) (Steenackers *et al.*, 2014; Gerhäuser, C., 2005).

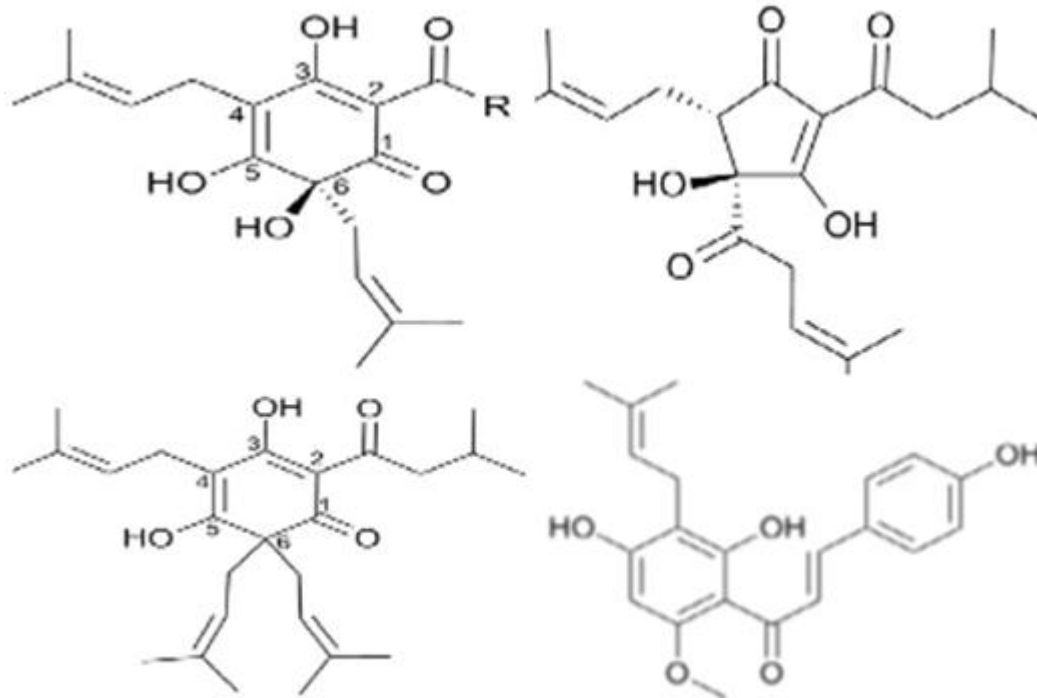


Figura 3. Estructura de los compuestos polifenólicos en la cerveza: α ácidos humulona e isohumulona, β ácido (lupulona) y xantohumol (Steenackers *et al.*, 2014).

1.4. Propiedades en relación a la salud

El estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades: aterosclerosis, diabetes, enfermedades neurodegenerativas envejecimiento. Se sabe en la actualidad que el consumo de una dieta rica en antioxidantes brinda una protección contra dichas enfermedades. Ya que existen estudios epidemiológicos en los cuales hay una asociación entre el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos y la prevención de enfermedades asociadas con estrés oxidativo. Además, se determinó la absorción de compuestos fenólicos a través de la barrera intestinal, en los cuales se observó un incremento de la capacidad antioxidante del plasma después del consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos. Por otro lado, el consumo de cerveza sin alcohol en la cena aumenta la capacidad antioxidante en la orina (Franco *et al.*, 2013; Nardini *et al.*, 2005; Ghiselli *et al.*, 2000).

Los extractos de malta y lúpulo contienen abundantes compuestos polifenólicos además del etanol. Principalmente ácidos fenólicos, chalconas preniladas, flavonoides, catequinas y proantocianidinas. Estos compuestos han demostrado que poseen diferentes efectos: antibacteriano, antiinflamatorio, antioxidante, antiangiogénico, antimelanogénico, antiosteoporosis, anticancerígeno e incluso en recientes estudios se ha observado que presenta actividad contra eczema atópico, cáncer de piel, infecciones de piel, desordenes de pigmentación, piel seca y piel envejecida (Chen *et al.*, 2014).

El xantohumol es un agente quimiopreventivo de amplio espectro que actúa por: inhibe la activación metabólica de procancerígenos, induce enzimas con actividad detoxificantes y puede inhibir el crecimiento de tumores en estadio temprano (Stevens & Page, 2004). En otros estudios, el xantohumol reduce la genotoxicidad causada por los radicales reactivos de oxígeno, hidrocarburos cíclicos aromáticos y aminas cíclicas aromáticas, además tiene actividad antiinflamatoria interactuando con las prostaglandinas, la síntesis de DNA, induce apoptosis e inhibe el ciclo celular. Estas actividades han sido reportadas *in vitro* más no necesariamente suceden *in vivo* (Ferk *et al.*, 2010).

Tanto el xantohumol como el isoxantohumol pueden inhibir la síntesis de DNA en células de cáncer de mama (MCF-7), en cambio en cultivo primario de hepatocitos no se observó inhibición en 24-48 horas con una dosis de 10 μM . Para determinar la actividad antiangiogénica se hizo una prueba *in vitro* cultivando vasos sanguíneos de placenta con xantohumol e isoxantohumol, con xantohumol se observó una reducción de formación de capilares en un rango de concentración de 0.5-10 μM . En otro estudio se usaron cultivos de línea de células endoteliales microvasculares de humanos inmortalizadas (HMEC-1), donde se observa que se inhibe la migración, lo que indica actividad antiangiogénica (Gerhäuser, C.,2005).

Por otro lado, para estudiar si tiene actividad estrogénica se estudió el fitoestrógeno contenido en la cerveza, la 8-prenilnaringenina, la cual mostró actividad estrogénica en levadura recombinante que expresa el receptor de estrógenos y una respuesta estrogénica en cultivos de células endometriales Ishikawa (Var-I); sin embargo, en usando una dosis de 100 μg / 100 mL en ratones

incrementa la mitosis en vagina; y con dosis de 400 a 1000 veces más que lo que contiene la cerveza, no hay ningún efecto perjudicial, por lo que es seguro para el humano consumir cerveza (Gerhäuser, C.,2005; Stevens & Page, 2004).

1.5. Microbiota del tracto digestivo

El avance en la secuenciación del DNA permitió para el año 2012 caracterizar los microorganismos asociados al ser humano (microbiota) y su correspondiente genoma (microbioma), y se llegó a determinar los principales *phylum*: Firmicutes, Bacteroidetes, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. De los cuales Bacteroidetes, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* están cercanamente relacionados y el *phylum* de los Firmicutes es el más distante (Figura 4) (Mao & Franke, 2015; Zapata *et al.*, 2015; Bik *et al.*, 2006).

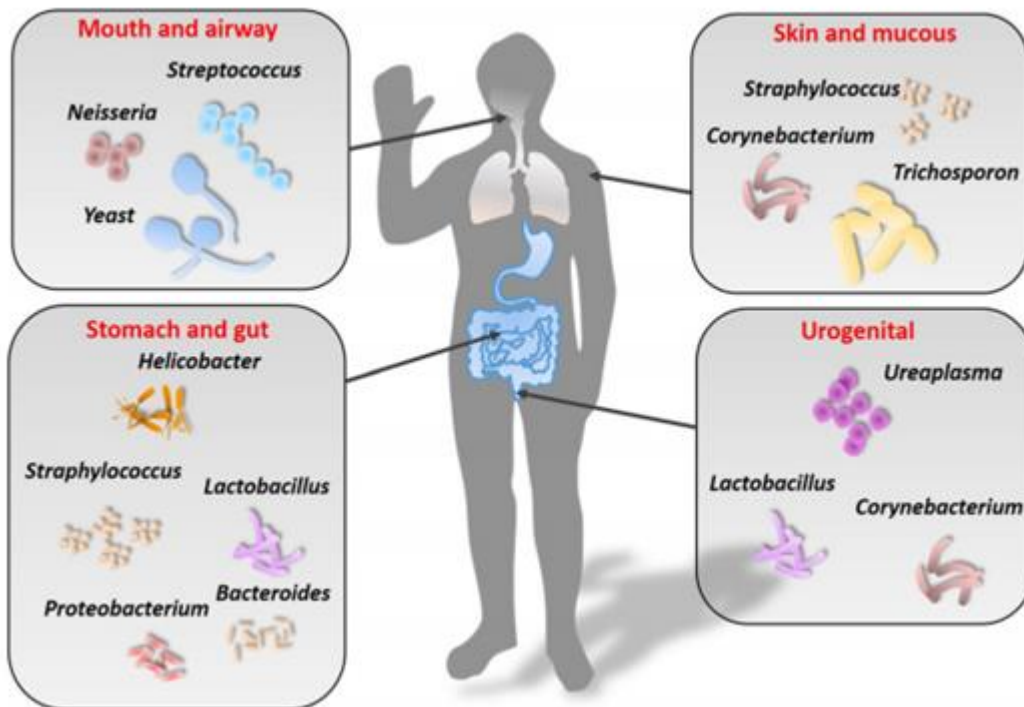


Figura 4. Representación esquemática de los microorganismos que habitan el ser humano (Mao & Franke, 2014).

La microbiota intestinal humana es aproximadamente de 100 trillones, lo cual representa diez veces más que el total de células humanas. Esto es un impacto significativo en la fisiología humana. (Mao & Franke, 2015; Walsh *et al.*, 2015). El tracto gastrointestinal es un microecosistema dinámico, (Figura 5) el cual contiene una alta diversidad microbiana, la cual vive en equilibrio con el huésped, cuya función consiste en degradar componentes no digeribles de los alimentos, remover compuestos tóxicos, sintetizar vitaminas, metabolizar carbohidratos y proteínas, es la barrera intestinal, protege contra enfermedades y estimula al sistema inmunológico. La microbiota del tracto digestivo varía mucho a través del tracto digestivo. (Mao & Franke, 2015; Nunes de Almada *et al.*, 2015; Walsh *et al.*, 2015).

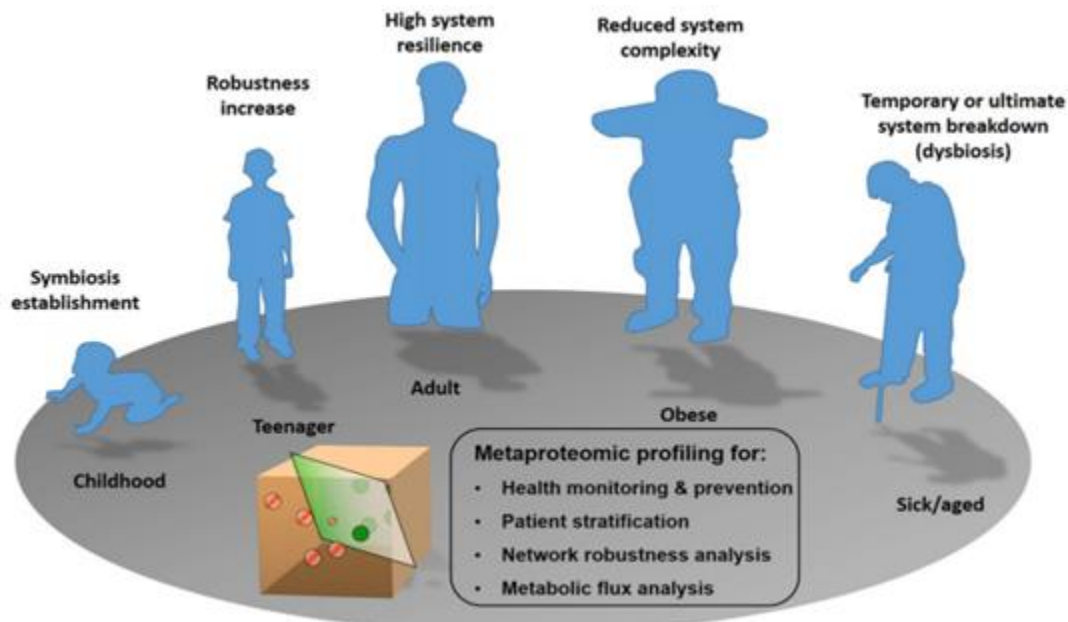


Figura 5. La microbiota es dinámica a lo largo de la vida del ser humano (Mao & Franke, 2014).

1.6. Propiedades de la microbiota del tracto digestivo en relación con la salud

Un perfil de abundancia relativa alta de Firmicutes y una abundancia relativa baja de Bacteroidetes aunado a un consumo elevado de dietas ricas en carbohidratos y grasas saturadas se asocia con un mayor riesgo de obesidad. Estudios recientes en niños encontraron mayor población de Bacteroidetes en niños

con peso normal y mayor población de Firmicutes en los que tienen mayor peso (Estrada-Velasco *et al.*, 2015; Devaraj *et al.*, 2013; Sanz *et al.*, 2008).

Los géneros bacterianos incrementados en niños con sobrepeso y obesidad son: *Faecalibacterium* spp., *Lachnospiraceae* y *Roseburia* spp., y disminuyen *Succinivibrio*, y *Oscillospira* spp.; *Faecalibacterium*, spp. tiene la capacidad de extraer energía de carbohidratos complejos no digeribles en el colon distal, *Roseburia* spp. aumenta la producción de ácido butírico, *Succinivibrio*, y *Oscillospira* spp. regulan el balance de energía en el huésped. Los niños con sobrepeso presentan un incremento de *Blautia*, *Coprococcus* spp. y las enterobacterias; las cuales están relacionadas con un aumento en la actividad proinflamatoria del huésped de forma crónica. Los niños con peso normal tienen una abundancia en *Proteobacteria* y menor cantidad de Firmicutes (Murugesan *et al.*, 2015).

No sólo la dieta puede modificar la diversidad de la microbiota en humanos también se modifica viajando, con tratamiento médico y la edad, donde disminuye el *phylum* de los Bacteroidetes y los Firmicutes aumentan, generando un desbalance de la microbiota (disbiosis), lo cual puede ser causa de algunas enfermedades como obesidad, diabetes tipo 2, y síndrome del intestino irritable (Figura 6) (Murugesan *et al.*, 2015; Walsh *et al.*, 2015; Mao & Franke, 2015; Estrada-Velasco *et al.*, 2014; Gerber, G. K., 2014).

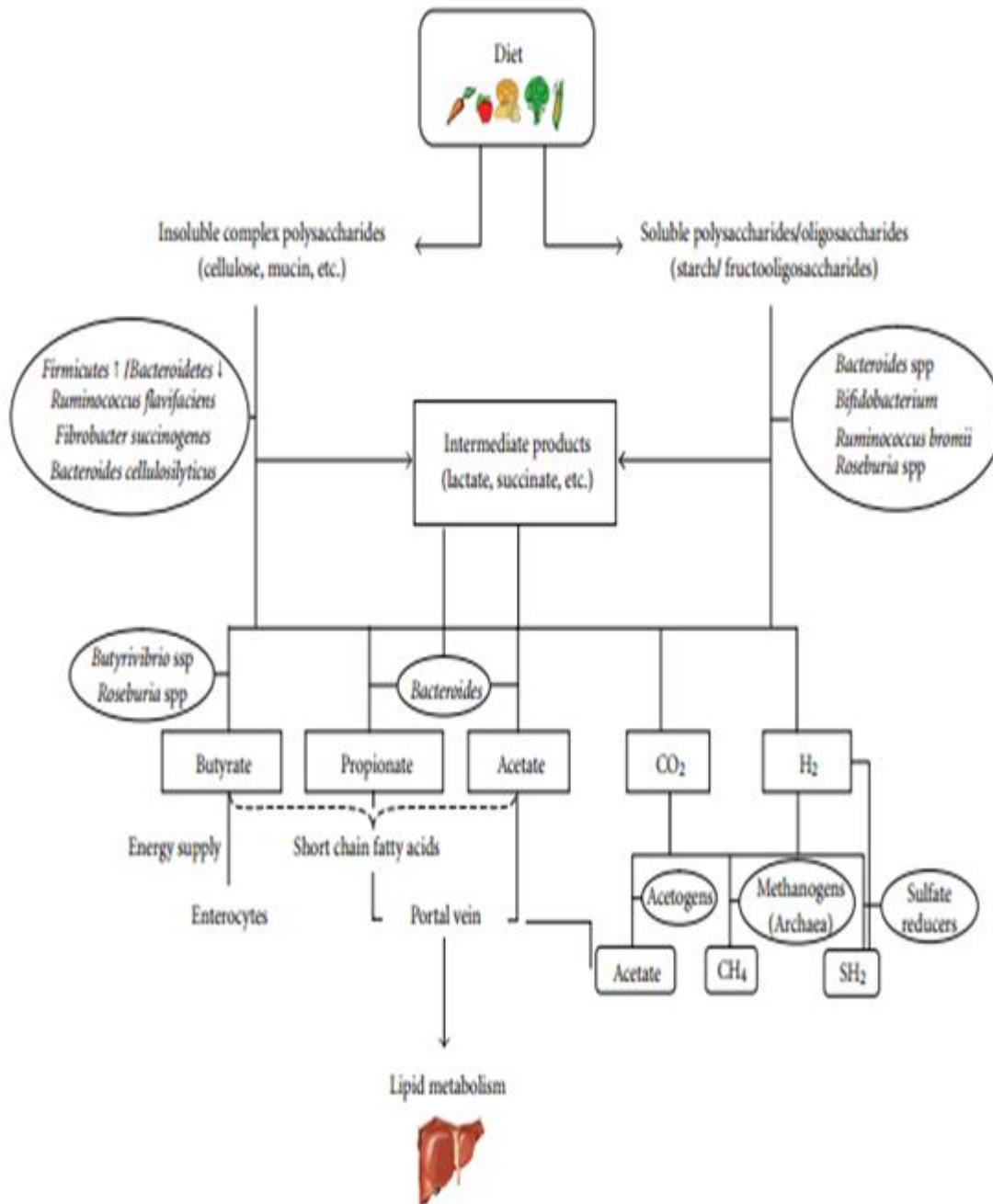


Figura 6. Representación esquemática de las principales vías metabólicas de una dieta basada oligo- y polisacáridos en el ecosistema intestinal (Sanz *et al.*, 2008).

La microbiota que incrementa la capacidad de extraer energía en calorías de la dieta se le conoce como microbiota obesa compuesta principalmente por Firmicutes. Un estudio en ratones, donde se trasplanta la microbiota de ratones delgados a obesos, se observa una disminución de peso. (Walsh *et al.*, 2015; Vijay-Kumar *et al.*, 2010).

La microbiota intestinal mediante sus lipopolisacáridos (LPS) modula la inflamación a través de los receptores tipo toll (TLR) de la inmunidad innata favoreciendo la expresión de IL-1 β IL-6, IL-8, MCP-1 TNF- α (Mao & Franke, 2015; Zapata *et al.*, 2015). Cuando se produce más mediadores de inflamación que los antiinflamatorios como IL-10 se asocia con la obesidad (Figura 7) (Sanz *et al.*, 2008).

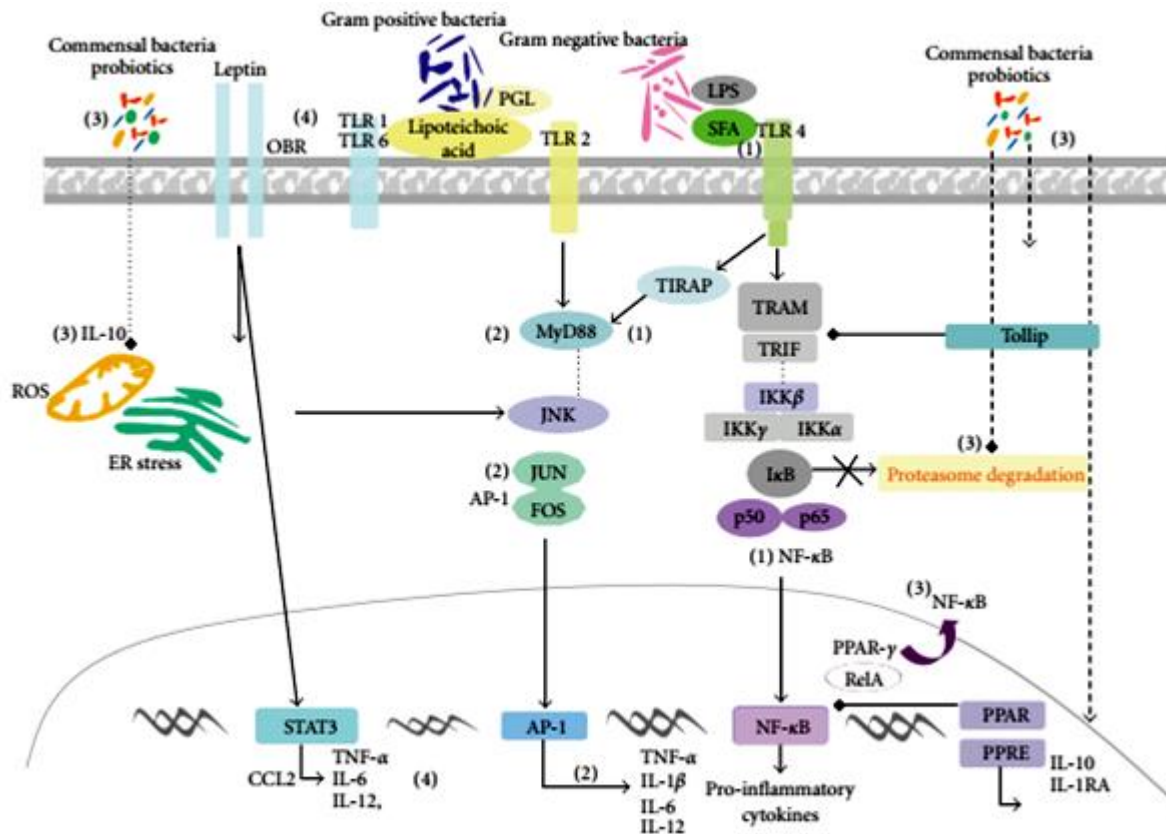


Figura 7. Diagrama esquemático de las vías de señalización que son desencadenadas por los componentes bacterianos para activar la respuesta innata del sistema inmune. (Sanz *et al.*, 2008).

Otra forma mediante al cual la microbiota interacciona con el huésped son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente butirato, acetato y propionato, los cuales son generados por la fermentación bacteriana. El butirato provee de energía a los enterocitos, tiene propiedades antiinflamatorias, es capaz de reforzar la barrera del colon y está relacionado con aumento de peso si está en exceso; el acetato aumenta la síntesis de colesterol en hígado y el propionato inhibe la síntesis de lípidos a partir de acetato. Así, estos metabolitos estarían relacionados

con cascadas de señalización con influencia en el estado de inflamación sistémico relacionado a muchas enfermedades crónico degenerativas (Figuras 6 y 8) (Mao & Franke, 2015; Murugesan *et al.*, 2015; Zapata *et al.*, 2015; Dengler *et al.*, 2014; De Baere *et al.*, 2013; Devaraj *et al.*, 2013; Sanz *et al.*, 2008).

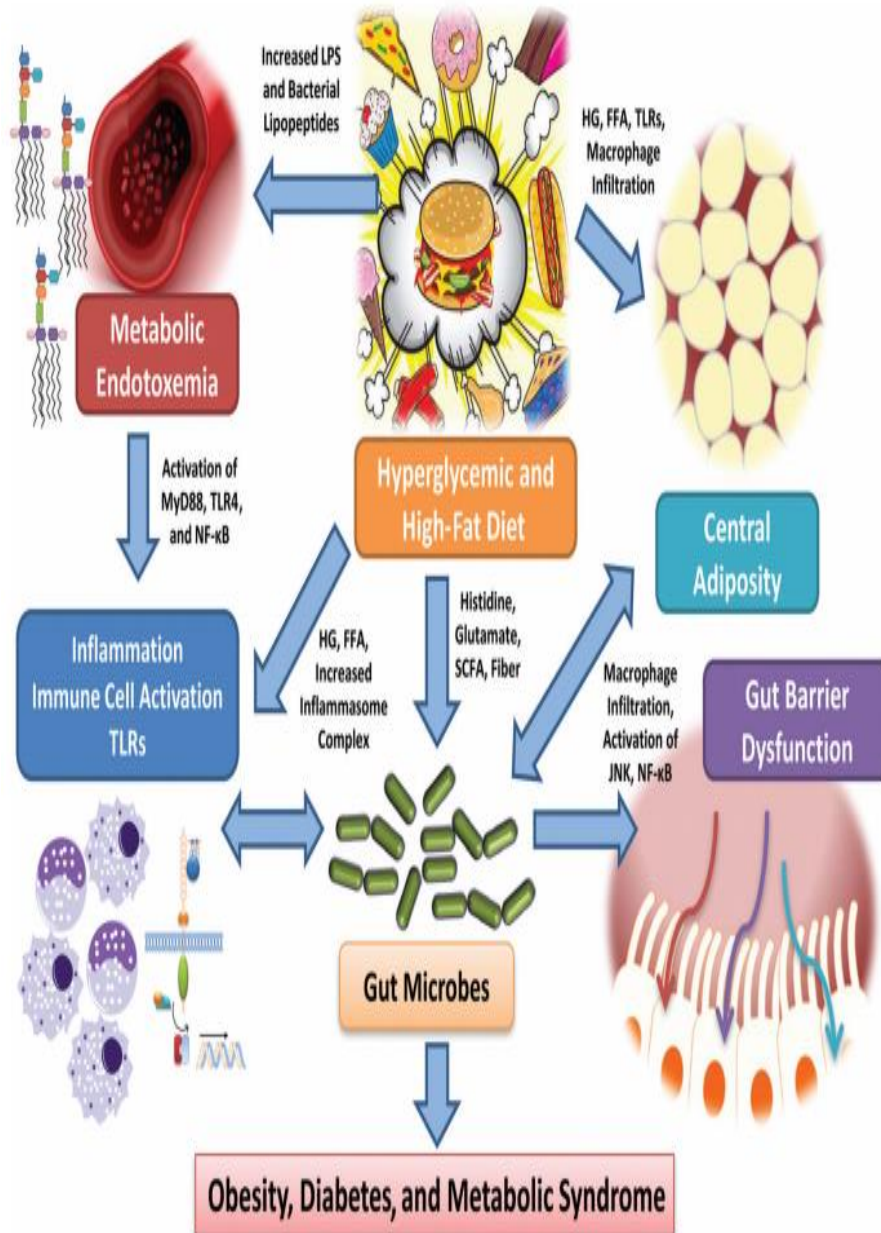


Figura 8. Esquema del metabolismo por la microbiota cuando se tiene una dieta con alto contenido energético (Devaraj *et al.*, 2013).

Por otra parte, el sistema inmune discrimina entre un agente patógeno y la microbiota a través de algunas moléculas que sintetizan las bacterias; un ejemplo es el polisacárido A (PSA), el cual es sintetizado por *Bacteroides fragilis*, el cual interacciona con los TLR-2 y activa a las células T reguladoras promoviendo tolerancia inmunitaria. Algunos *Clostridios* pueden inducir la síntesis de IL-10 y activar las células T reguladoras (Zapata *et al.*, 2015; Round *et al.*, 2011).

1.7. Interacción de los componentes de la cerveza con la microbiota del tracto digestivo

El xantohumol, es la principal chalcona prenilada del lúpulo, posee actividad antioxidante, antiangiogénica, antibacteriana y antiviral, inhibiendo la síntesis de la proteína p24 del HIV-1, sin embargo, si se usa una reversotranscriptasa recombinante no tiene ningún efecto; además ha mostrado efectos antitumorales en algunos tipos de cáncer colon, ovario y mama (Steenackers *et al.*, 2014; Dorn *et al.*, 2010).

Estudios en ratones hembra BALB/c con xantohumol no mostraron ninguna diferencia significativa en diferencia de peso, comparándolos contra un grupo que no recibió tratamiento con xantohumol, pero tampoco se encontraron signos de toxicidad en hígado, riñón, colon, pulmón, bazo y timo cuando se administraron dosis de 1000 mg/kg de peso) (Dorn *et al.*, 2010).

Por otro lado, en un estudio se determinó la actividad de los α -ácidos e iso α -ácidos (humulona e isohumulona) contenidos en el lúpulo tienen una actividad antibacterial *in vitro*, en especial contra gram positivas, particularmente *Lactobacillus* (Gerhäuser, C.,2005).

Un estudio en ratones Zucker fa/fa recibieron xantohumol vía oral en distintas dosis (1.86, 5.64 y 16.9 mg/kg) y una dieta alta en grasas, donde se observó una disminución de los niveles de glucosa plasmática, sin embargo, los niveles de colesterol, insulina y triglicéridos no se vieron afectados en la dosis más alta en los ratones macho; adicionalmente, disminuyeron de peso en comparación con las hembras (Legette *et al.*, 2013).

La administración de extractos de xantohumol reduce la síntesis de ácidos grasos a través de la reducción del mRNA SREBP1c del hígado en ratones con una dieta rica en grasa; además, el xantohumol puede inhibir el incremento de peso corporal, peso del hígado y triglicéridos en el plasma. En otros estudios, extractos ricos en xantohumol disminuyen las concentraciones de la sintetasa de ácidos grasos, glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y enzima málica en ratas wistar. Por otro lado un estudio con polifenoles de la acacia, se puede suprimir el incremento de peso corporal, glucosa en plasma y niveles de insulina en ratones KK-Ay que son alimentados con una dieta alta en grasa. Los resultados anteriores pueden atribuirse a que el xantohumol es un agonista del receptor farnesoide X (FXR), el cual está involucrado en el metabolismo del colesterol y ácidos biliares; en ratones KK-Ay los niveles de glucosa y triglicéridos disminuyeron en estos ratones que son un modelo de estudio de obesidad y diabetes cuando se les alimentó con xantohumol durante cuatro semanas (Yui *et al.*, 2014; Hajime Nozawa, 2005).

2. ANTECEDENTES

Estudios con cerveza en ratones han mostrado que esta protege de la formación de aductos en el DNA en hígado y pulmones. Adicionalmente estudios en hámster donde se usa cerveza clara y oscura se determinó que la cerveza inhibe significativamente la aterosclerosis; observándose una disminución de colesterol y triglicéridos especialmente en la cerveza clara (Gerhäuser C., 2005).

Estudios realizados con cerveza reportan que el xantohumol previene el daño hepático agudo cuando se induce daño con tetracloruro de carbono en ratas. (Franco *et al.*, 2013). En otros estudios se usó dimetilhidrazina (DMH) en ratas como carcinogénico en colon (20mg/kg) y a las 14 semanas fueron sacrificados, a unos ratones se le dio etanol al 5% y a otros ratones cerveza, donde se observó que la cerveza reduce significativamente la incidencia en tumores en un 33%. Por otro lado, en ratones machos se le inoculó vía subcutánea azoximetano (AOM), este es el metabolito activo de DMH, en este estudio se observó una disminución

significativa en la parte derecha del colon más no mostró efecto en la parte izquierda (Gerhäuser, C.,2005).

Un estudio en hombres que consumen moderadamente alcohol mostró una disminución significativa de la posibilidad de sufrir un infarto al miocardio (Mukamal *et al.*, 2003).

Los polifenoles pueden producir peróxido de hidrógeno en la membrana de las bacterias alterando su permeabilidad, sin embargo, las bacterias pueden metabolizar estos compuestos si producen la enzima que hace un corte de enlace glicosídico. Los Bacteroidetes tienen un mayor número de enzimas que degradan glicanos que los Firmicutes, lo cual les permite metabolizar compuestos fenólicos, por lo tanto, los hace más resistentes a su actividad antimicrobiana que los Firmicutes. Un análisis del genoma de Bacteroidetes mostró que tienen un mayor número de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos como glucósido hidrolasas y polisacárido liasas además de parálogos de SusC y SusD, los cuáles reconocen estructuras de carbohidratos (Cardona, *et al.* 2013; Rastmanesh Reza, 2011).

Bacterias aisladas de heces fueron cultivadas con compuestos fenólicos del té, bacterias patógenas como: *Clostridium perfringes*, *Clostridium difficile* y *Bacteroides* spp., fueron inhibidos, mientras que anaerobios comensales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* fueron poco afectados; indicando que los compuestos fenólicos del té ejercen una modulación de la microbiota intestinal. Por otro lado, estudio con bacterias aisladas de heces de humano se cultivaron junto con algunos compuestos polifenólicos como rutina, quercetina, ácido clorogénico, ácido cafeico, donde proliferaron las bifidobacterias; en general disminuyeron los Firmicutes respecto a los Bacteroidetes, además, los compuestos polifenólicos aumentaron la producción de ácidos grasos de cadena corta por bacterias (Parkar *et al.*, 2013; Lee *et al.* 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se tiene información sobre los efectos benéficos que proporciona la cerveza si se toma en dosis moderadas tanto en animales como humanos, sin embargo, se desconoce la interacción de los componentes de la cerveza con la microbiota intestinal, o si se pueden metabolizar para sintetizar otras moléculas funcionales dando como resultado de esta interacción un efecto benéfico para la microbiota del tracto digestivo, favoreciendo así la salud a quienes consumen una dosis moderada de cerveza. Y de forma indirecta contribuir a la prevención del desarrollo de enfermedades como la obesidad y DT2 en mexicanos.

4. HIPÓTESIS

Un consumo habitual y moderado de cerveza de 355 mL/día con la comida, propicia el buen desarrollo y además una mejoría en la funcionalidad de la microbiota en el aparato digestivo, colaborando a su vez a un estado de buena salud en el consumidor, debido a un aumento de la población de Bacteroidetes en comparación de los Firmicutes en los sujetos que consumen una cantidad moderada de cerveza respecto a los que no la consumen.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar comparativamente la funcionalidad y la diversidad de la microbiota en términos de su riqueza y abundancia en el colon distal de una muestra de individuos sanos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1. Seleccionar una muestra de 60 individuos sanos (30 hombres y 30 mujeres) de entre 24 y 55 años. A los cuales se les realizó una valoración mediante parámetros antropométricos, datos clínicos y estudios bioquímicos.

Objetivo específico 2. Realizar la intervención con cerveza en la dieta de los participantes, colectando muestras sanguíneas y fecales.

Objetivo específico 3. Crear una biblioteca de copro DNA de las muestras de los participantes para caracterización de la diversidad microbiana con base a su 16S rDNA y por secuenciamiento masivo en paralelo.

Objetivo específico 4. Cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta (propionato, butirato y acetato) en las muestras de copro y el contenido de xantohumol en la cerveza y suero sanguíneos por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

Objetivo específico 5. Analizar los datos para determinar si hay una asociación del consumo de cerveza con los resultados obtenidos: niveles de producción de ácidos grasos de cadena corta, la diversidad microbiana, parámetros antropométricos, clínicos y bioquímicos del estudio.

7. ALCANCE

Se establecerá la diversidad de la microbiota del colon de 60 hombres y mujeres mexicanos. Primero se incorporó el consumo de cerveza sin alcohol junto con la comida. Posteriormente se les solicitaron muestras sanguíneas y fecales los días 1, 15 y 30; con el objetivo de determinar si la cerveza en dosis baja puede favorecer el desarrollo de la microbiota de Bacteroidetes. Esto se corroborará con los parámetros antropométricos, clínicos, bioquímicos y concentración de ácidos grasos de cadena corta obtenidos del estudio.

8. METODOLOGÍA

Obtención de muestras

Se reclutaron 35 personas (21 hombres y 14 mujeres), que cumplieron los criterios de inclusión/exclusión para participar en proyecto, posteriormente los participantes se les proporcionó una cerveza sin alcohol durante 30 días, con el objetivo que la

consuman junto con la comida. Durante este tiempo se tomarán muestras sanguíneas y fecales los días 1, 15 y 30.

Extracción leche DNA

Se realizó la extracción de DNA de 100 mg de copro utilizando Favorprep Stool DNA isolation Minikit (Favorgen). El DNA extraído se cuantificó por absorbancia 260/280 utilizando un Nanodrop y la integridad se evaluó por fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa al 0.5%.

Generación de genotecas

Se realizó la extracción de DNA total de las muestras de heces utilizando el kit Favorgen (BIOTECH CORP) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron las concentraciones de DNA total y determinó la integridad del DNA por cuantificación de su coeficiente A260/280 usando espectrofotómetro Nanodrop LITE* (Thermo Scientific) así como su calidad por fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 0.5% teñido con 0.80 µl de colorante Midori Green, utilizando 5 µl de buffer de carga de azul de bromofenol con glicerol yTBE (Tris[Borato]EDTA) como regulador de corrida, aplicando 90 Volts durante 50 minutos y observando el gel con el sistema de foto-documentación Molecular Imager® Gel Doc™ XR Bio-Rad.

Preparación de genotecas de V3 del 16S rDNA

Una vez obtenido el DNA de las muestras se realizó una PCR para amplificar la región hipervariable V3 con los primers que contienen una región específica que identifica las muestras durante el proceso de secuenciación masiva (Barcode), tomando las condiciones de las Tablas 1 y 2, una vez terminada la PCR se comprueban la calidad del producto esperado (281 pb) mediante un fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa al 2 % con las mismas condiciones para ver la integridad del DNA.

Tabla 1. Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA con BARCODE

Iniciadores: Secuencias asignadas BARCODE		Tamaño del producto: 281 pb	
Mezcla de reacción			
Reactivos	[Stock]	[Reacción]	Volumen/muestra
Buffer	10x	1x	5 µL
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µL
Primer sentido	10 µM	0.2	1 µL
Primer antisentido	10 µM	0.2	1 µL
Taq polimerasa	5 unidades/µL	0.025 unidades/µL	0.25 µL
Agua	-	-	Variable
DNA	Variable	20 a 50 ng/ µL	Variable
Volumen total		50 µL	

Tabla 2. Condiciones para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA con BARCODE

	Temperatura	Tiempo	} 25 ciclos
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos	
Desnaturalización	94° C	15 segundos	
Alineamiento	62° C	15 segundos	
Extensión	72° C	15 segundos	
Extensión Final	72° C	10 minutos	
	10° C	8 minutos	

Secuenciación de las genotecas

Se hizo el análisis y acondicionamiento de cada genoteca de las muestras para su secuenciación en equipo Ion Torrent (Rothberg *et al.*, 2011) utilizando Chip 318. El archivo de secuencias fue analizado utilizando Qiime pipeline versión 1.9.0 (<http://qiime.org/>) y comparado con base de datos 16S rDNA GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) (McDonald *et al.*, 2012).

Medición de ácidos grasos de cadena corta

Se analizan en el equipo HPLC PerkinElmer a partir del sobrenadante que se obtiene a después de resuspender con agua miliQ 100 mg de heces deshidratadas, y pasadas por una columna C18. Primero se analizan los estándares puros de: ácido acético, propiónico y butírico, con el fin de obtener sus tiempos de retención y unidades de absorbancia; posteriormente en las mismas condiciones se analizan las muestras para determinar y cuantificar la presencia de estos ácidos en las mismas. Finalmente se elabora una gráfica de [AGCC] contra tiempo (días).

Establecer modelo de asociación con obesidad

Se analizaron todos los datos previamente obtenidos desde la entrevista con los voluntarios, la microbiota determinada, la cantidad de ácidos grasos y los parámetros bioquímicos con el fin de establecer si hay una asociación de la información obtenida con el estado de salud de la persona, además de poder prevenirla si presenta factores de riesgo de obesidad y diabetes.

8.1 Plan de trabajo

Fase I: Selección de los voluntarios y toma de muestras

Se reclutaron 35 hombres y mujeres de 21-55 años para el desarrollo del proyecto de cerveza.

Se realizó un examen médico general, de cual se seleccionó a 21 hombres y 14 mujeres que no hayan tomado antibióticos vía oral dos meses antes, no sean alcohólicos, sin antecedentes familiares de DT2, enfermedades inflamatorias crónicas, nefropatía, y/o problemas cardiovasculares, con base a los estudios bioquímicos.

Fase II: Realizar la intervención con cerveza

Se proporcionó durante 30 días cerveza sin con alcohol de 355 mL a los participantes para que la consuman junto con la comida.

Se obtuvieron las muestras de sangre y de copro de los participantes los días 1, 15 y 30.

Fase III: Secuenciación masiva de genotecas 16S/18S rDNA de la microbiota del colon

Se realizó la extracción de DNA de las muestras de copro utilizando el kit de Favorgen.

Se preparó una genoteca a partir de 16S rDNA de bacterias conteniendo las regiones polimórficas V3.

Realizar una secuenciación masiva usando el equipo Ion Torrent™ utilizado Chip 318, 1 GB y una lectura promedio de amplicón de 400 pb.

Obtener los formatos FASTA de la secuenciación masiva para su posterior análisis bioinformático.

Fase IV: Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Determinar los tiempos de retención de los estándares de AGCC usando el HPLC PerkinElmer™.

Determinar los tiempos de retención de los AGCC usando el HPLC PerkinElmer™ de las muestras.

Cuantificar la cantidad de AGCC usando el método de estándar externo.

Realizar una gráfica de tiempo contra cantidad de AGCC de las muestras.

Fase V: Análisis de datos

Realizar análisis bioinformático de las secuencias utilizando Qiime (<http://qiime.org/>).

Compararlo con las bases de datos GeenGenes y SILVA.

Realizar un análisis bioestadístico para determinar las diferencias entre los grupos.

8.2 Diseño experimental

Es un estudio de seguimiento, donde los individuos se evaluaron bioquímicamente, antropométricamente, además la microbiota bacteriana del tracto digestivo se caracterizó antes y durante la intervención a su dieta con el consumo moderado de cerveza. Cada intervención se realizó durante un período de 30 días, consumiendo los participantes una dosis de 355 mL de cerveza sin alcohol durante la comida. Todas las mediciones indicadas en este proyecto se realizaron los días 1, 15 y 30.

Población y muestra

La población del estudio fueron habitantes de la Ciudad de México. Se tomó una muestra de 35 individuos sanos 14 mujeres y 21 hombres de entre 21 a 55 años de edad de una base de datos de investigación.

Criterios de selección del estudio

Se incluyeron individuos sanos, sin antecedentes familiares de DT2, enfermedades inflamatorias crónicas, nefropatía, y/o problemas cardiovasculares. Se excluyeron aquellos con uso de antibióticos durante tres meses previos al estudio, presencia de desórdenes gastrointestinales, embarazo y/o lactancia. El protocolo de este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética, todos los participantes firmaron consentimiento informado.

Variables

Las variables a medirse fueron los parámetros antropométricos, datos clínicos y estudios bioquímicos en sangre, los datos de diversidad de la microbiota del copro y los ácidos grasos de cadena corta en las muestras de copro.

Análisis estadístico

Se probará la asociación entre el consumo moderado de cerveza con los valores de caracterización bioquímica, antropométrica y desempeño fermentativo de la microbiota.

Consideraciones éticas

En este estudio se apega al buen manejo de la información y trato de la individualidad de los participantes, así como el manejo discreto de su información conforme a lo aprobado por el Comité de Bioética Institucional y acuerdo a la declaración de Helsinki año 2000.

9. RESULTADOS

Resultados del Objetivo específico 1. *Seleccionar una muestra de 60 individuos sanos*

Se realizó una invitación abierta a la comunidad del Cinvestav a participar en el proyecto, de los cuales inicialmente aceptaron 85 individuos de los cuales hubo deserciones y después de aplicar los criterios de inclusión/exclusión, únicamente quedaron 35, los cuales firmaron la carta de consentimiento que va de acuerdo con la declaración de Helsinki revisado en el 2000, y una carta de confidencialidad de datos, además de estar aprobados por el comité de ética del Cinvestav.

Durante la participación en el proyecto, los participantes no aumentaron de peso, no tuvieron un aumento de las medidas de cintura, cadera ni el índice de cintura cadera (Tabla 3), lo cual nos indica que una ingesta de una lata de 355 mL cerveza lager sin alcohol durante 30 días no favorece el aumento de peso.

Tabla 3. Características antropométricas y clínicas

Variable	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Participantes	35	35	35	nd
Hombres	21	21	21	1.00 ^c
Mujeres	14	14	14	1.00 ^c
Edad	28.77 ± 7.86	28.77 ± 7.86	28.77 ± 7.86	1.00 ^a
Peso (kg)	69.60 ±15.51	70.15 ±15.81	68.85 ±15.50	0.93 ^a
Estatura (m)	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	1.00 ^a
IMC (kg/m ²)	24.85 ± 4.08	25.04 ± 4.15	24.59 ± 4.10	0.84 ^a
Cintura	82.96 ±12.03	82.27 ±11.65	81.96 ±12.08	0.94 ^a
Cadera	89.61 ± 9.05	89.25 ± 9.94	89.33 ±10.04	0.96 ^a
ICC	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.05	0.92 ± 0.05	0.81 ^a
Presión sistólica (mmHg)	113.20 ±10.99	114.29 ±11.53	109.66 ±11.15	0.19 ^a
Presión diastólica (mmHg)	72.74 ± 7.92	72.86 ±11.86	71.29 ± 7.77	0.78 ^a
Pulso	69.34 ±11.14	72.05 ±12.28	72.05 ±10.04	0.44 ^b

IMC Índice de masa corporal, ICC: Índice cintura cadera, Promedio, ± desviación estándar, el valor-p fue calculado con base a: Kruskal-Wallis^a, Anova.^b y Chi-cuadrada^c.

Resultados del Objetivo específico 2. *Realizar la intervención con cerveza en la dieta de los participantes, colectando muestras sanguíneas y fecales.*

Una vez pasados los criterios de inclusión/exclusión los participantes recibieron diariamente durante 30 días una cerveza sin alcohol, y los días 1, 15 y 30

proporcionaron muestras sanguíneas y fecales. Las muestras sanguíneas se mandaron a analizar a un laboratorio clínico particular para realizar los análisis de: Hemoglobina, hematocrito, eritrocitos, volumen globular medio, hemoglobina globular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, distribución de los glóbulos rojos, leucocitos, neutrófilos totales y segmentados, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos, plaquetas, volumen plaquetario medio, bilirrubina directa, indirecta y total, aspartato aminotransferasa, alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina, glucosa en suero e insulina; a partir de la glucosa y la insulina se calcularon los valores de resistencia a insulina (Homa/IR) y el porcentaje de células beta funcionales (Tablas 4-8). De los cuáles hubo un cambio estadísticamente significativo en: glucosa, porcentaje de células β funcionales, basófilos, volumen plaquetario medio y concentración de hemoglobina corpuscular media (Figura 9).

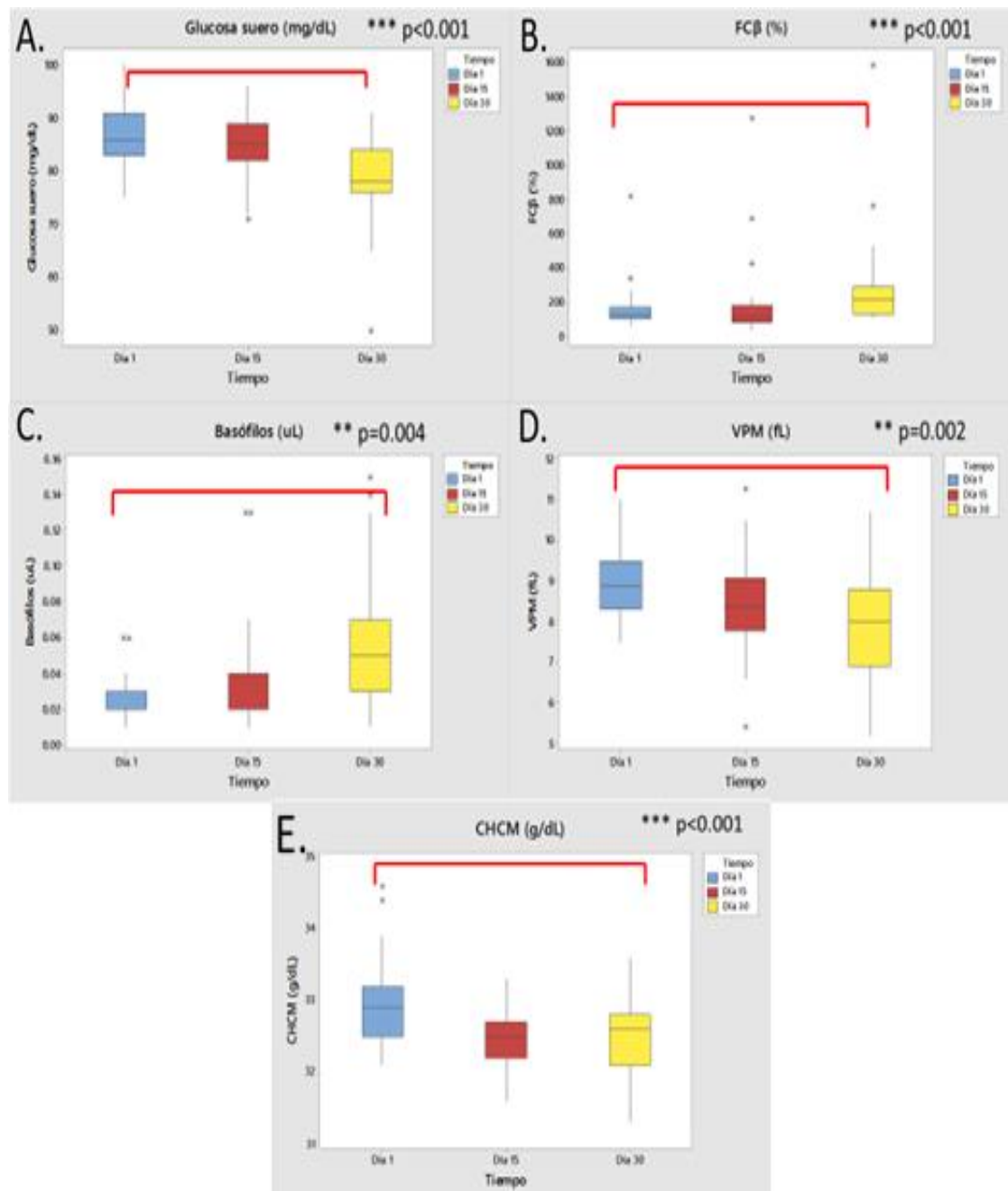


Figura 9. Parámetros bioquímicos modificados por el consumo de cerveza. Análisis de los valores clínicos; A: Glucosa (** $p < 0.001$ ^b), B: Porcentaje de células β funcionales (** $p < 0.001$ ^a). C: Basófilos, ($p = 0.004$ ^a), D: Volumen plaquetario ($p = 0.002$ ^a), E: Concentración de hemoglobina corpuscular media (** $p < 0.001$ ^a). Estos valores fueron tomados de los 35 participantes por tiempo (Día 1, 15 y 30). FC β (%): Porcentaje de células β funcionales, VPM: Volumen plaquetario medio, CHCM; Concentración de hemoglobina corpuscular media. El valor-p fue calculado con base a: Kruskal-Wallis ^a, Anova ^b.

Tabla 4. Biometría hemática

Variable	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Fórmula roja				
Hemoglobina (g/dL)	15.70 ±1.37	15.90 ±1.36	15.71 ±1.45	0.76 ^a
Hematocrito (%)	47.71 ±4.11	48.98 ±3.97	48.36 ±4.17	0.46 ^a
Eritrocitos (mill/uL)	5.32 ±0.45	5.39 ±0.42	5.37 ±0.47	0.79 ^b
VGM (fl)	89.69 ±3.57	90.74 ±3.73	90.38 ±3.60	0.47 ^b
HGM (pg)	29.55 ±1.36	29.44 ±1.29	29.37 ±1.37	0.87 ^a
CHCM (g/dL)	32.94 ±0.57	32.45 ±0.39	32.47 ±0.51	<0.01 ^a
RDW	13.51 ±0.76	13.76 ±1.03	13.18 ±1.13	0.05 ^b
Fórmula blanca				
Leucocitos (miles/uL)	6.52 ±1.34	6.91 ±1.66	6.57 ±1.44	0.47 ^a
Neutrófilos totales (uL)	3.69 ±1.13	4.03 ±1.44	3.81 ±1.34	0.57 ^a
Neutrófilos segmentados (uL)	3.69 ±1.13	4.03 ±1.44	3.81 ±1.34	0.57 ^a
Eosinófilos (uL)	0.16 ±0.14	0.16 ±0.17	0.16 ±0.18	0.63 ^a
Basófilos (uL)	0.02 ±0.01	0.03 ±0.02	0.05 ±0.03	<0.01 ^a
Linfocitos (uL)	2.16 ±0.48	2.21 ±0.55	2.10 ±0.50	0.67 ^a
Monocitos (uL)	0.48 ±0.12	0.48 ±0.12	0.44 ±0.10	0.31 ^a
Serie plaquetaria				
Plaquetas (miles/uL)	251.54 ±53.09	252.60 ±54.07	276.03 ±54.77	0.09 ^a
VPM (fL)	8.95 ± 0.90	8.51 ± 1.09	7.84 ± 1.34	<0.01 ^a

VGM: Volumen globular medio, HGM: Hemoglobina globular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, RDW: Red blood cell distribution, VPM: Volumen plaquetario medio, Porcentaje de células beta funcionales. Promedio, ± desviación estándar, el valor-p fue calculado con base a: Kruskal-Wallis ^a, Anova.^b.

Los valores reportados en la biometría hemática, reporta que los valores están dentro del rango normal antes y durante la intervención con la cerveza sin alcohol, sin embargo, se pudo observar una disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media ($p < 0.01$) y un aumento de los basófilos ($p < 0.01$) sin embargo los valores se mantienen dentro del rango normal, por lo que se concluye que una cerveza sin alcohol durante 30 días no altera los valores de biometría hemática de los participantes (Tabla 4).

Tabla 5. Perfil hepático

Variable	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Bilirrubina directa (mg/dL)	0.28 ± 0.09	0.26 ± 0.10	0.27 ± 0.11	0.45 ^a
Bilirrubina total (mg/dL)	0.84 ± 0.36	0.82 ± 0.36	0.85 ± 0.42	1.00 ^a
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.55 ± 0.27	0.57 ± 0.26	0.58 ± 0.31	0.90 ^a
AST (U/L)	24.43 ± 8.11	23.03 ± 6.39	22.71 ± 6.78	0.57 ^a
ALT (U/L)	24.94 ±13.63	21.83 ±13.05	23.89 ±15.14	0.54 ^a
Fosfatasa alcalina (U/L)	78.14 ±23.43	74.43 ±19.35	78.63 ±19.93	0.71 ^a

AST: Aspartato aminotransferasa, ALT: Alanina aminotransferasa. Promedio, ± desviación estándar, el valor-p fue calculado con base a: Kruskal-Wallis ^a.

Los valores reportados en el perfil hepático están dentro de los valores normales antes y durante la intervención con la cerveza sin alcohol, por lo que se concluye que una cerveza sin alcohol durante 30 días no altera el perfil hepático de los participantes (Tabla 5).

Tabla 6. Bioquímica sanguínea

Variable	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Glucosa en suero (mg/dL)	86.49 ± 5.95	84.74 ± 6.09	78.51 ± 7.64	<0.01 ^b
Insulina µU/mL	10.52 ± 9.42	9.11 ± 7.13	9.70 ± 4.16	0.30 ^a
HOMA/ IR	2.28 ± 2.10	1.89 ± 1.37	1.90 ± 0.89	0.56 ^a
FCβ (%)	161.40 ±129.50	180.40 ±224.30	271.30 ±268.40	<0.01 ^a

Homa/IR: Homeostatic model assessment/ Insulin resistance., FCβ (%): Porcentaje de células beta funcionales. Promedio, ± desviación estándar, el valor-p fue calculado con base a: Kruskal-Wallis^a, Anova.^b.

De los valores reportados de bioquímica sanguínea, los valores de insulina y el HOMA/ IR están dentro del rango de valores normales, sin embargo, los valores de glucosa disminuyeron (<0.01) y el porcentaje de células β funcionales aumentó (<0.01) por lo que se concluye que una cerveza sin alcohol durante 30 días podría disminuir la glucosa en suero sin alterar los resultados de la bioquímica sanguínea de su rango normal en los participantes (Tabla 6).

Tabla 7. Perfil lipídico

Variable	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Colesterol total (mg/dL)	197.63 ± 32.80	193.29 ±38.48	197.14 ±35.11	0.70 ^a
Triglicéridos (mg/dL)	133.90 ±114.40	114.90 ±60.60	134.70 ±89.60	0.61 ^a
HDL (mg/dL)	48.69 ± 9.07	50.66 ± 9.73	49.20 ± 9.52	0.66 ^b
Índice aterogénico	4.24 ± 1.23	3.95 ± 1.07	4.20 ± 1.24	0.49 ^a
LDL (mg/dL)	123.10 ± 31.42	119.64 ±34.04	123.61 ±32.75	0.75 ^a
VLDL (mg/dL)	25.99 ± 21.77	22.73 ±14.76	24.46 ±18.84	0.66 ^a

HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Liproteína de baja densidad, VLDL: Lipoproteína de muy baja desidad. Porcentaje de células beta funcionales. Promedio, ± desviación estándar, el valor-p fue calculado con base a: Kruskal-Wallis^a, Anova.^b.

Los valores reportados en el perfil lipídico, los valores del perfil lipídico están dentro de los valores normales antes y durante la intervención con la cerveza sin alcohol, por lo que se concluye que una cerveza sin alcohol durante 30 días no altera el perfil lipídico de los participantes (Tabla 7).

Tabla 8. Perfil de inflamación

Variable	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Perfil de inflamación				
Proteína C reactiva (mg/dL)	1.64 ±1.65	4.55 ±17.47	3.32 ±8.07	0.97 ^a
VSG (mm/H)	2.43 ±1.31	2.77 ± 2.32	3.29 ±3.55	0.86 ^a

PCr: Proteína C reactiva, VSG: Velocidad de sedimentación globular. Promedio, ± desviación estándar el valor-p fue calculado con base a: Kruskal-Wallis ^a.

Los valores reportados en el perfil inflamación están dentro de los valores normales antes y durante la intervención con la cerveza sin alcohol, por lo que se concluye que una cerveza sin alcohol durante 30 días no altera el perfil de inflamación de los participantes (Tabla 8).

Como conclusión de los estudios de biometría hemática, perfil hepático, bioquímica sanguínea, perfil lipídico y de inflamación, se concluye que el consumo de una cerveza lager sin alcohol de 355 mL durante 30 días no altera los valores de biometría hemática, perfil hepático, lipídico; sin embargo, se encontró que puede bajar los niveles de glucosa y aumentar el porcentaje de células β funcionales.

Resultados del Objetivo específico 3. *Crear una biblioteca de copro DNA de las muestras de los participantes.*

A partir de las muestras de copro de los participantes se extrajo el DNA total y se pasó por electroforesis capilar en un gel de agarosa al 0.5 % para observar la integridad del DNA (Figura 10), posteriormente se amplificó la región V3 del gen 16S ribosomal usando los primer barcode V3 341F específico por muestra (Anexos, tabla de barcodes utilizados por muestra) y V3 518 R (Figura 10) para tener un producto de PCR de 281 pb (Figura 11).

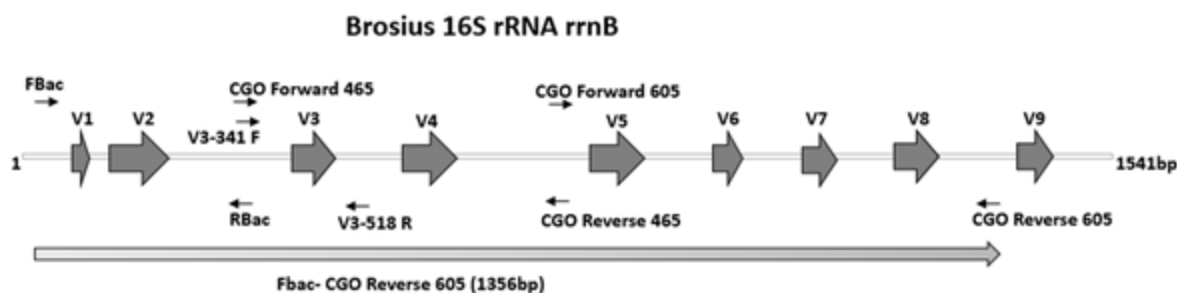


Figura 10. Esquema de la región V3 del gen 16S ribosomal amplificada (García-Mena *et al.*, 2016).

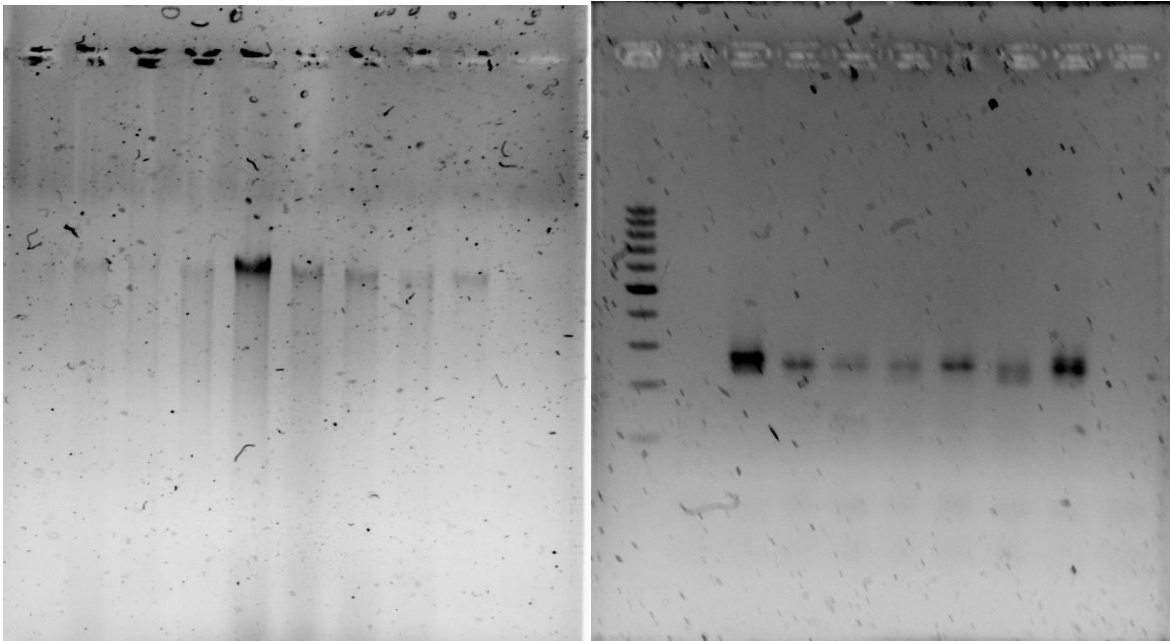


Figura 11. Gel de agarosa al 0.5 % para DNA genómico y gel de agarosa al 2 % para productos de PCR de la región V3 del gen 16S ribosomal con barcodes.

Después de la secuenciación masiva se analizaron los datos para determinar la abundancia relativa de la microbiota intestinal por *phylum*, se observó un aumento relativo de los Bacteroidetes al analizar a los 35 participantes y una disminución relativa de los Firmicutes (Figura 12) y también cuando se analizaron los datos por género; donde además se observa que el aumento relativo de Bacteroidetes y la disminución de los Firmicutes es más evidente en el género femenino (Figura 13).

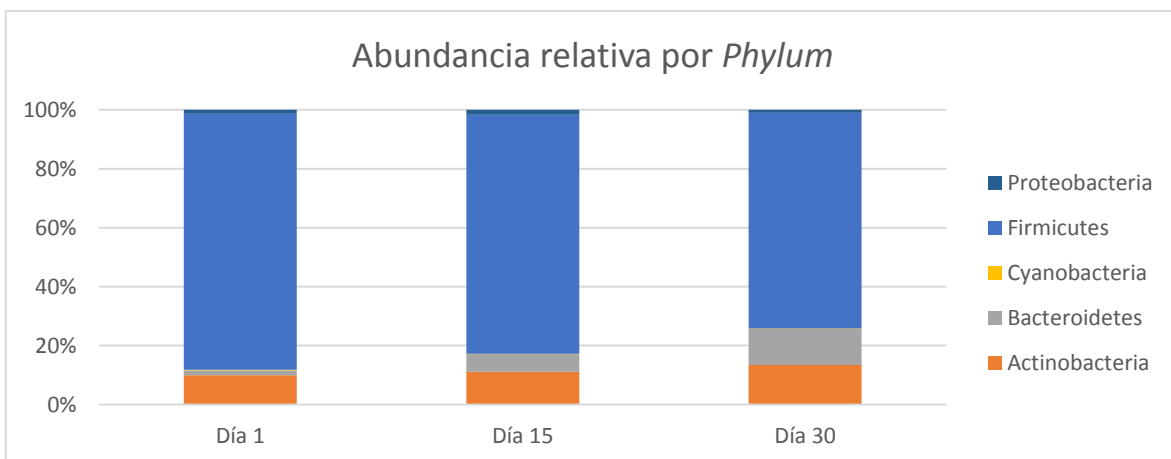


Figura 12. Abundancia relativa por *phylum* de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol por grupo.

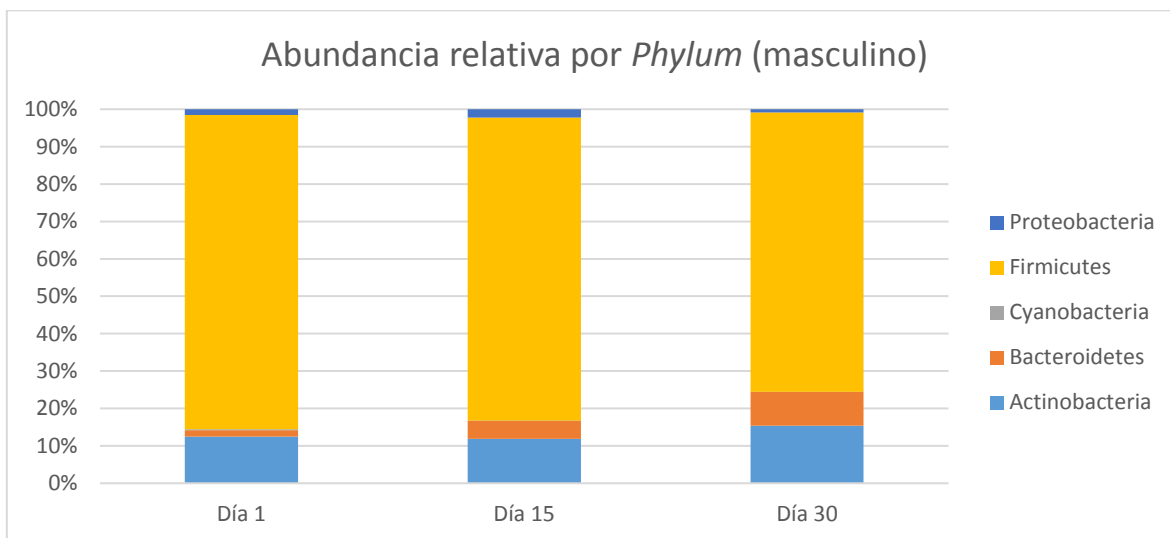
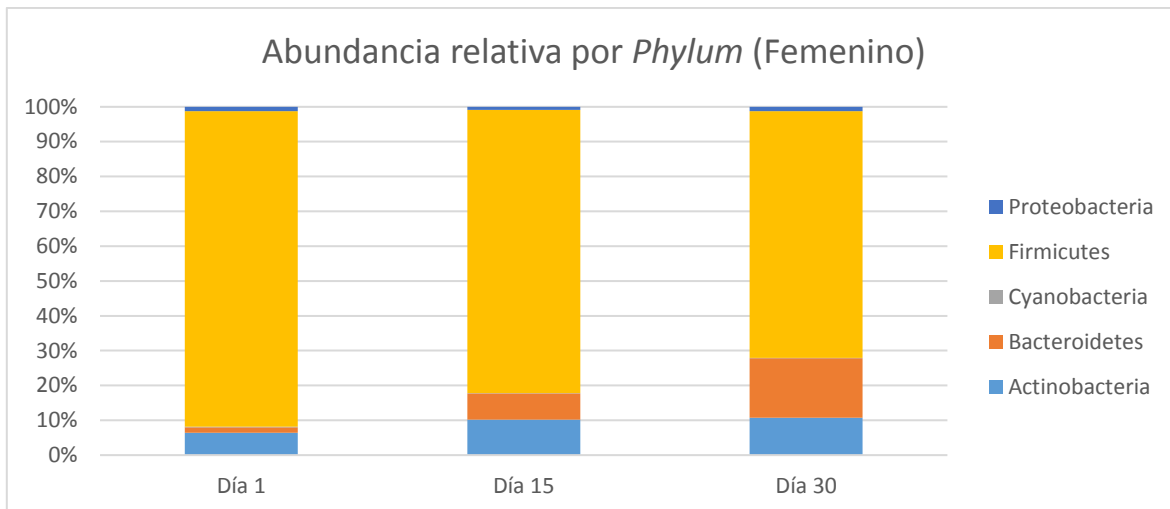


Figura 13. Abundancia relativa por *phylum* de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol por género.

Una vez realizado el análisis por *phylum* se procedió a determinar la microbiota intestinal por género bacteriano, donde se observó el aumento relativo de *Bacteroides* spp. y de *Bifidobacterium* spp., con una disminución relativa de la familia *Lachnospiraceae* y del orden de *Clostridiales* cuando se analizan los datos de los 35 participantes (Figura 14). Cuando se analizaron los datos por género se observó que el aumento relativo de *Bacteroides* spp. y de *Bifidobacterium* spp., con una disminución relativa de la familia *Lachnospiraceae* y del orden de *Clostridiales* es más evidente en el género femenino (Figuras 15 y 16)

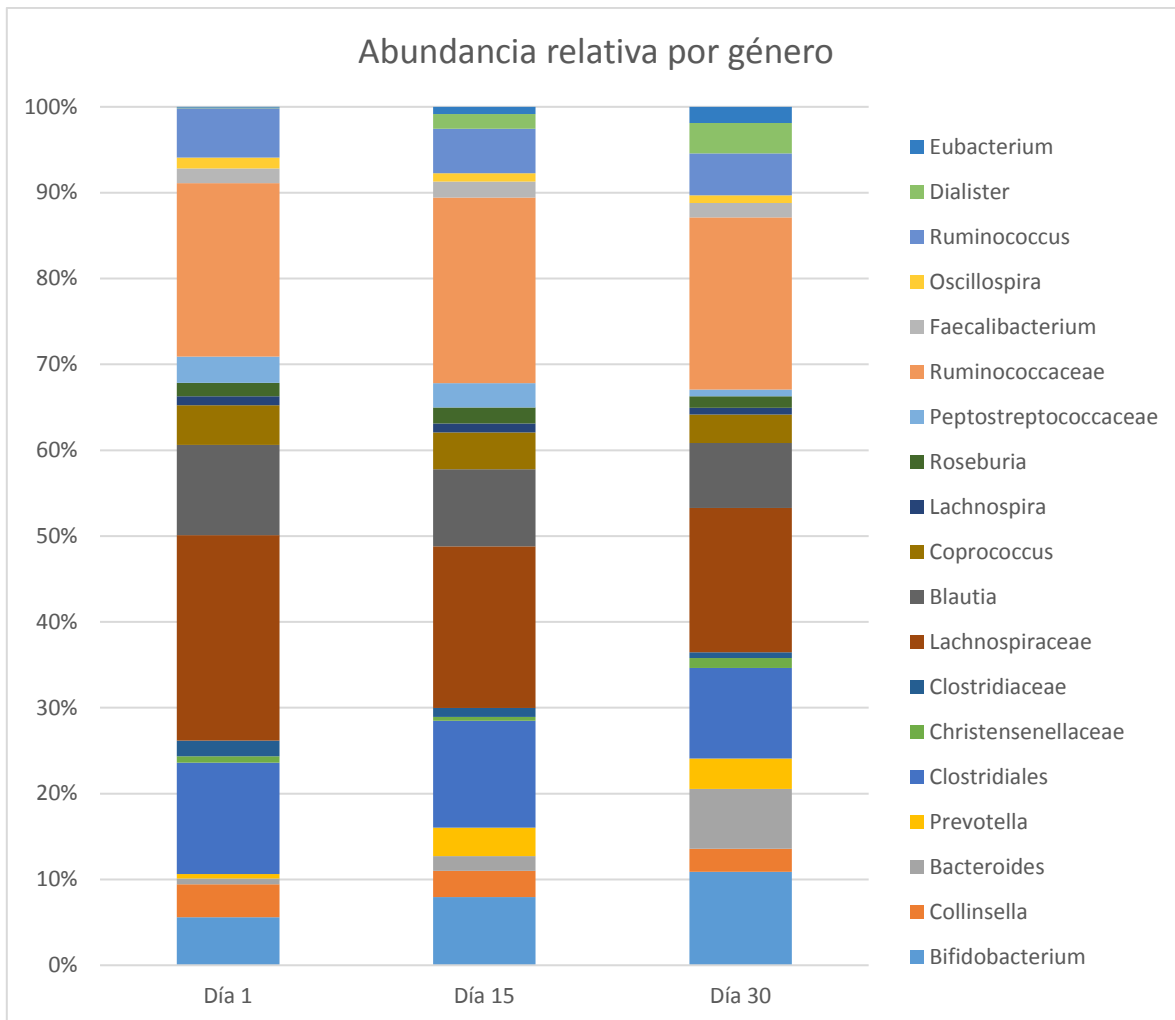


Figura 14. Abundancia relativa por género bacteriano de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol por grupo.

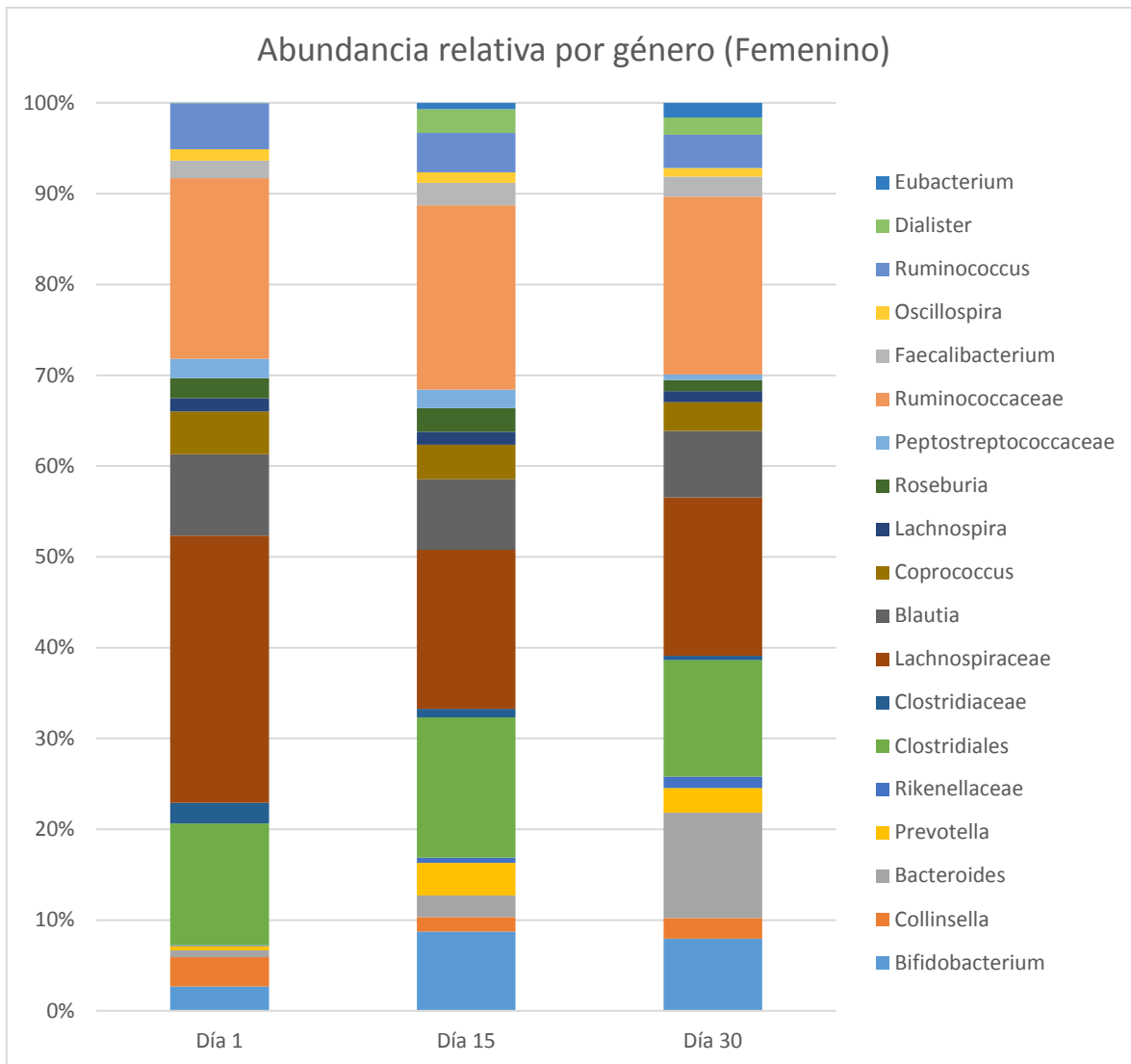


Figura 15. Abundancia relativa por género bacteriano de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol en género femenino.

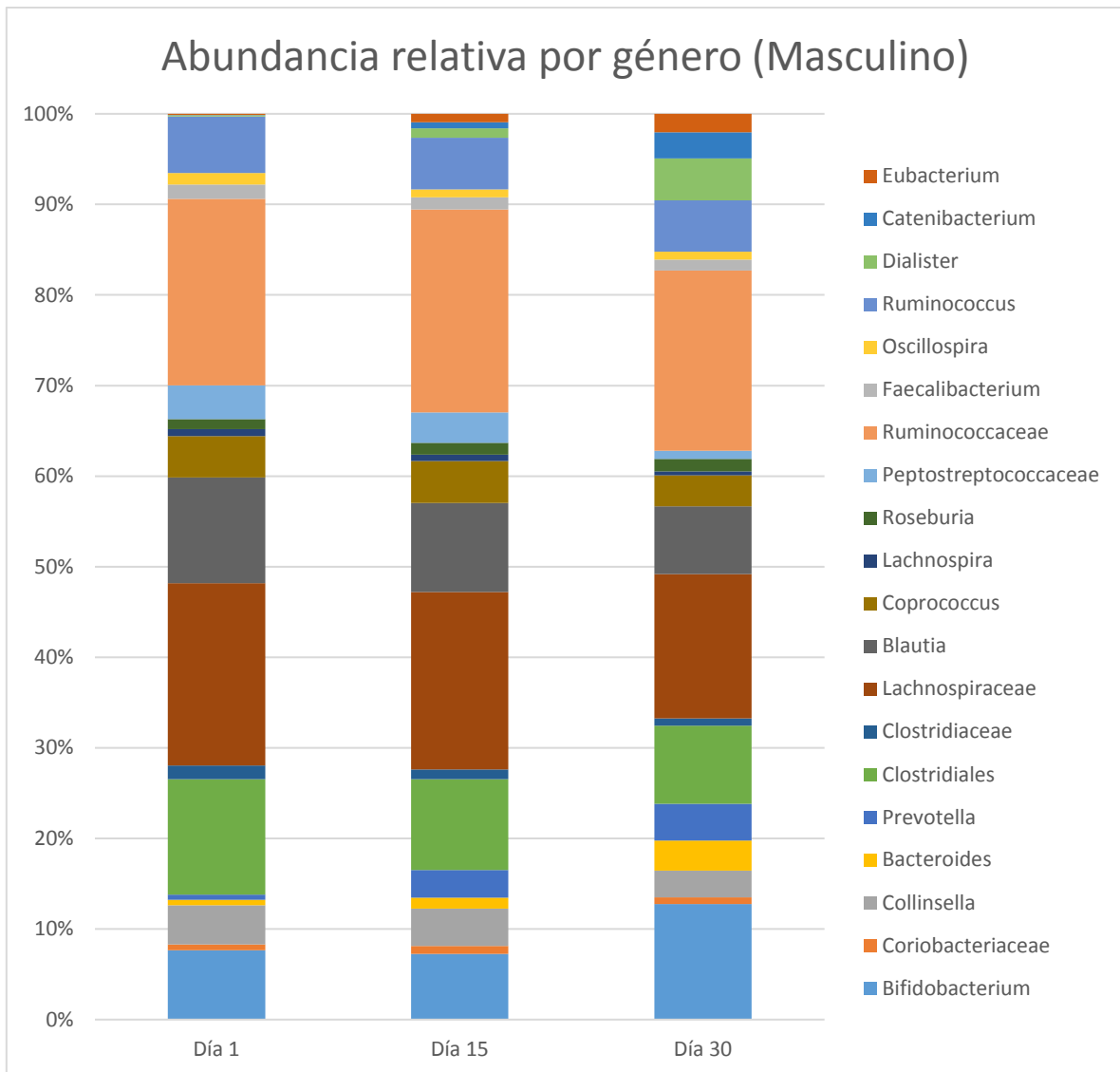


Figura 16. Abundancia relativa en por género bacteriano de la microbiota intestinal durante la intervención con cerveza sin alcohol en género masculino.

Con los datos obtenidos de la secuenciación masiva se concluye que: el *phylum* de los Bacteroidetes aumenta y el de los Firmicutes disminuye en las abundancias relativas; y a nivel de género bacteriano aumenton *Bacteroides* spp. y *Bifidobacterium* spp., con una disminución relativa de la familia *Lachnospiraceae* y del orden de *Clostridiales*; donde los resultados son más evidentes en el género femenino.

Resultados del Objetivo específico 4. Cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta.

Cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta en heces

Se cuantificaron los AGCC (ácido acético, propiónico y butírico) de las muestras de copro (Figura 17) y no se observó ninguna diferencia en la producción de los mismos (Figura 18).

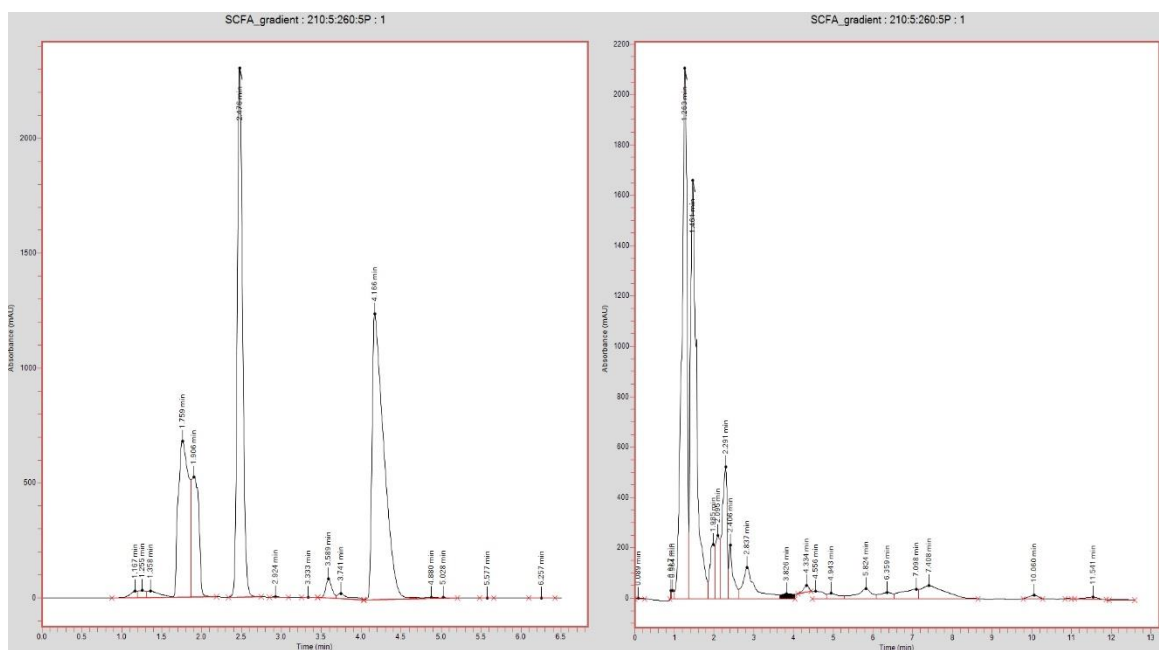


Figura 17. Cromatograma de estándares de AGCC a 500 mM (izquierda) y AGCC en muestra de heces (derecha). Tiempo de retención de los AGCC, ácido acético (1.75 min), ácido propiónico (2.42 min) y ácido butírico (4.16).

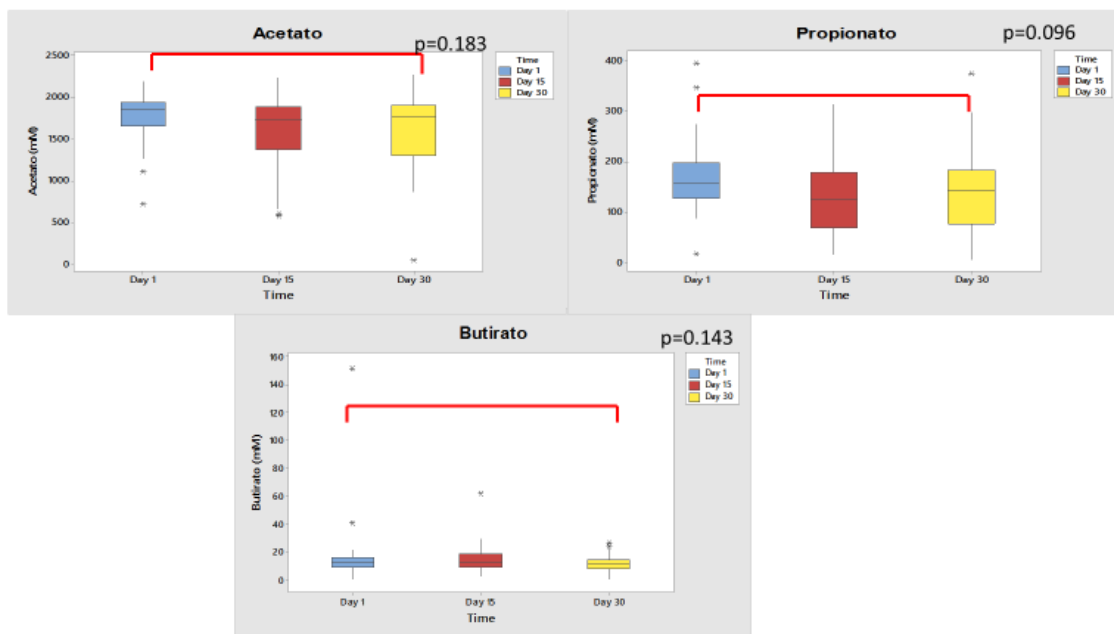


Figura 18. Cuantificación de los AGCC, acetato, propionato y butirato. Se observa que la concentración (mM) de los AGCC contra el tiempo de toma de las muestras (día 1, 15 y 30), no se observa ninguna diferencia en la producción de los AGCC (acetato $p=0.183$, propionato $p=0.096$ y butirato $p=0.143$, calculadas con Kruskal-Wallis).

Con los datos obtenidos de la cuantificación de los AGCC se observa que, si hay una producción de los mismos en los participantes, sin embargo, no hay aumento ni disminución de la producción de los mismos durante la intervención con una cerveza lager sin alcohol de 355 mL durante 30 días.

Cuantificación de xantohumol en la cerveza sin alcohol y suero sanguíneo

Se analizó la cerveza lager sin alcohol en lata de 355 usada en el estudio para determinar la presencia de xantohumol, con la curva de calibración de 0.05 mg/L a 5 mg/L ($R= 0.9996$) (Figura 19) no se pudo determinar la presencia del xantohumol en la cerveza ni en suero sanguíneo, sin embargo, hay un patrón un patrón similar de componentes tanto en cerveza como en el suero sanguíneo cuando se analizan por HPLC (Figura 20), los cuales pueden ser los otros componentes polifénolicos de la cerveza tales como: ácidos alfa (humulonas e isohumulonas), ácidos beta (Lupulonas) o 8-prenilnaringenina.

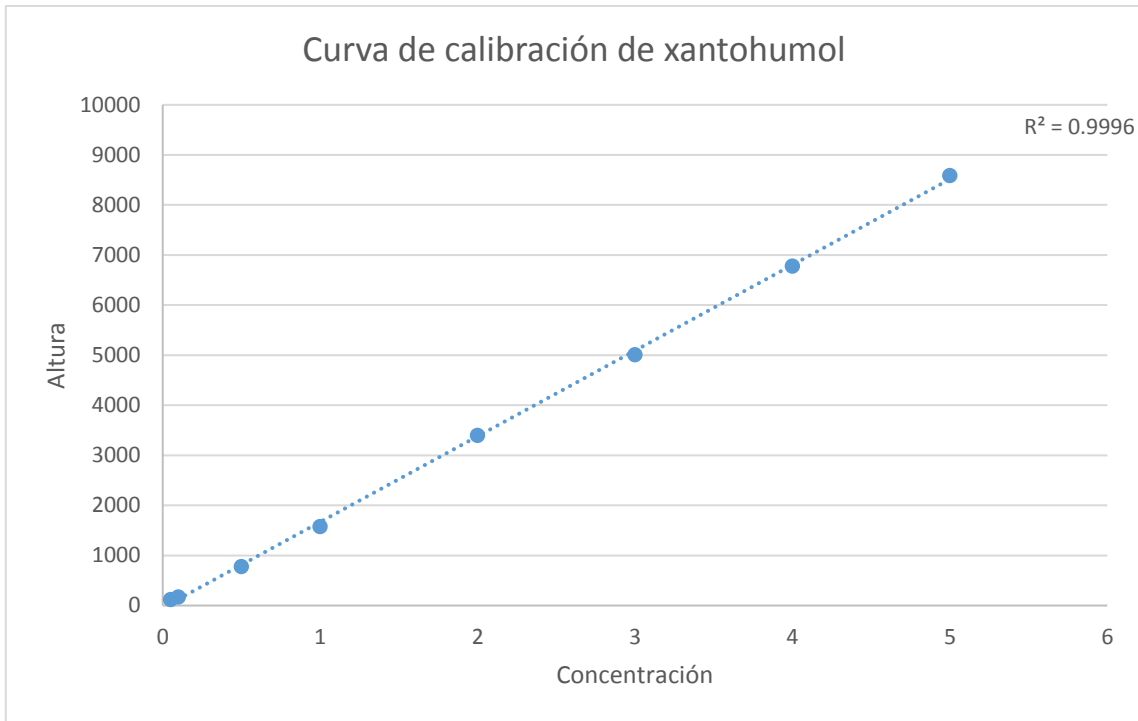


Figura 19. Curva de calibración para xantohumol. Altura de la absorbancia del estándar contra la concentración de xantohumol (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L).

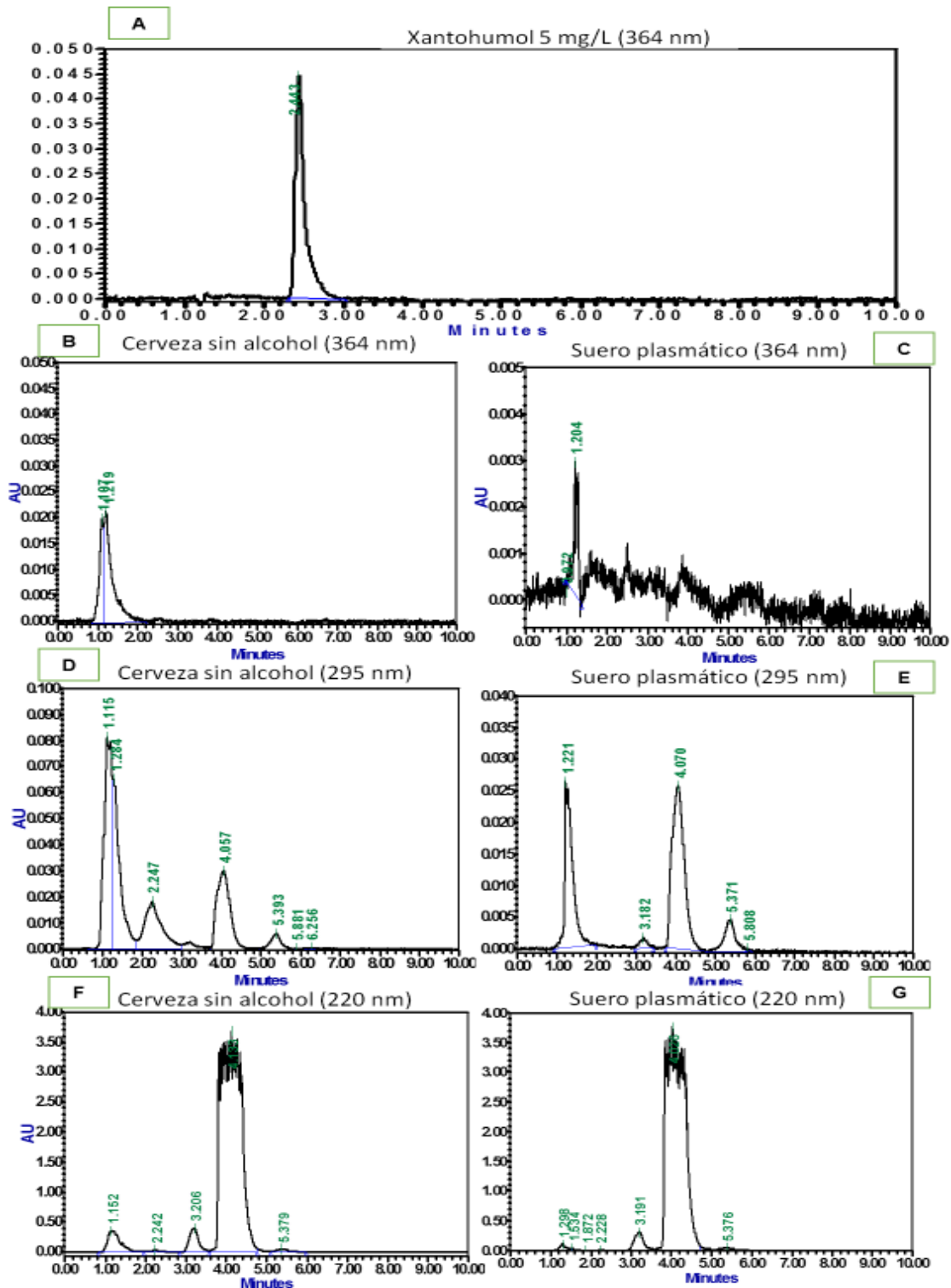


Figura 20. Análisis de los componentes de cerveza. Estándar de xantohumul ANALIZADO A 364 nm (A), cerveza sin alcohol analizado a 364 nm (B), muestra de suero sanguíneo analizada a 364 nm (C), cerveza sin alcohol analizado a 295 nm (D), muestra de suero sanguíneo analizada a 295 nm (E), cerveza sin alcohol analizado a 220 nm (F) y muestra de suero sanguíneo analizada a 220 nm (G). Tiempo de retención del xantohumul (2.43 min).

Resultados del Objetivo específico 5. *Analizar los datos para determinar si hay una asociación del consumo de cerveza sin alcohol con los resultados obtenidos.*

Asociación de abundancias de bacterias con los días de intervención con cerveza sin alcohol.

El análisis LEfSe, el cual usa tres herramientas estadísticas (LDA, Kruskal-Wallis y el índice de Bonferroni,), cuando se analizan los datos de los 35 participantes como grupo, se pudo determinar la presencia significativa de las abundancias relativas bacterianas donde los resultados fueron (Figura 21 y Tabla 9)

Tabla 9. Bacterias con aumento en su abundancia relativa con el consumo de cerveza sin alcohol durante 30 días analizando con LEfSe

Bacteria	Nivel taxonómico
Día 1	
Firmicutes	<i>Phylum</i>
<i>Lachnospiraceae</i>	Familia
<i>Ruminococcaceae</i>	Familia
Día 15	
<i>Gammaproteobacteria</i>	Clase
<i>Enterobacteriales</i>	Orden
<i>Actinomycetaceae</i>	Familia
<i>Cryomorphaceae</i>	Familia
<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
<i>Pseudonocardia</i> spp.	Género
Día 30	
Bacteroidetes	<i>Phylum</i>
<i>Bacteroidia</i>	Clase
<i>Erysipelotrichi</i>	Clase
<i>Bacilli</i>	Clase
<i>Bacillales</i>	Orden
<i>Erysipelotrichales</i>	Orden
<i>Barnesiellaceae</i>	Familia
<i>Erysipelotrichaceae</i>	Familia
<i>Prevotellaceae</i>	Familia
<i>Rikenellaceae</i>	Familia
<i>Streptococcaceae</i>	Familia
<i>Bacteroides</i> spp.	Género
<i>Dialister</i> spp.	Género
<i>Eubacterium</i> spp.	Género
<i>Lactobacillus</i> spp.	Género
<i>Parabacteroides</i> spp.	Género
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	Género
<i>Prevotella</i> spp.	Género
<i>Ruminococcus</i> spp.	Género

<i>Streptococcus</i> spp.	Género
<i>Sutterverella</i> spp.	Género
<i>Variovorax</i> spp.	Género

Adicionalmente se realizó un análisis de la diversidad bacteriana mediante el análisis de los componentes principales (PCA) con el cual se pudo observar que la diversidad bacteriana durante el consumo de cerveza sin alcohol no cambia; lo que nos indica que lo único que cambia durante un mes de consumo de cerveza sin alcohol no modifica la diversidad bacteriana, sólo la abundancia de las bacterias (Figura 21).

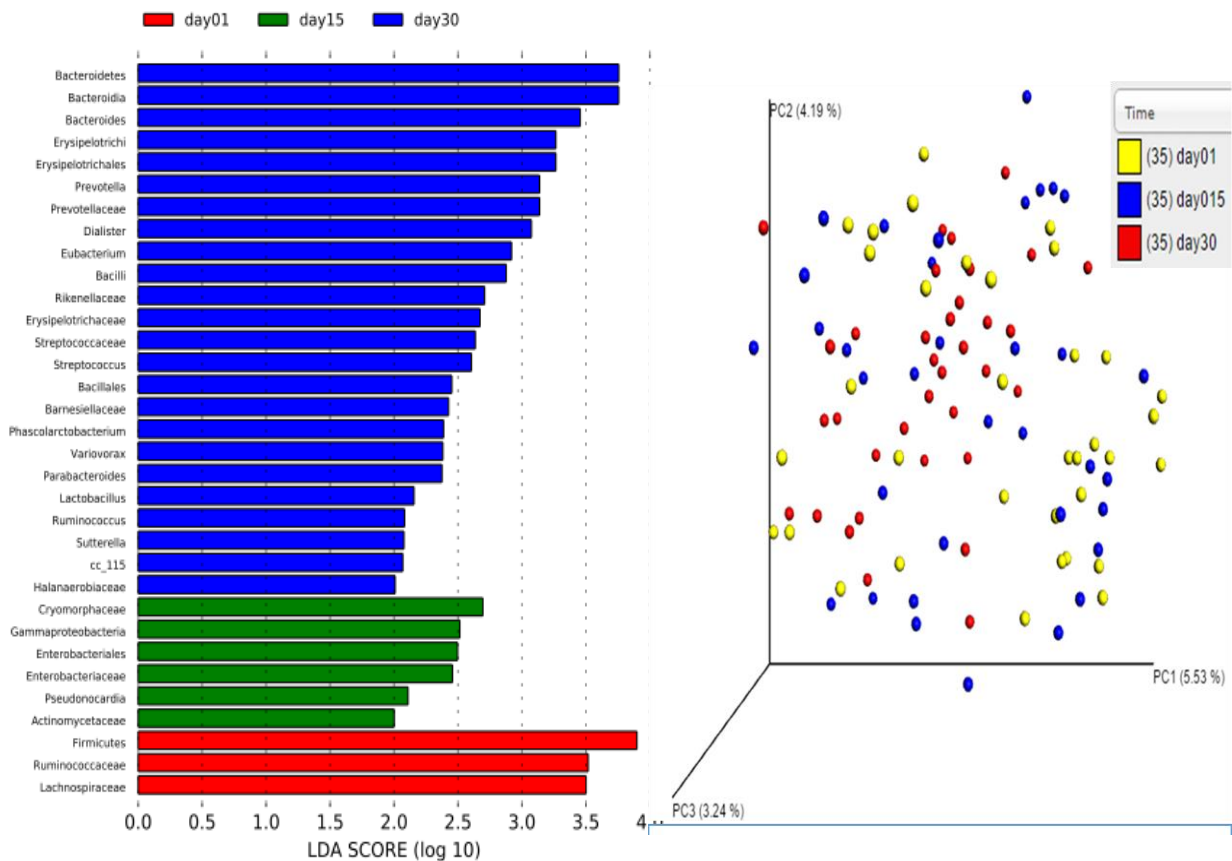


Figura 21. Análisis LefSe de las abundancias relativas y β diversidad. La abundancia relativa de algunas familias y géneros bacterianos aumentan el día 15 y el día 30 aún más comparando con el día 1 (Izquierda). Análisis de la diversidad bacteriana de las muestras de copro por tiempo (día 1, 15 y 30), donde se puede ver que la diversidad bacteriana no cambia durante los 30 días de consumo de la cerveza sin alcohol (derecha).

Después de observar los resultados del cambio significativo de las abundancias relativas, se repitió el análisis de LefSe, pero agrupando los 35 participantes por

género femenino (Figura 22 y Tabla 10) y masculino (Figura 23 y Tabla 11). Donde se pudo observar un aumento del *phylum* Bacteroidetes y los géneros *Bacteroides* spp. y *Parabacteroides* spp. en el día 30, lo cual concuerda con lo esperado en este estudio.

Tabla 10. Bacterias con aumento en su abundancia relativa en el grupo femenino que consumió una cerveza sin alcohol durante 30 días analizando con LEfSe

Bacteria	Nivel taxonómico
Día 1	
Firmicutes	<i>Phylum</i>
<i>Lachnospiraceae</i>	Familia
Día 15	
<i>Actinomycetaceae</i>	Familia
<i>Butyrivibrio</i> spp.	Género
<i>Mitsuokella</i> spp.	Género
Día 30	
Bacteroidetes	<i>Phylum</i>
Proteobacteria	<i>Phylum</i>
Thermotogae	<i>Phylum</i>
<i>Bacteroidia</i>	Clase
<i>Gammaproteobacteria</i>	Clase
<i>Deltaproteobacteria</i>	Clase
<i>Desulfovibrionales</i>	Orden
<i>Enterobacteriales</i>	Orden
<i>Erysipelotrichales</i>	Orden
<i>Halanaerobiales</i>	Orden
<i>Thermotogales</i>	Orden
<i>Actinosynnemataceae</i>	Familia
<i>Beijerinckiaceae</i>	Familia
<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
<i>Erysipelotrichaceae</i>	Familia
<i>Rikenellaceae</i>	Familia
<i>Staphylococcaceae</i>	Familia
<i>Streptococcaceae</i>	Familia
<i>Thermotogaceae</i>	Familia
<i>Actinomyces</i> spp.	Género
<i>Aeromicrobium</i> spp.	Género
<i>Arcobacter</i> spp.	Género
<i>Bacteroides</i> spp.	Género
<i>Bilophila</i> spp.	Género
<i>Dialister</i> spp.	Género
<i>Erysipelotrichi</i> spp.	Género
<i>Lactobacillus</i> spp.	Género
<i>Parabacteroides</i> spp.	Género
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	Género
<i>Solibacillus</i> spp.	Género
<i>Staphylococcus</i> spp.	Género
<i>Streptococcus</i> spp.	Género

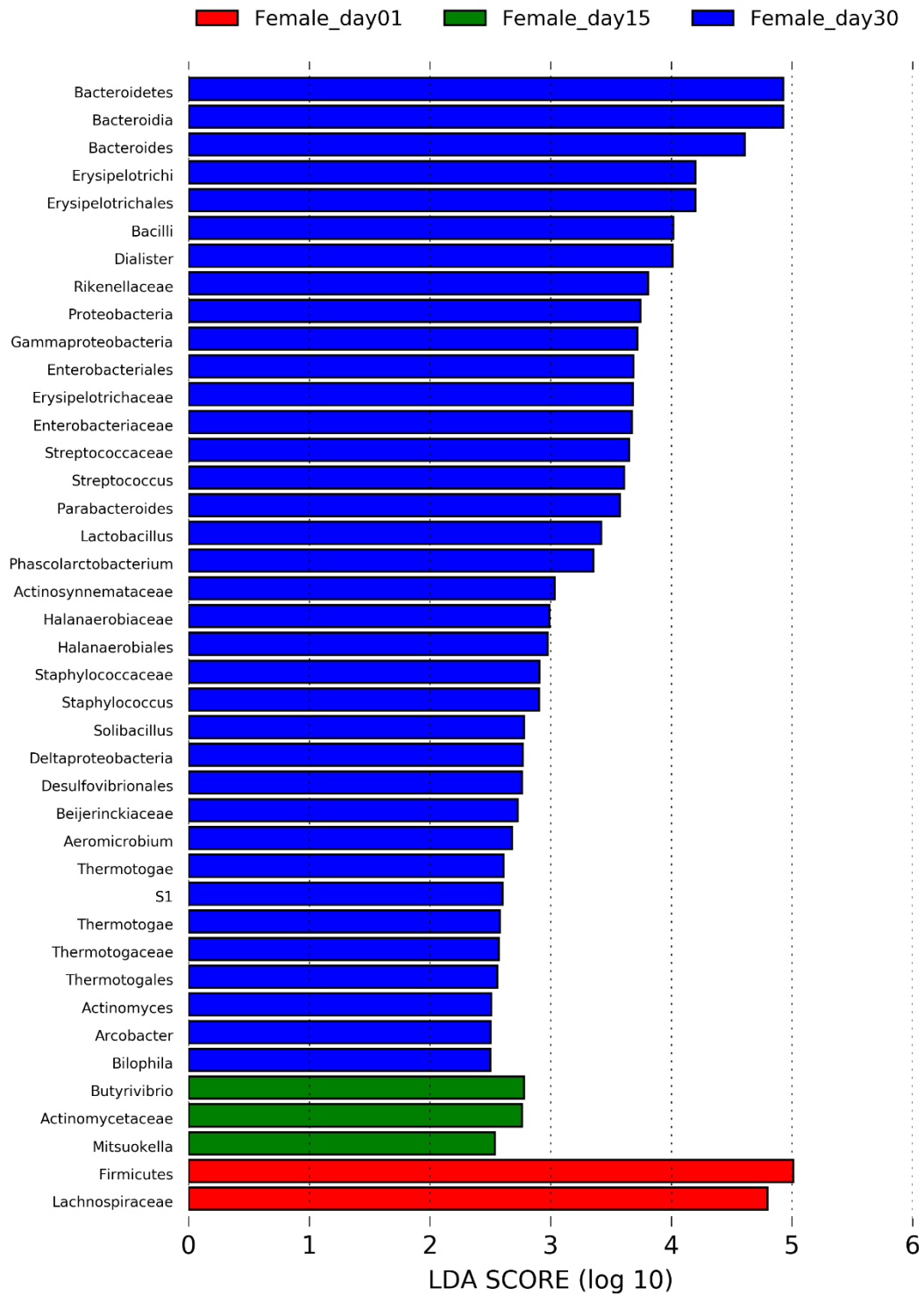


Figura 22. Análisis LEfSe de las abundancias relativas por género (femenino). La abundancia relativa de algunas familias y géneros bacterianos aumentan el día 15 y el día 30 aún más comparando con el día 1.

Tabla 11. Bacterias con aumento en su abundancia relativa en el grupo masculino que consumió una cerveza sin alcohol durante 30 días analizando con LEfSe

Bacteria	Nivel taxonómico
Día 1	
Firmicutes	<i>Phylum</i>
<i>Clostridiales</i>	Orden
Día 15	
<i>Gammaproteobacteria</i>	Clase
<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
<i>Mesorhizobium</i> spp.	Género
Día 30	
Bacteroidetes	<i>Phylum</i>
<i>Bacilli</i>	Clase
<i>Bacteroidia</i>	Clase
<i>Erysipelotrichales</i>	Orden
<i>Enterobacteriales</i>	Orden
<i>Erysipelotrichales</i>	Orden
<i>Halanaerobiales</i>	Orden
<i>Termotogales</i>	Orden
<i>Erysipelotrichaceae</i>	Familia
<i>Streptococcaceae</i>	Familia
<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
<i>Bacteroides</i> spp.	Género
<i>Catonella</i> spp.	Género
<i>Dialister</i> spp.	Género
<i>Erysipelotrichi</i> spp.	Género
<i>Lactobacillus</i> spp.	Género
<i>Parabacteroides</i> spp.	Género
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	Género
<i>Rumonococcus</i> spp.	Género
<i>Streptococcus</i> spp.	Género
<i>Variovorax</i> spp.	Género
<i>Veillonella</i> spp.	Género

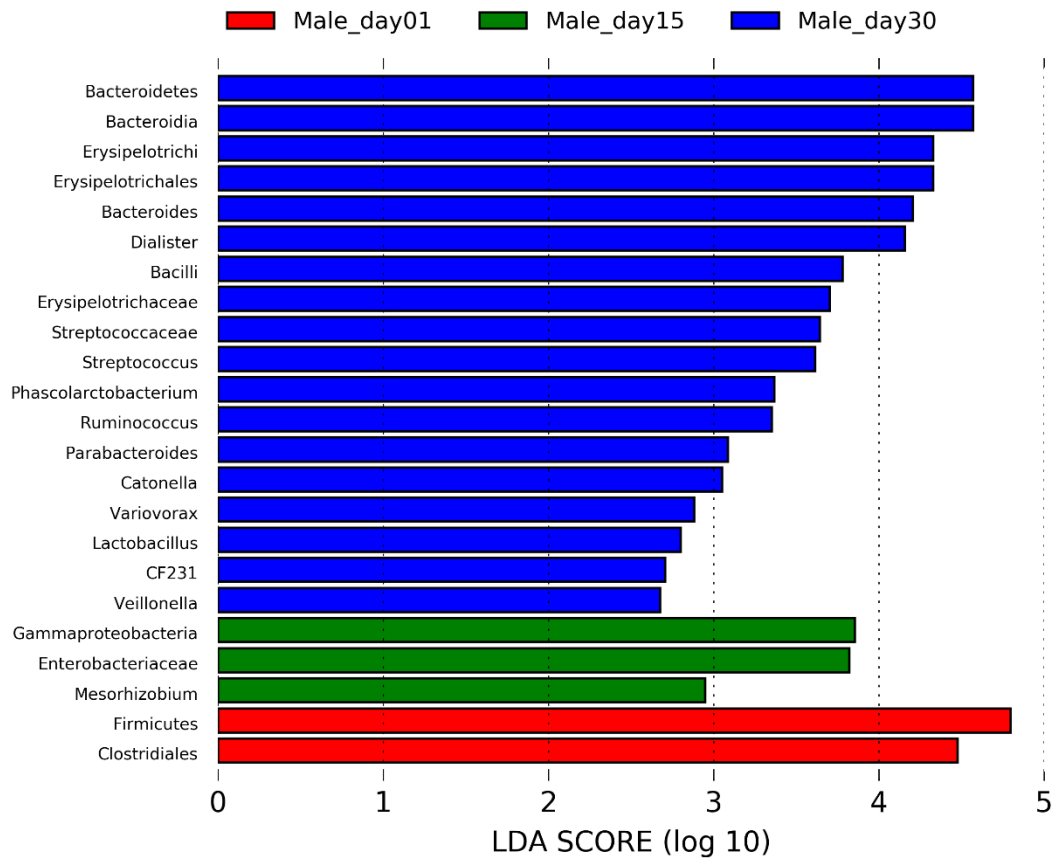


Figura 23. Análisis LEfSe de las abundancias relativas por género (masculino). La abundancia relativa de algunas familias y géneros bacterianos aumentan el día 15 y el día 30 aún más comparando con el día 1.

Después de realizar los análisis de abundancias relativas y de LEfSe se calcularon los valores de α diversidad con los índices de riqueza (Shao 1) y de diversidad (Shannon y Simpson). Cuando se analizaron por grupo dichos valores se observó que sólo es estadísticamente significativo el índice de Shannon ($p=0.028$). Lo cual nos indica que no hubo un cambio en la riqueza de las poblaciones bacterianas, sólo en el índice de diversidad de Shannon, tomando en cuenta los valores de α diversidad (Figura 24).

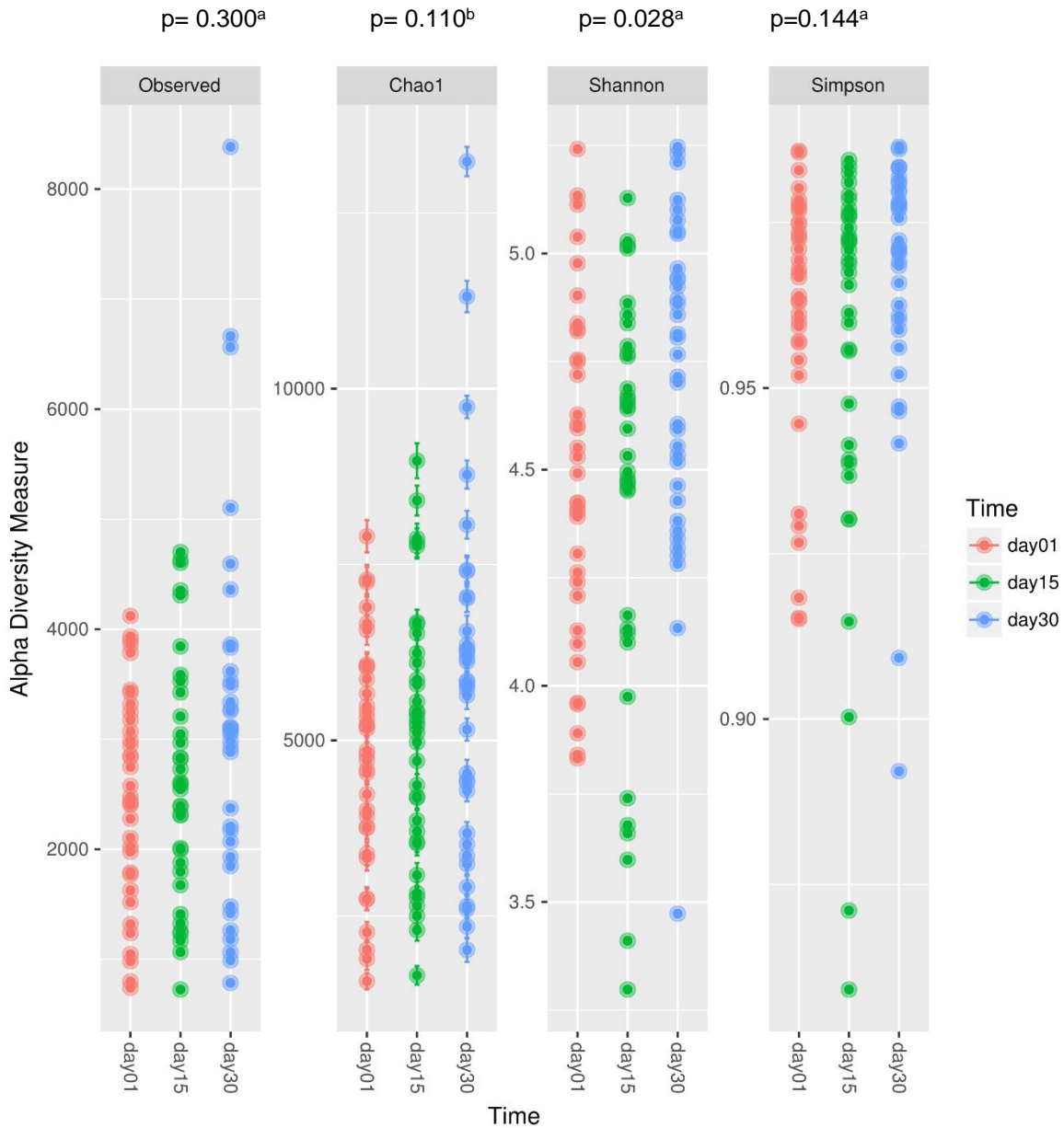


Figura 24. Análisis de alfa diversidad de los participantes por grupo. Observed: Riqueza de especies observadas; Chao1: Estimado de riqueza de especies; Shannon: Índice de diversidad Shannon-Wiener; Simpson: Índice de diversidad de Simpson. Datos estadísticos promedio \pm desviación estándar. Los valores p fueron calculados con: a Kruskal–Wallis y b ANOVA. Un valor $p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo.

Posteriormente se separaron los datos por género (femenino y masculino) para calcular los valores de α diversidad con los índices de riqueza (Shao 1) y de diversidad (Shannon y Simpson). Cuando se analizaron por grupo dichos valores se observó que sólo es estadísticamente significativo el índice de Shannon ($p=0.036$) en mujeres. Lo cual nos indica que no hubo un cambio en la riqueza de

las poblaciones bacterianas, sólo en el índice de diversidad de Shannon en el género femenino, tomando en cuenta los valores de α diversidad (Figura 25).

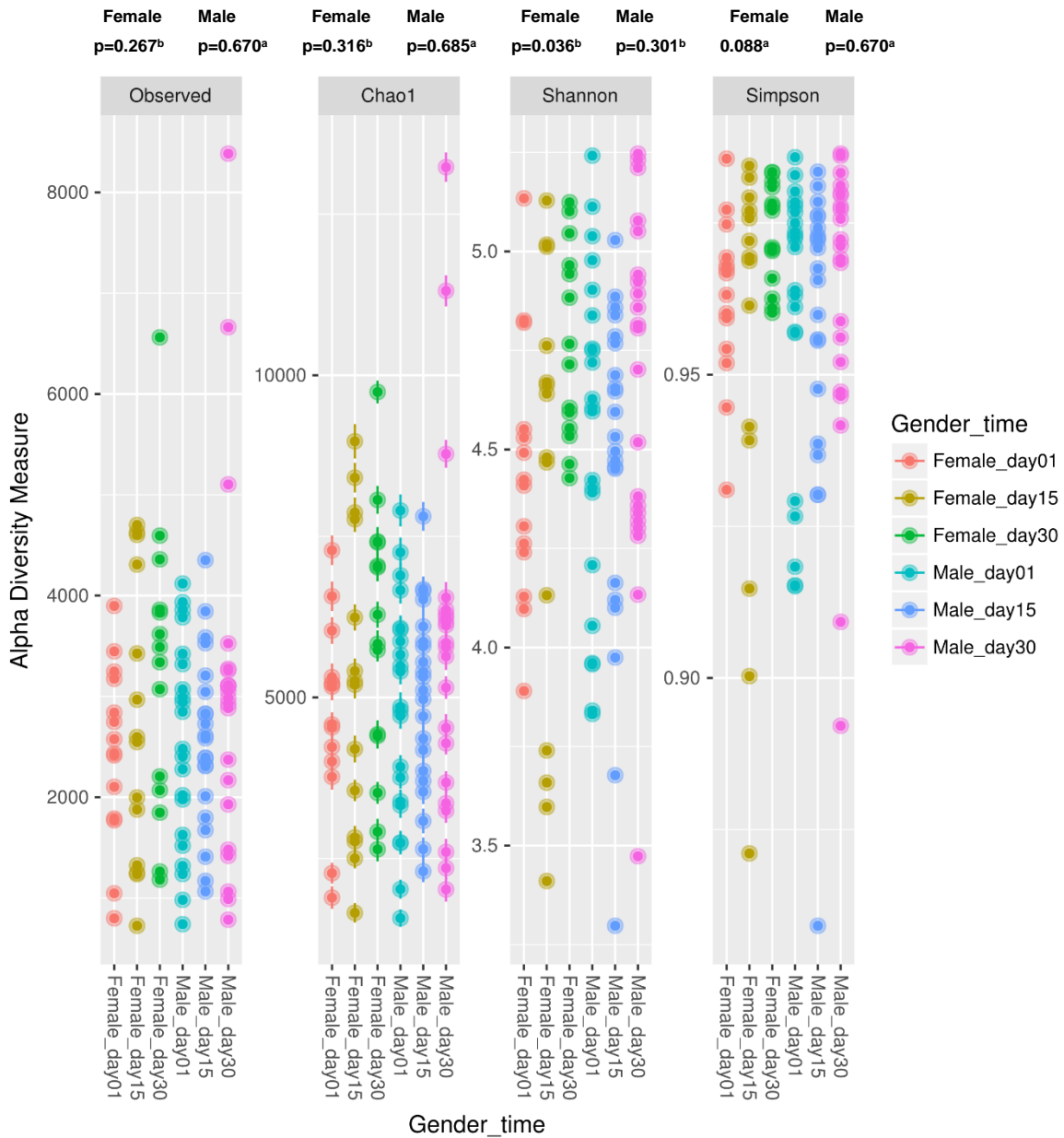


Figura 25. Análisis de alfa diversidad de los participantes por género. Observed: Riqueza de especies observadas; Chao1: Estimado de riqueza de especies; Shannon: Índice de diversidad Shannon-Wiener; Simpson: Índice de diversidad de Simpson. Datos estadísticos promedio \pm desviación estándar. Los valores p fueron calculados con: a Kruskal–Wallis y b ANOVA. Un valor $p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo.

Análisis de la asociación de la diversidad de la microbiota con el tiempo de intervención con cerveza sin alcohol.

Para poder ver si hay algún cambio estadísticamente significativo en alguna bacteria en particular, se utilizó la herramienta estadística Asociación Multivariable con Modelos Lineales (MaAsLin), con el cual se analizaron los datos de las abundancias relativas de los participantes por grupo contra tiempo, y usando los valores p (<0.050) y q (<0.025). Se puede ver un aumento de la familia *Erysipelotrichaceae* (Figura 26), género *Streptococcus* spp. (Figura 27). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fue significativa de acuerdo a los valores de p y q simultáneamente (Tabla 12, Anexo 3).

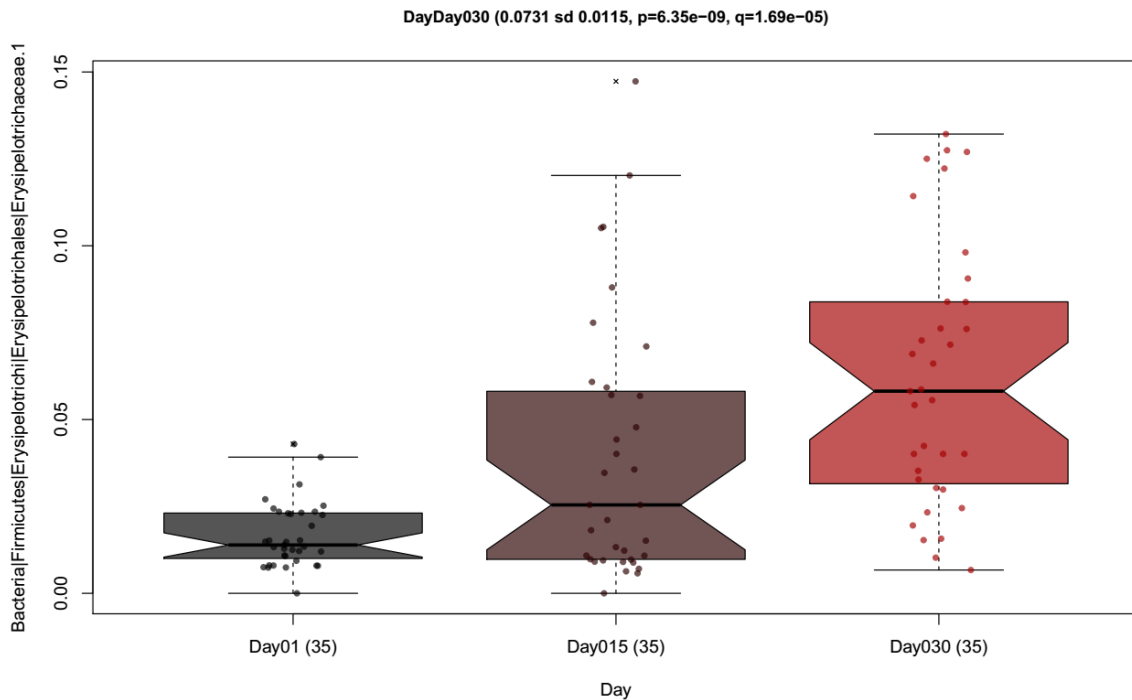


Figura 26. Análisis MaAsLin de los participantes por grupo. Se realizó una comparación de los datos de abundancia bacteriana, y agrupando por tiempo (día 1, 15 y 30). Se observa un aumento de la familia *Erysipelotrichaceae*.

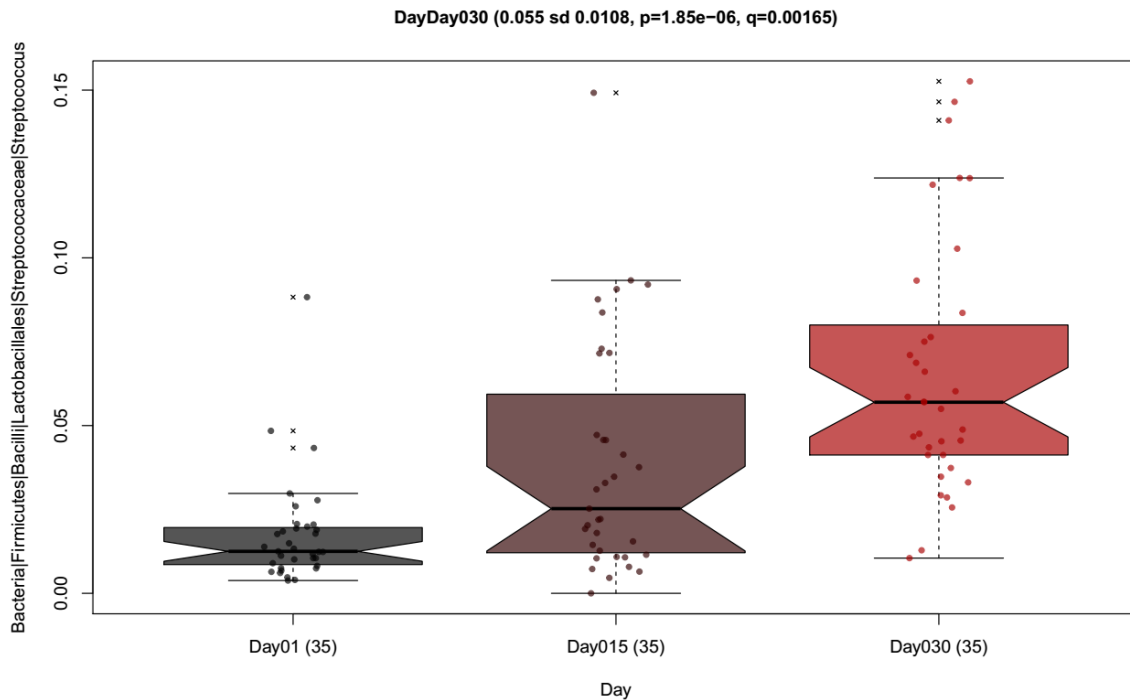


Figura 27. Análisis MaAsLin de los participantes por grupo. Se realizó una comparación de los datos de abundancia bacteriana, y agrupando por tiempo (día 1, 15 y 30). Se observa un aumento del género de *Streptococcus* spp.

Tabla 12. Bacterias analizadas por MaAsLin que no se variaron significativamente durante la intervención con base al valor de p y q simultáneamente.

Bacteria	Nivel taxonómico	valor p	valor q	Número de figura
<i>Clostridiales</i>	Orden	***<0.001	0.071	42, Anexo 3
<i>Staphylococcus</i> spp.	Género	***<0.001	0.088	43, Anexo 3
<i>Bacteroides</i> spp.	Género	***<0.001	0.088	44, Anexo 3

El valor “p” indica si el resultado es estadísticamente significativo (el mínimo aceptado es 0.050) y el valor de “q” indica la validez de los datos que reporta “p” (el mínimo aceptable es 0.025).

Análisis de la asociación de la diversidad de la microbiota con los metadatos durante la intervención con cerveza sin alcohol.

Una vez determinados las bacterias puntuales que se modifican durante el consumo de cerveza sin alcohol, se utilizó la herramienta estadística Asociación Multivariable con Modelos Lineales (MaAsLin), con el cual se analizaron los datos de las abundancias relativas de los participantes por grupo contra los metadatos.

Asociación de niveles de glucosa en suero con abundancia relativa de la microbiota intestinal

Las bacterias que están relacionadas negativamente con la concentración de glucosa en suero, es decir, cuando están presentes en mayor abundancia relativa, la glucosa tiende a estar dentro de los valores normales; tomando en cuenta un valor $p < 0.050$ y $q < 0.025$, las bacterias significativamente relacionadas con la concentración de glucosa fueron: el género *Bacteroides* spp. (Figura 28), el género *Biophila* spp. (Figura 29), familia *Erysipelotrichaceae* (Figura 30); el género *Holdemania* spp. (Figura 31) y el género *Parabacteroides* spp. (Figura 32). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fueron significativas de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente (Tabla 13, Anexo 3).

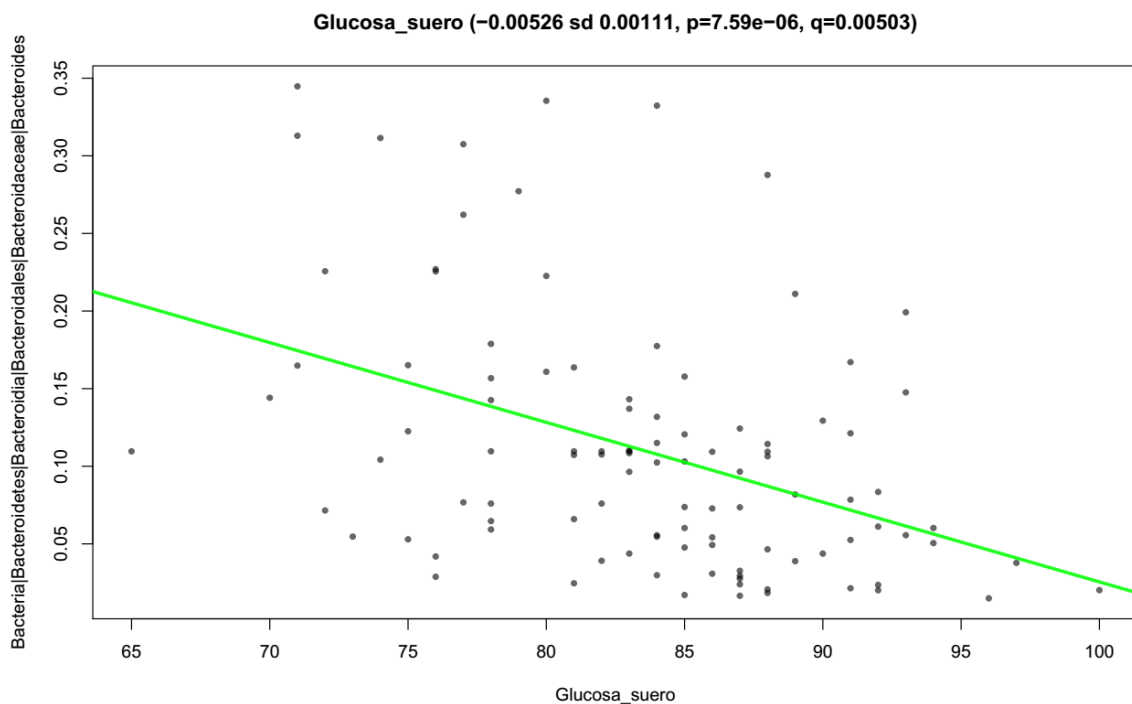


Figura 28. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa (mg/dL) contra abundancia relativa, y el género *Bacteroides* spp. está relacionada negativamente con la concentración de glucosa.

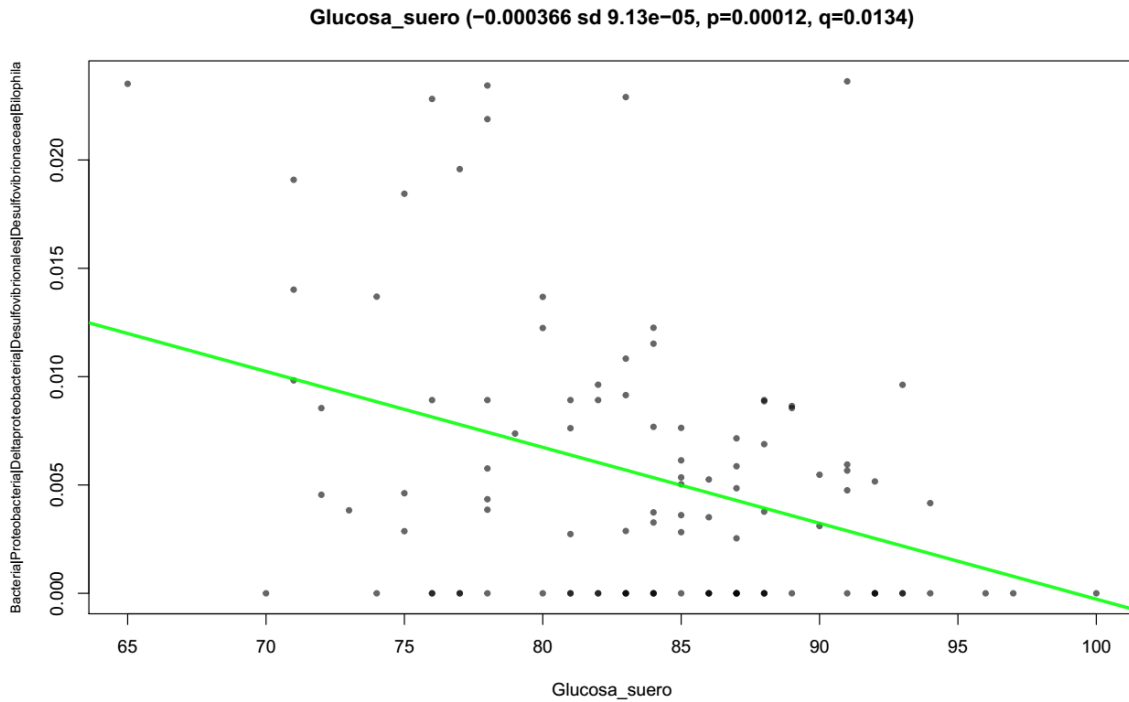


Figura 29. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa (mg/dL) contra abundancia relativa, y el género *Biophila* spp. está relacionada negativamente con la concentración de glucosa.

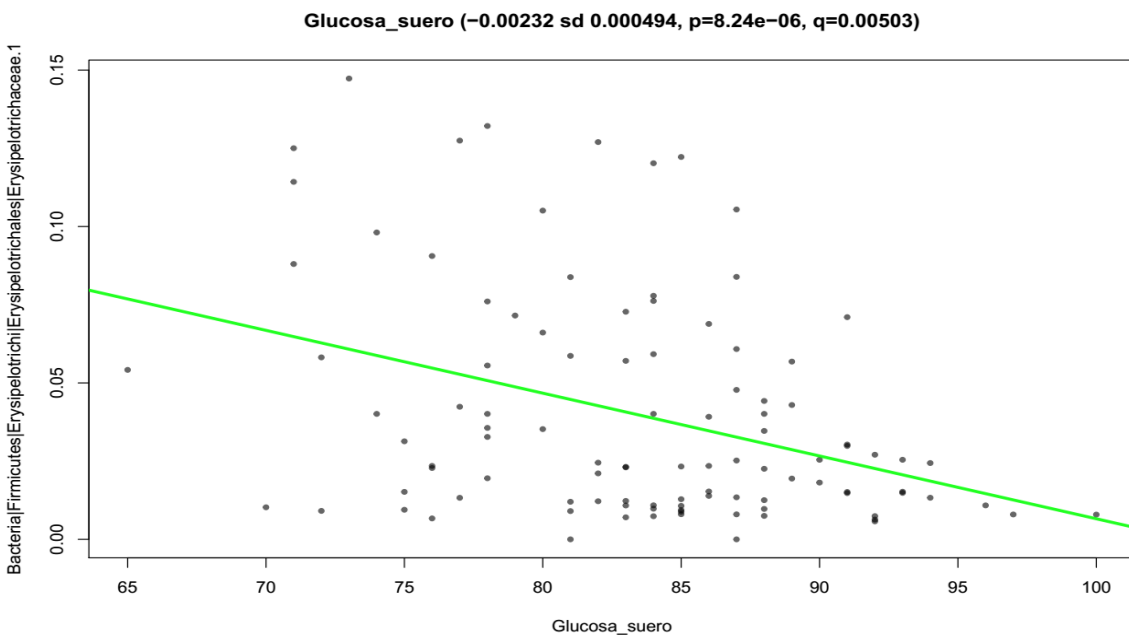


Figura 30. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa (mg/dL) en suero contra abundancia relativa, y la familia *Erysipelotrichaceae*. está relacionada negativamente con la concentración de glucosa.

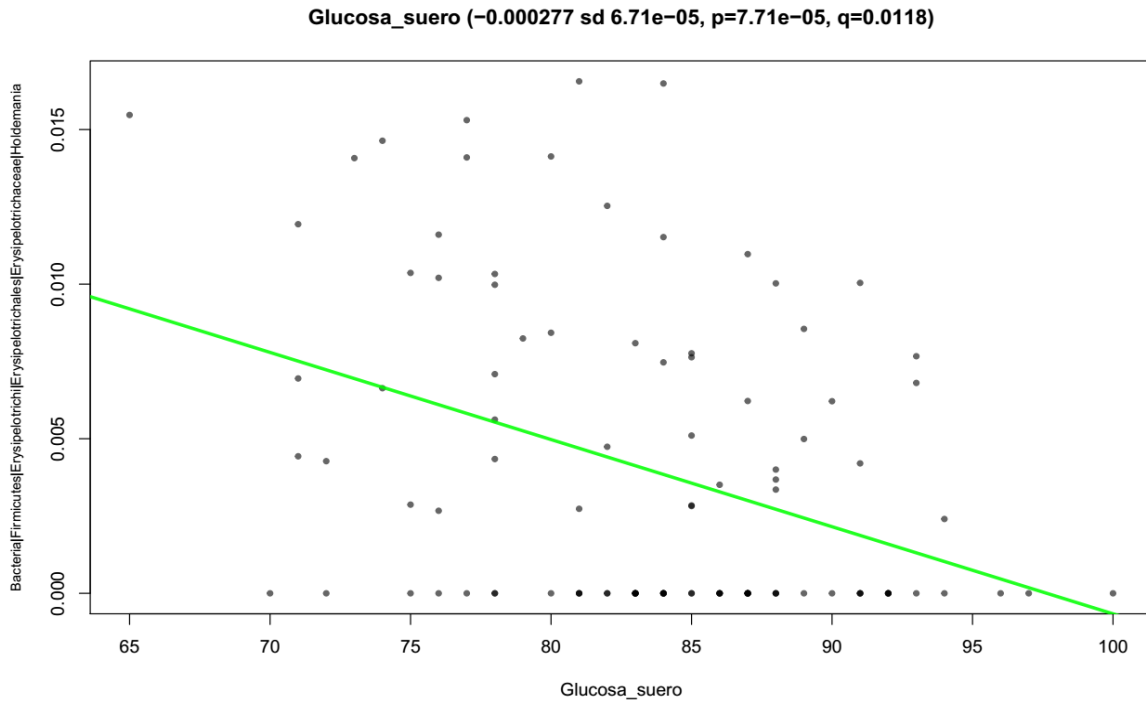


Figura 31. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa (mg/dL) contra abundancia relativa, y el género *Holdemania*. está relacionada negativamente con la concentración de glucosa.

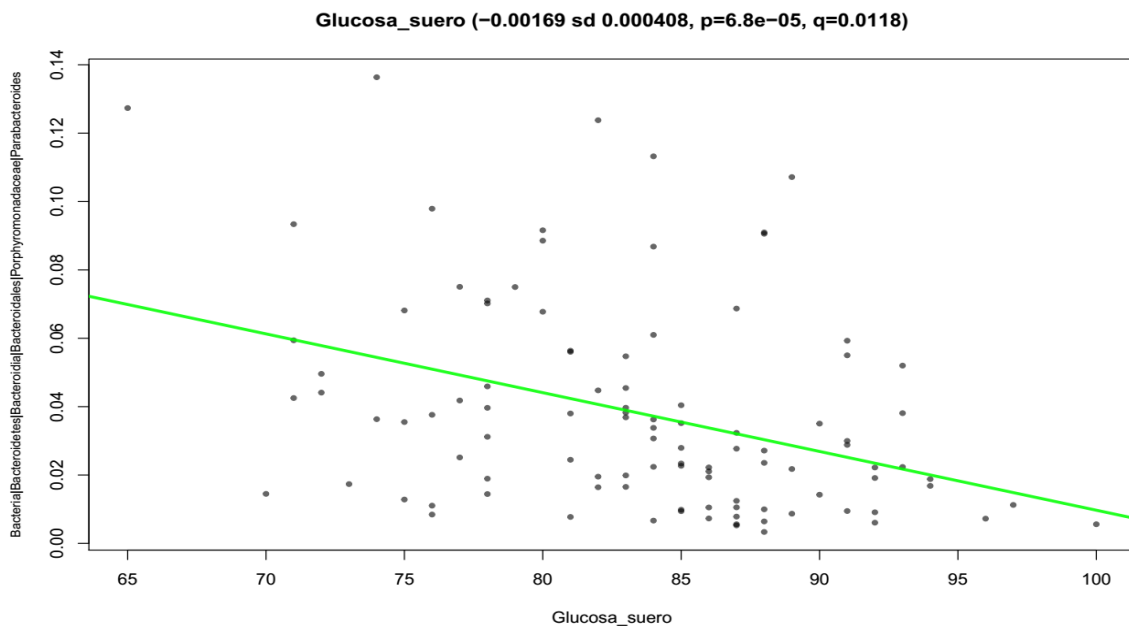


Figura 32. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa (mg/dL) contra abundancia relativa, y el género *Parabacteroides* está relacionada negativamente con la concentración de glucosa.

Asociación de niveles de alanina amino transferasa (ALT) con abundancia relativa de la microbiota intestinal

Las bacterias que están relacionadas positivamente con la alanina amino transferasa, es decir, cuando están presentes en mayor abundancia relativa, la alanina amino transferasa tiende a aumentar son: el género *Megasphaera* spp. (Figura 33) y el género *Methylobacterium* spp. (Figura 34). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fueron significativas de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente (Tabla 13, Anexo 3).

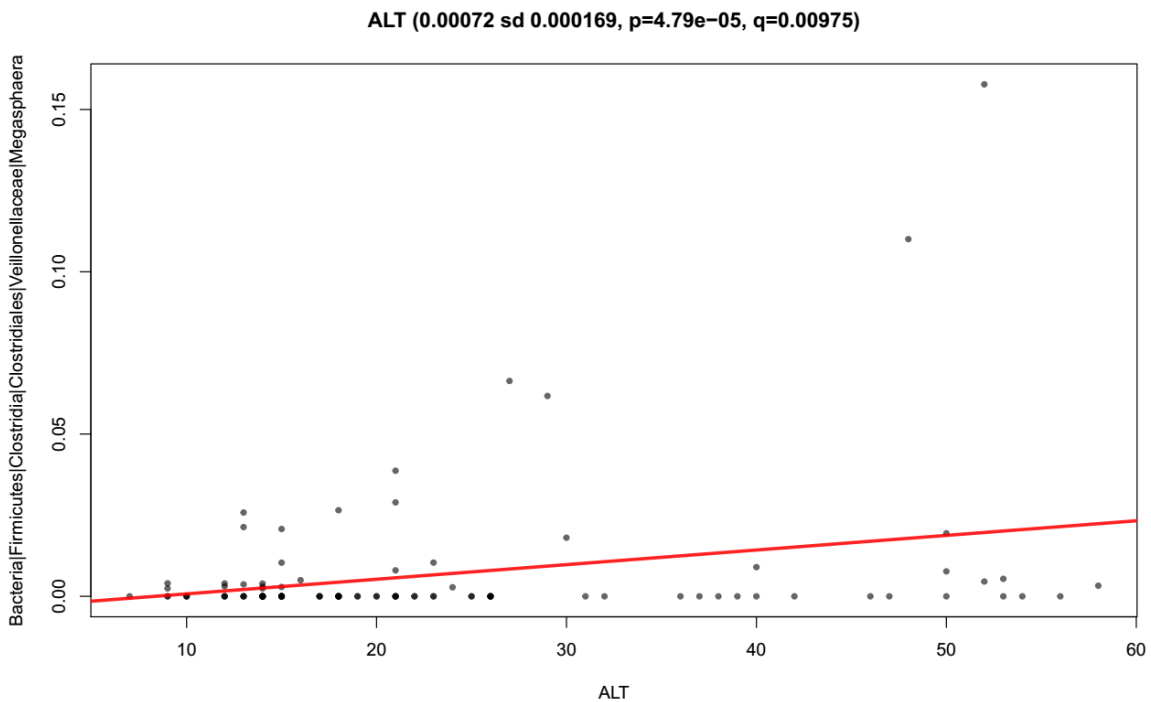


Figura 33. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, y el género *Megasphaera* spp. está relacionada positivamente con la concentración de ALT.

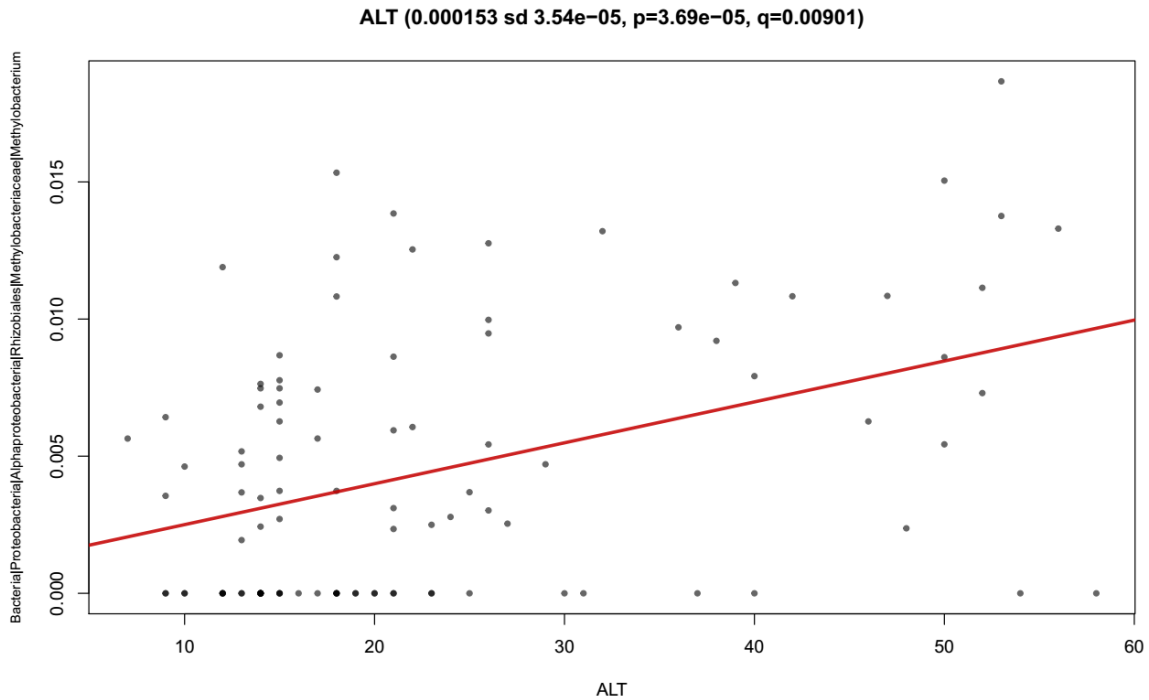


Figura 34. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, y el género *Methylobacterium* spp. está relacionada positivamente con la concentración de ALT.

Asociación de niveles de bilirrubina total con abundancia relativa de la microbiota intestinal

Las bacterias que están relacionadas positivamente con la bilirrubina total, es decir, cuando están presentes en mayor abundancia relativa, la bilirrubina total tiende a aumentar son: el género *Haemophilus* spp. (Figura 35) y el género *Succinivibrio* spp. (Figura 36). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fueron significativas de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente (Tabla 13, Anexo 3).

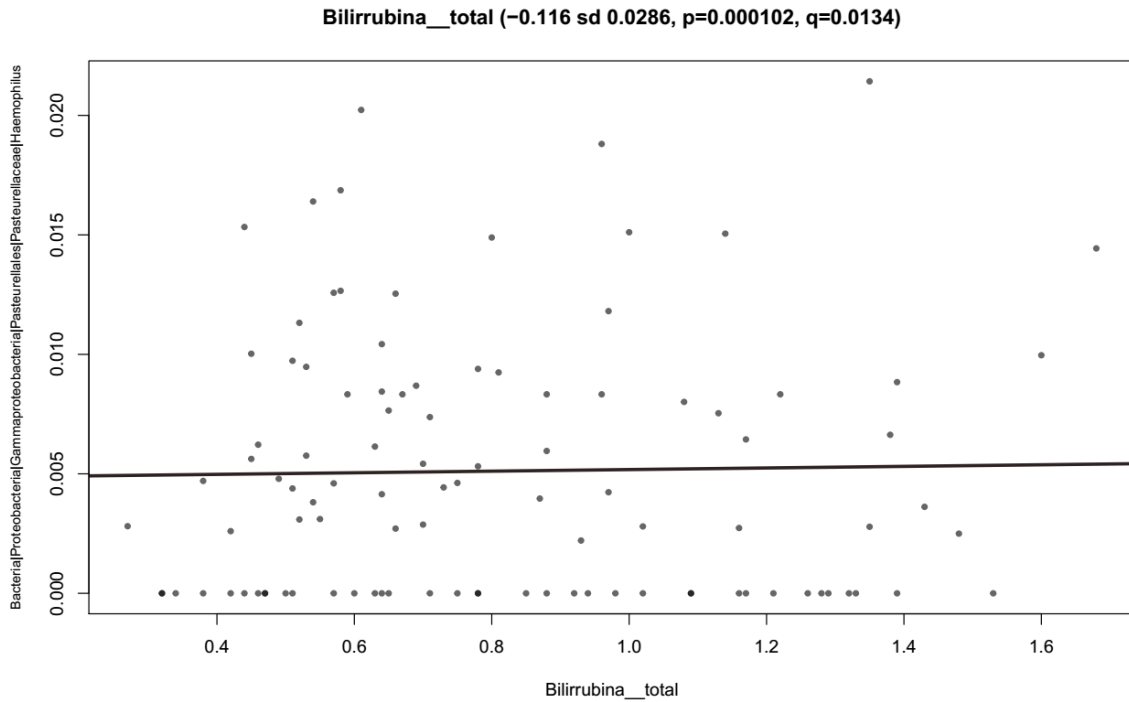


Figura 35. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina indirecta. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina indirecta (mg/dL) contra abundancia relativa, y el género *Haemophilus* spp. está relacionada positivamente con la concentración de bilirrubina indirecta.

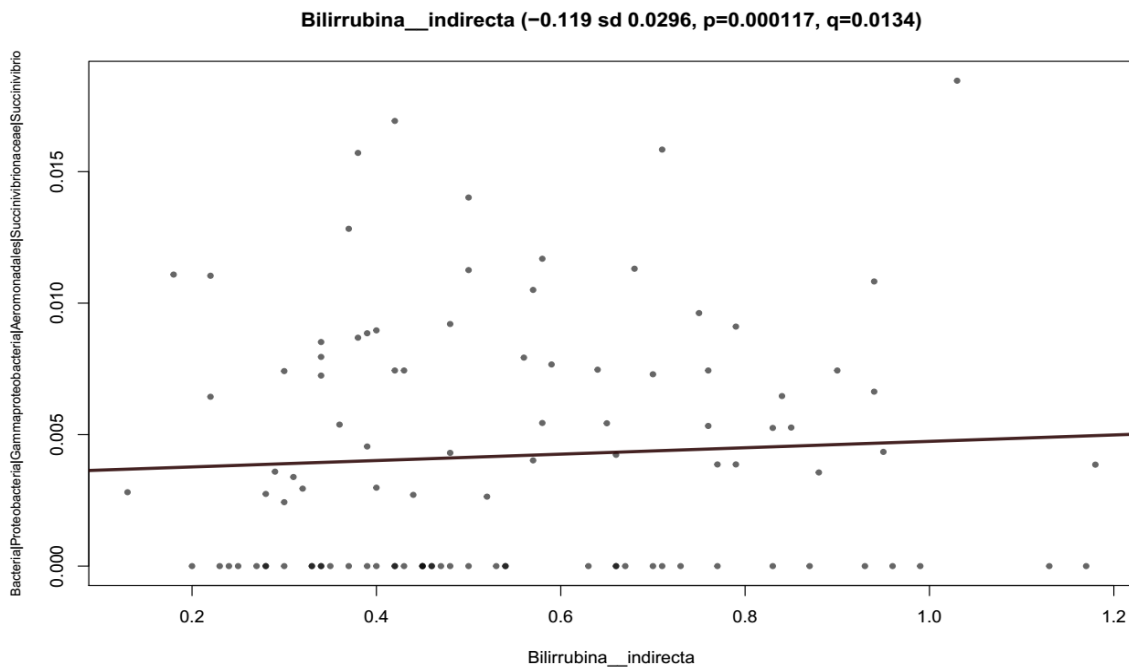


Figura 36. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina indirecta. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina indirecta (mg/dL) contra abundancia relativa, y el género *Succinivibrio* spp. está relacionada positivamente con la concentración de bilirrubina indirecta.

Asociación de niveles de colesterol con abundancia relativa de la microbiota intestinal

La bacteria que está relacionada negativamente con el colesterol, es decir, cuando están presentes en mayor abundancia relativa, el colesterol tiende a disminuir es: la familia *Coriobacteriaceae*. (Figura 37). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fueron significativas de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente (Tabla 13, Anexo 3).

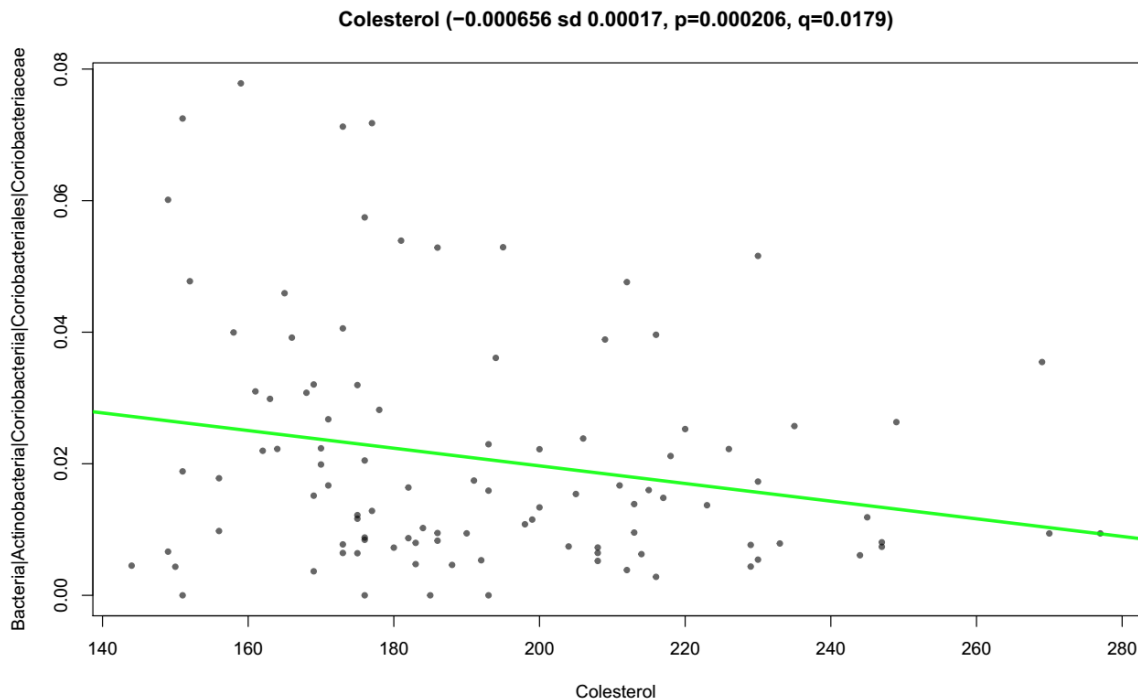


Figura 37. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol. Se realizó una comparación de los datos clínicos de colesterol (mg/dL) contra abundancia relativa, y la familia *Coriobacteriaceae* está relacionada negativamente con la concentración de colesterol.

Asociación de niveles de fosfatasa alcalina con abundancia relativa de la microbiota intestinal

La bacteria que está relacionada positivamente con la fosfatasa alcalina, es decir, cuando están presentes en mayor abundancia relativa, la fosfatasa alcalina tiende a aumentar es: el género *Eggerthella* spp. (Figura 38). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fueron significativas de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente (Tabla 13, Anexo 3).

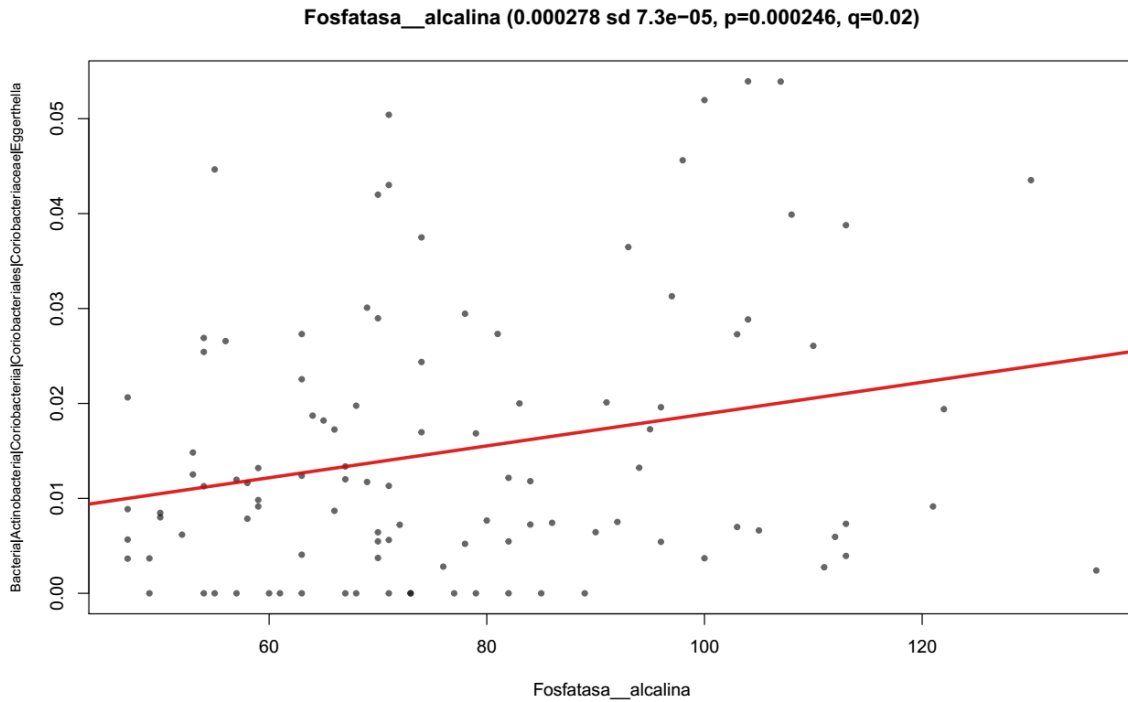


Figura 38. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina (U/L) contra abundancia relativa, y el género *Eggerthella* spp. está relacionada positivamente con la concentración de fosfatasa alcalina.

Asociación de niveles de HDL con abundancia relativa de la microbiota intestinal

La bacteria que está relacionada positivamente con HDL, es decir, cuando están presentes en mayor abundancia relativa, el HDL tiende a aumentar es: la familia *Coriobacteriaceae*. (Figura 39). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fueron significativas de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente (Tabla 13, Anexo 3).

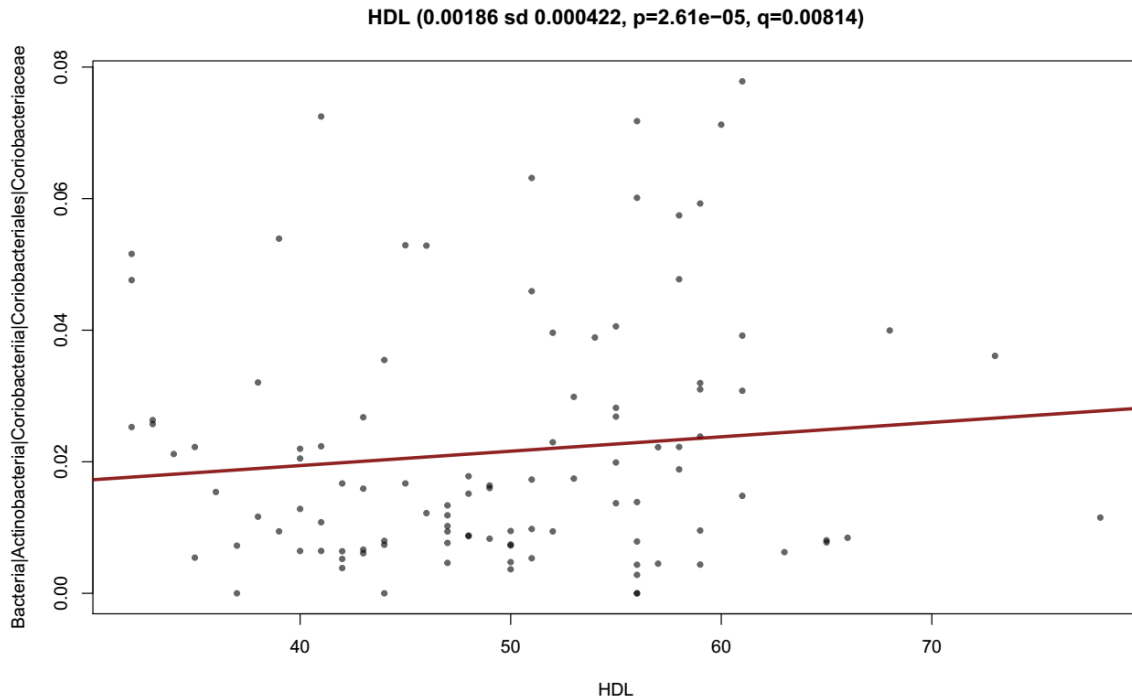


Figura 39. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra HDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de HDL (mg/dL) contra abundancia relativa, y la familia *Coriobacteriaceae* está relacionada positivamente con la concentración de HDL.

Asociación de niveles del índice aterogénico con abundancia relativa de la microbiota intestinal

La bacteria que está relacionada negativamente con el índice aterogénico, es decir, cuando están presentes en mayor abundancia relativa, el índice aterogénico tiende a disminuir es: la familia *Coriobacteriaceae*. (Figura 40). Existen otras bacterias que mostraron una tendencia de asociación, pero que no fueron significativas de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente (Tabla 13, Anexo 3).

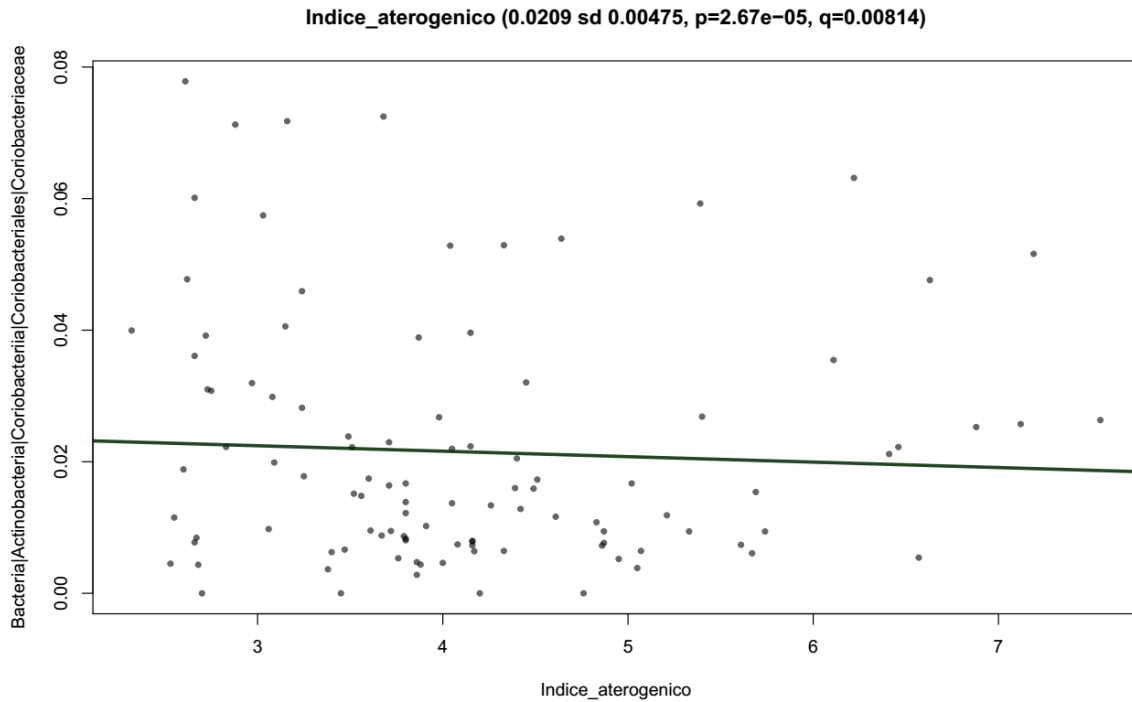


Figura 40. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra índice aterogénico. Se realizó una comparación de los datos clínicos de índice aterogénico contra abundancia relativa, y la familia *Coriobacteriaceae* está relacionada negativamente con la concentración de índice aterogénico.

Tabla 13. Bacterias analizadas por MaAsLin que no se asociaron significativamente a metadatos con base al valor de p y q simultáneamente.

Bacteria	Nivel Taxonómico	Metadato	valor p	valor q	Número de figura
<i>Coprococcus</i> spp.	Género	Cadera	**0.001	0.048	45, Anexo 3
<i>Megasphaera</i> spp.	Género	Cadera	**0.002	0.125	46, Anexo 3
<i>Barnesiellaceae</i>	Familia	Cintura	***<0.001	0.081	47, Anexo 3
<i>Bulleidia</i> spp.	Género	Cintura	**0.001	0.106	48, Anexo 3
<i>Lachnospiraceae</i>	Familia	Cintura	***<0.001	0.056	49, Anexo 3
<i>Megasphaera</i> spp.	Género	Cintura	***<0.001	0.213	50, Anexo 3
<i>Parvimonas</i> spp.	Género	Cintura	**0.004	0.224	51, Anexo 3
<i>Rickenellaceae</i>	Familia	Cintura	**0.004	0.203	52, Anexo 3
<i>Erysipelotrichaceae</i>	Familia	Estatura	***<0.001	0.048	53, Anexo 3
<i>Clostridiaceae</i>	Familia	IMC	***<0.001	0.063	54, Anexo 3
<i>Ruminococaceae</i>	Familia	IMC	**0.001	0.107	55, Anexo 3
<i>Coprococcus</i> spp.	Género	IMC	**0.001	0.115	56, Anexo 3
<i>Ruminococcus</i> spp.	Género	IMC	**0.003	0.187	57, Anexo 3
<i>Barnesiellaceae</i>	Familia	IMC	***<0.001	0.070	58, Anexo 3
<i>Dorea</i> spp.	Género	IMC	**0.002	0.125	59, Anexo 3
<i>Lachnospiraceae</i>	Familia	IMC	**0.002	0.125	60, Anexo 3
<i>Parvimonas</i> spp.	Género	Peso	**0.004	0.224	61, Anexo 3
<i>Lachnospiraceae</i>	Familia	P. dias	**0.001	0.220	62, Anexo 3
<i>Rhodobacteriaceae</i>	Familia	ALT	**0.001	0.046	63, Anexo 3
<i>Barnesiellaceae</i>	Familia	ALT	**0.002	0.073	64, Anexo 3

<i>Fusobacterium</i> spp.	Género	ALT	**0.003	0.099	65, Anexo 3
<i>Propionibacterium</i> spp.	Género	ALT	**0.003	0.106	66, Anexo 3
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	Género	ALT	**0.001	0.216	67, Anexo 3
<i>Sphingobium</i> spp.	Género	ALT	0.010	0.223	68, Anexo 3
<i>Streptomyetaceae</i>	Familia	B. indirecta	**0.004	0.130	69, Anexo 3
<i>Streptomyetaceae</i>	Familia	B. total	**0.002	0.093	70, Anexo 3
<i>Haemophilus</i> spp.	Género	B. directa	***<0.001	0.034	71, Anexo 3
<i>Streptomyetaceae</i>	Familia	B. directa	**0.005	0.145	72, Anexo 3
<i>Succinivibrio</i> spp.	Género	B. directa	**0.008	0.202	73, Anexo 3
<i>Prevotella</i> spp.	Género	B. directa	*0.010	0.223	74, Anexo 3
<i>Christenellaceae</i>	Familia	Colesterol	**0.001	0.069	75, Anexo 3
<i>Anaerostipes</i> spp.	Género	Colesterol	**0.003	0.105	76, Anexo 3
<i>Fusobacterium</i> spp.	Género	Colesterol	**0.003	0.113	77, Anexo 3
<i>Streptomyetaceae</i>	Familia	Colesterol	**0.004	0.142	78, Anexo 3
<i>Gammaproteobacteria</i>	Orden	F. alcalina	**0.001	0.060	79, Anexo 3
<i>Anaerostipes</i> spp.	Género	F. alcalina	**0.003	0.099	80, Anexo 3
<i>Erysipelotrichaceae</i>	Familia	F. alcalina	**0.005	0.145	81, Anexo 3
<i>Lachnospiraceae</i>	Familia	F. alcalina	**0.006	0.160	82, Anexo 3
<i>Ruminococcus</i> spp.	Género	F. alcalina	**0.007	0.175	83, Anexo 3
<i>Ruminococaceae</i>	Familia	F. alcalina	**0.009	0.210	84, Anexo 3
<i>Dorea</i> spp.	Género	F. alcalina	*0.010	0.223	85, Anexo 3
<i>Oscillospira</i> spp.	Género	F. alcalina	*0.012	0.244	86, Anexo 3
<i>Actinomyces</i> spp.	Género	Glucosa	***<0.001	0.034	87, Anexo 3
<i>Ruminococcus</i> spp.	Género	Glucosa	**0.001	0.042	88, Anexo 3
<i>Rickenellaceae</i>	Familia	Glucosa	**0.001	0.050	89, Anexo 3
<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia	Glucosa	**0.001	0.069	90, Anexo 3
<i>Clostridiaceae</i>	Familia	Glucosa	**0.001	0.071	91, Anexo 3
<i>Butyricimonas</i> spp.	Género	Glucosa	**0.002	0.092	92, Anexo 3
<i>Lactococcus</i> spp.	Género	Glucosa	**0.002	0.094	93, Anexo 3
<i>Odoribacter</i> spp.	Género	Glucosa	**0.005	0.145	94, Anexo 3
<i>Granulicatella</i> spp.	Género	Glucosa	**0.006	0.160	95, Anexo 3
<i>Barnesiellaceae</i>	Familia	Glucosa	**0.006	0.160	96, Anexo 3
<i>Dorea</i> spp.	Género	Glucosa	**0.007	0.172	97, Anexo 3
<i>Streptococcus</i> spp.	Género	Glucosa	**0.007	0.190	98, Anexo 3
<i>Rhodoplanes</i> spp.	Género	Glucosa	**0.009	0.216	99, Anexo 3
<i>Peptostreptococaceae</i>	Familia	Glucosa	*0.011	0.223	100, Anexo 3
<i>Enterococaceae</i>	Familia	Glucosa	*0.011	0.224	101, Anexo 3
<i>Succinivibrio</i> spp.	Género	HDL	**0.001	0.071	102, Anexo 3
<i>Streptomyetaceae</i>	Familia	HDL	**0.001	0.071	103, Anexo 3
<i>Slackia</i> spp.	Género	Índ. atero.	*0.012	0.242	104, Anexo 3
<i>Streptomyetaceae</i>	Familia	LDL	**0.002	0.091	105, Anexo 3
<i>Fusobacterium</i> spp.	Género	LDL	**0.005	0.145	106, Anexo 3
<i>Christenellaceae</i>	Familia	LDL	**0.006	0.160	107, Anexo 3
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	Género	LDL	**0.009	0.212	108, Anexo 3
<i>Anaerostipes</i> spp.	Género	LDL	*0.012	0.223	109, Anexo 3

IMC: Índice de masa corporal; P. días: Presión diastólica; ALT: Alanina aminotransferasa; B. indirecta: Bilirrubina indirecta; B. total; Bilirrubina total; B. directa; Bilirrubina directa; F. alcalina: Fosfatasa alcalina; HDL: Lipoproteína de alta densidad; Índ. atero.; Índice aterogénico; LDL; Lipoproteína de baja densidad. El valor "p" indica si el resultado es estadísticamente significativo (el mínimo aceptado es 0.050) y el valor de "q" indica la validez de los datos que reporta "p" (el mínimo aceptable es 0.025).

Análisis de la asociación de la diversidad de la microbiota con las rutas metabólicas durante la intervención con cerveza sin alcohol.

Finalmente, se utilizó una herramienta estadística que utiliza los datos de abundancia relativa contra la base de datos de Greengenes y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (PICRUSt), para analizar cuales rutas metabólicas pueden estar implicadas por las abundancias relativas de las bacterias presentes en las muestras. De este análisis la ruta metabólica con involucrada con las abundancias relativas es la degradación de otros glicanos con un valor $p=0.006$ (Figura 41).

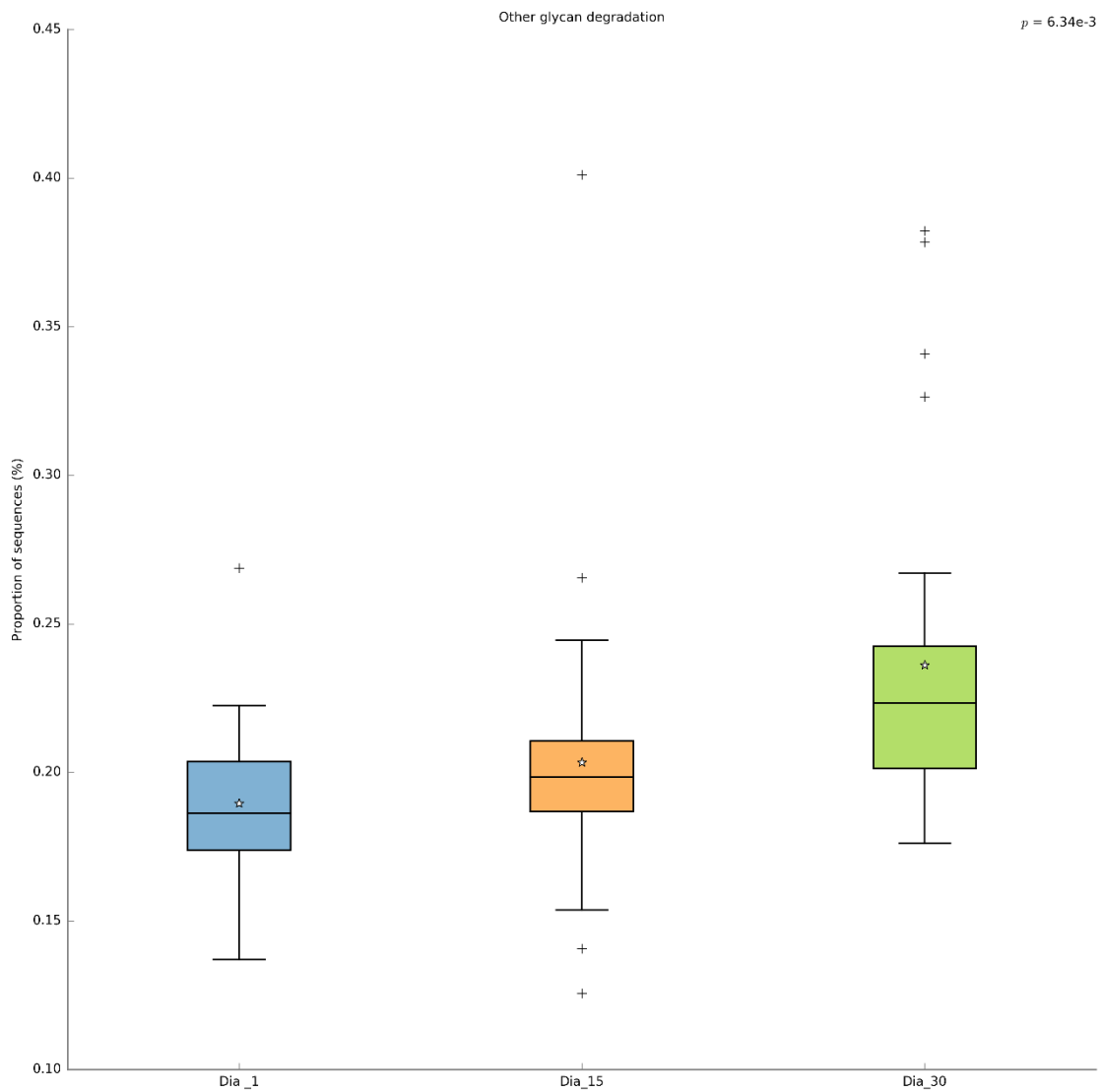


Figura 41. Análisis PICRUSt de las abundancias relativas de las bacterias de los 35 participantes contra tiempo (día 1, 15 y 30). La ruta metabólica relacionada con las abundancias relativas cuando se comparan con la base de datos de KEGG con un valor $p=0.006$ es, degradación de otros glicanos.

10. DISCUSIÓN

De los resultados antropométricos y los proporcionados por el laboratorio clínico cabe destacar que durante la participación en el proyecto de consumo de una cerveza sin alcohol de 355 mL/día por 30 días no hubo un aumento de peso, índice de masa corporal, cintura, cadera, ni los parámetros de perfil hepático, lipídico y de inflamación (Figura 9 y Tablas 3-8); con lo que en estas condiciones se puede considerar que el consumo de una cerveza sin alcohol al día en dichas condiciones no favorece el aumento de peso, ni causa daño al hígado o alguna alteración metabólica. Sin embargo, la concentración de hemoglobina corpuscular media bajó, los basófilos aumentaron, el volumen plaquetario medio disminuyó, la glucosa disminuyó y el porcentaje de células β funcionales aumentó (Figuras 9 y Tablas 3-8), con base en los dos últimos cambios se puede considerar que el consumo moderado de cerveza sin alcohol puede ayudar a regular la glucosa. Sin embargo, hay estudios donde un consumo de cerveza con y sin alcohol durante 3 semanas y dieta controlada reportan que no hay cambio en peso, índice de masa corporal, hemoglobina, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, transaminasas y glucosa, sólo observaron que la cerveza con alcohol disminuye los niveles de proteína C reactiva (Sierksma *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta que no hubo un cambio significativo del perfil lipídico ni la producción de ácidos grasos de cadena corta cuantificados en heces, se confirma que no se modificó la producción de los mismos, ya que un exceso en la producción de los ácidos grasos de cadena corta pueden absorberse a nivel intestinal y como consecuencia elevar los valores del perfil lipídico (Murugesan *et al.*, 2017; Murugesan *et al.*, 2015; Nirmalkar *et al.*, 2016).

A nivel de microbiota hubo un aumento relativo del *phylum* de Bacteroidetes y una disminución relativa de los Firmicutes, y por género se observó un aumento relativo de *Bacteroides* spp. y una disminución relativa de la familia *Lachnospiraceae* y del orden de *Clostridiales*; en donde se observó que en el género femenino es más evidente el cambio de la abundancia de las bacterias presentes

en el colon distal, esto observado tanto en las abundancias relativas (Figuras 12-16) y en los análisis de LEfSe (Figuras 21-23). Hay trabajos que reportan que la abundancia de los géneros *Faecalibacterium* spp. y *Roseburia* spp. y la familia *Lachnospiraceae* están presentes en sobrepeso (Murugesan *et al.*, 2015); por otro lado, un estudio en ratones *ob/ob* sin microbiota fueron colonizados por *Lachnospiraceae* (AJ110941), y estos presentaron altos niveles de glucosa en ayunas y disminuyó la insulina (Kameyama & Itoh, 2014). Tomando en cuenta lo anterior se puede observar que la cerveza sin alcohol puede ejercer función prebiótica en la microbiota intestinal.

Adicionalmente el análisis de MaAsLin el cual nos ayuda a encontrar la asociación de los valores de la metadata que tuvieron un cambio estadísticamente significativo durante el consumo de cerveza sin alcohol durante un mes fue; la concentración de glucosa con la abundancia de las siguientes bacterias: *Bacteroides* spp., *Erysipelotrichaceae*, *Parabacteroides* spp., *Biophila* spp. y *Holdemania* spp., los cuales, entre más abundancia de estas bacterias la glucosa está controlada dentro de los valores normales (Figuras 28-32). Las bacterias del género *Blautia* spp., *Faecalibacterium* spp. y *Coprococcus* spp. están incrementadas significativamente en niños con obesidad y sobrepeso, y las bacterias que se modifican durante el consumo de cerveza parte de una microbiota que está asociada con peso normal (Murugesan *et al.*, 2016; Nirmalkar *et al.*, 2016).

Finalmente se obtuvo que la ruta metabólica posiblemente implicada con las abundancias relativas es la de degradación de otros glicanos (Figura 41). Tomando en cuenta que se sabe que *in vitro* los Bacteroidetes resisten más la actividad antimicrobiana de los compuestos polifenólicos que los Firmicutes, y los datos obtenidos durante el proyecto hubo un aumento de los Bacteroidetes, se puede considerar que los componentes de la cerveza sin alcohol pueden regular la microbiota intestinal (Rastmanesh, Reza, 2011).

11. CONCLUSIÓN

Las conclusiones del proyecto son las siguientes:

El consumo de una cerveza sin alcohol de 355 mL/día por 30 días no modifica el peso, índice de masa corporal, cintura, cadera, ni los parámetros de perfil hepático, lipídico y de inflamación.

El consumo de una cerveza sin alcohol de 355 mL/día por 30 días modifica la concentración de hemoglobina corpuscular media bajó, los basófilos aumentaron, el volumen plaquetario medio disminuyó, la glucosa disminuyó y el porcentaje de células β funcionales aumentó.

El consumo de una cerveza sin alcohol de 355 mL/día por 30 días modifica la microbiota, donde hay un aumento relativo del *phylum* de Bacteroidetes y una disminución relativa de los Firmicutes, y por género se observó un aumento relativo de *Bacteroides* y una disminución relativa de la familia *Lachnospiraceae* y del orden de *Clostridiales*; en donde se observó que en el género femenino es más evidente el cambio. Por lo que se puede considerar a la cerveza sin alcohol como un buen prebiótico.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Bik, E.M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M. J. and Relman, D. A. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. (2006). *PNAS* 103:732-737.
- Cabras, Ignazio, and Higgins, David M. Beer, brewing, and business history. (2016). *Bus Hist* 58:609-624
- Carbajal Martínez L.D., and Insuasti Andrade M.A., (2010). Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (*Hordeum vulgare*) y yuca (*Manihot Esculenta Crantz*). (Tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. (8-12; 24-28; 33-34).
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipania, S., Tinahones, F. J., Queipo-Ortuño, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. (2013). *J. Nutr. Biochem.* 24:1415-1422.
- Cerveceros de España, Libro blanco de la cerveza (2001), páginas (8-10; 14;16-18) <http://www.cerveceros.org/pdf/libro_blanco_cerveza.pdf> [Consulta: 2016-06-16].
- Cerveceros de España. La cerveza de principio a fin (Figura). Recuperado: <http://www.infografikacomunicacion.es/infografias-empresa/empresas/116-cervecera> <22-06-2016>.
- Chen, W., Becker, T., Qian, F., Ring, J. Beer and beer compounds: physiological effects on skin health. (2014). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28:142–150.
- De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., Croubels, S. Development of a HPLC–UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. (2013). *J Pharm Biomed Anal* 80:107–115.
- Dengler, F., Rackwitz, R., Benesch, F., Pfannkuche, H., Gäbel, G., Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. (2014). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2:379-390.
- Devaraj, S., Hemarajata, P., Versalovic, J. The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes (2013). *Clin Chem.* 4:617-28.
- Dorn, C., Bataille, F., Gaebele, E., Heilmann, J. and Hellerbrand, C. Xanthohumol feeding does not impair organ function and homeostasis in mice. (2010). *Food Chem. Toxicol* 48:1890-1897.
- Estrada-Velasco, B. I., Cruz, M., García-Mena, J., Valladares-Salgado, A., Peralta-Romero, J., Guna-Serrano, M. R., Madrid-Marina, V., Orbe-Orihuela, C., López-Islas, C. y Burguete-García, A. I. La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. (2015). *Nutr Hosp.* 3:1074-1081.
- Ferk, F., Huber, W. W., Filipic, M., Bichler, J., Haslinger E., Misík, M., Nersesyan, A., Grasl-Kraupp, B., Zegura, B. and Knasmüller, S. Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). (2010). *Mutat res.* 691:17-22.

- Franco, L., Bravo, R., Galan, C., Sanchez, C., Beatriz-Rodriguez, A., Barrigs, C. and Cubero, J. Effects of beer, Hops (*Humulus lupulus*) on total antioxidant capacity in plasma of stressed subjects. (2013). *Cell mem and free rad res.* 5:232-235.
- García-Mena J, Murugesan S, Pérez-Muñoz AA, García-Espitia M, Maya O, Jacinto-Montiel M, Monsalvo-Ponce G, Piña-Escobedo A, Domínguez-Malfavón L, Gómez-Ramírez M, Cervantes-González E, Núñez-Cardona MT. (2016) Airborne Bacterial Diversity from the Low Atmosphere of Greater Mexico City. *Microb Ecol.* 72(1):70-84.
- Gerber, Georg K. The dynamic microbiome. (2014). *FEBS Lett.* 599:4131-4139.
- Gerhäuser, Clarissa. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. (2005). *Eur. J. Cancer* 41:1941-1954.
- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P. and Scaccini, C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. (2000). *J. Nutr. Biochem.* 11:76–80.
- Kameyama, K and Itoh, K. Intestinal Colonization by a Lachnospiraceae Bacterium Contributes to the Development of Diabetes in Obese Mice. (2014). *Microbes Environ.* 29, 4:427-430.
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S. and Lee, Y. K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. (2006). *Res microbial* 157:876-884.
- Legette, L. L., Moreno Luna, A. Y., Reed, R. L. Miranda, C. L., Bobe, G., Proteau, R. R., Stevens, J. F. Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. (2013). *Phytochemistry.* 91:236-241.
- Mao, Lei and Franke. (2015) Symbiosis, dysbiosis, and rebiosis- The value of metaproteomics in human microbiome monitoring. *J Proteomics* 15:1142-1151.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6(3):610-8
- Mukamal, K. J., Conigrave, K. M., Mittleman, M. A., Camargo, C. A., Stampfer, M. J., Willett W. C. and Rimm E. B. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. (2003). *N Engl J Med* 348:109-118.
- Murugesan, S., Nirmalkar, K., García-Espitia, M., Pizano-Zárata, M. L., Hoyo-Vadillo, C., Garcia-Mena, J. Current Insight into the Role of Gut Microbiota in Mexican Childhood Obesity. (2017). *Symbiosis.* DOI: <http://dx.doi.org/10.15226/2374-6866/4/1/00153>.
- Murugesan, S., Ulloa-Martínez, M., Martínez-Rojano, H., Galván-Rodríguez, F. M. Miranda-Brito, C., Romano, M. C., Piña-Escobedo, A., Pizano-Zárata, M. L., & Hoyo-Vadillo, C. and García-Mena, J. Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. (2015). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34:1337–1346
- Murugesan, S., Ulloa-Martinez, M., Maya, O., Pizano-Zárata, M. L., Galván-Rodríguez, F. M. Miranda-Brito, C., Romano, M., Piña-Escobedo, A., Hoyo-

- Vadillo, C. and García-Mena, J. The role of the colon microbiota in the Mexican children obesity. (2016). *JISM*. 3: DOI 10.18143/JISM_v3i1_1625.
- Nardini, N., Natella F., Scaccini, C., Ghiselli, A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. (2006). *J. Nutr. Biochem.* 17:14–22.
- Nirmalkar, K., Murugesan, S., Pizano-Zárate, M. L., María Romero-Figueroa, M. S., Hoyo-Vadillo, C and Garcia-Mena, J. Endothelial Dysfunction in Mexican Obese. *Symbiosis*. 3(1): 1-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.15226/2374-8354/2/2/00127>.
- Nozawa Hajime. Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A^y mice. (2005). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336: 754-761.
- Nunes de Almada, Carine, Nunes de Almada, Caroline, Ruiz Martinez, R. C. and Sant'Ana, A. de S. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 4175-4199.
- Parkar, S. G., Trower, T. M., Stevenson, D. E. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. (2013). *Anaerobe*. 23: 12-19.
- Rastmanesh. Reza. High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. (2011). *Chem. Biol. Interact.* 189:1-8.
- Rodríguez, M.M., Pérez, D., Chaves, F. J., Esteve, E., Marin-Garcia, P., Xifra, G., Vendrell, J., Jové, M., Pamplona, R., Ricart, W., Portero-Otin, M., Chacón, M. R., and Fernández-Real, J. M. Obesity changes the human gut mycobiome. (2015). *Nature* 5:14600.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza JA, Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT, Bustillo J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 20; 475(7356):348-52.
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A. and Mazmanian, S. K. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiome. (2011). *Science* 332:974-977.
- Sánchez-Miguel A. (2011). Fermentación de malta empleando un Sistema semicontinuo en el proceso de la elaboración de cerveza. (Tesis de pregrado) Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajapan de León, Oaxaca. (5-11).
- Sanz, Y., Santacruz, A. and De Palma, G (2008). Insights into the Roles of Gut Microbes in Obesity. *Diseases Interdiscip Perspect Infect Dis*. Article ID 829101, doi:10.1155/2008/829101.
- Sierksma, A., Gaag, M.S., Kluff, C. and Hendriks, H. F: J. (2002). Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr.* 56, 1130–1136.

- Steenackers, B., Cooman, L. D., and Vos, D. D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. (2014). *Food Chem* 172:742-756.
- Stevens, J. F., Page, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. (2004). *Phytochemistry* 65:1317-1330.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Knight, R., Ley, R. E. and Gewirtz A. T. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. (2010). *Science* 238:2228-231.
- Walsh, C. J., Guinane, C. M., Hill, C., Ross, R. P., O'Toole, P. W. and Cotter, P. D. In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome data base. (2015). *BMC Microbiol.* 15:183
- Yui, Kazuku, Kiyofuji, Ayane and Osada Kyoichi. Effects of Xanthohumol-rich extract from the hop on fatty acid metabolism in rats fed a high-fat diet. (2014). *J. Oleo Sci.* 63(2): 159-168.
- Zapata, Heidi J. and Quagliarello, Vicent J. The Microbiota and Microbiome in Aging: Potential Implications in Health and Age-Related Diseases. (2015). *J Am Geriatr Soc.* 63:776-781.

13. ANEXOS

Anexo 1: Lista de métodos

13.1 Instrucciones para toma de muestras de heces	72
13.2 Extracción de DNA de muestra de heces con Favorgen	72
13.3 Preparación de genotecas región V3 del gen 16S rDNA	73
13.4 Secuenciación masiva de genotecas 16S rDNA de la microbiota del colon	74
13.5 Medición de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	75
13.6 Extracción de componentes fenólicos en cerveza	76
13.7 Extracción de componentes fenólicos en suero	76
13.8 Análisis de los componentes polifenólicos de cerveza y suero con HPLC	77

13.1. Instrucciones para toma de muestra de heces

Debe proveérsele un recipiente limpio para coleccionar la muestra y un abatelenguas para la recolección de la muestra se requiere plástico el cual se usa para envolver (del transparente empleado en la cocina). Las heces contienen material que propaga enfermedades por ello lave sus manos antes y después del procedimiento

Indicaciones:

- a) Rotule el frasco con su nombre.
- b) Procure orinar antes de coleccionar la muestra de heces, para no contaminar la muestra de heces con orina.
- c) 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.
- d) Con mucho cuidado de no romper el plástico evacue sobre la parte hundida del plástico.
- e) Coloque la muestra directamente del plástico dentro del recipiente utilizando el abatelenguas, sin importar el tipo de consistencia que tenga.
- f) Llene el frasco a la mitad de su capacidad y cierre con firmeza.
- g) Evite que las heces tengan contacto con agua, papel o jabón.
- h) Retire el plástico de la taza del baño y haga un nudo en la parte superior para desecharlo en el bote de basura.
- i) Lave sus manos. Coloque el recipiente en una bolsa de plástico y manténgalo en refrigeración hasta el momento en el que entregue la muestra.

13.2 Extracción de DNA de muestra de heces con Favorgen

- a) Agregar 100 mg de heces al tubo de 2 mL con perlas (incluido en el kit)
- b) Añadir 300 µl del buffer SDE1 y 20 µl de proteinasa K (10 mg/mL), posteriormente agitar con vortex a máxima velocidad durante 5 minutos.

- c) Incubar la muestra a 60 °C durante 20 minutos, agitando con vortex cada 5 minutos; posteriormente 5 minutos a 95 °C.
- d) Dar a los tubos una centrifugación corta (10 segundos), y poner la muestra en hielo por 5 minutos y agregar 100 µl de buffer SD2 e incubar otros 5 minutos en hielo.
- e) Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
- f) Transferir el sobrenadante a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y descartar el pellet.
- g) Añadir 200 µl de buffer SDE3, mezclar e incubar la muestra a temperatura ambiente por 2 minutos.
- h) Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos.
- i) Transferir 250 µl de sobrenadante a un tubo de polipropileno de 1.5 mL.
- j) Añadir 250 µl de SDE4 y 250 µl de etanol absoluto, mezclar y añadir el contenido a una columna con su portacolumna.
- k) Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto y descartar el contenido del portacolumna.
- l) Añadir 750 µl de buffer de lavado y centrifugar a máxima velocidad 1 minuto y descartar el contenido del portacolumna.
- m) Repetir el paso anterior.
- n) Cambiar el portacolumna y centrifugar la columna por 3 minutos a máxima velocidad para secar el filtro de la columna.
- o) Añadir 100 µl de buffer de elución previamente calentado a 60 °C y dejar a temperatura ambiente 2 minutos.
- p) Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto para eluir el DNA.
- q) Cuantificar y ver en gel de agarosa la integridad del DNA.

13.3 Preparación de genotecas región V3 del gen 16S rDNA

- a) Al producto de amplificación de la región V3 del gen rDNA 16 S se le incorpora una secuencia de nucleótidos única para marcar cada muestra denominada “barcode”, además de secuencias adaptadoras necesarias

en la tecnología de secuenciación masiva semiconductor de iones (Figura 10).

- b) Realizar una PCR con las condiciones descritas en las Tablas 3 y 4
- c) Se realizará un análisis de la calidad de los amplicones que se generen en cada muestra mediante un fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 2.0%.
- d) Después de obtener los amplicones del tamaño aproximado a 281 pb, se realizarán reacciones masivas de PCR de cada muestra con la finalidad de tener mayor volumen de producto de reacción, en las condiciones y con el programa de amplificación descritos previamente.
- e) Para preparar la genoteca de la región V3 del gen rDNA 16S se mezclaron todos los productos de PCR a una concentración equivalente y se realizará una electroforesis en gel preparativo de agarosa al 2.0%.
- f) Se cortará la banda correspondiente al tamaño de 281 pb y se purificará el producto de PCR utilizando el kit “Wizard® SV Gel & PCR Clean-Up System” de Promega, donde se seguirán las indicaciones del fabricante.
- g) Por último, se realizará una electroforesis en gel de agarosa al 2.0% en las mismas condiciones para verificar el tamaño del producto de PCR purificado
- h) Se determinará la concentración de DNA recuperado.

13.4 Secuenciación masiva de genotecas 16S rDNA de la microbiota del colon

Las genotecas de muestras fecales se analizarán y se acondicionarán para la secuenciación masiva semiconductor de iones por el personal capacitado del Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas siguiendo los siguientes pasos:

- a) Verificar el tamaño de los amplicones de la genoteca utilizando equipo Bioanalyzer.
- b) Acondicionar las esferas para hacer reacciones de PCR masivas.

- c) Verificar la calidad de las esferas con la muestra a secuenciar utilizando equipos Ion OneTouch™ System y fluorómetro Qubit® 2.0.
- d) Secuenciación de muestras con obtención de señales por flujo y por ciclo en equipo Ion Torrent PGM™ Sequence utilizando “Ion Semiconductor Sequencing Chip” 318 r con una capacidad de más de 100 Mb y una lectura de 400 pb.
- e) Convertir las señales en lecturas de bases y analizar la calidad del proceso y las lecturas obtenidas.
- f) Generar archivos de cada muestra de acuerdo a la lista de barcodes empleados en formato FASTQ utilizando el “software Torrent Suite v4.4.3”, excluyendo del análisis las lecturas que no cumplieron con estándares de calidad establecidos.
- g) Los archivos FASTQ serán proporcionados serán convertidos a archivos FASTA para su análisis en QIIME v1.9.0.
- h) Las secuencias se agruparán en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con un 97% de similitud, donde se usará el algoritmo UCLUST.
- i) Las quimeras formadas se eliminarán del análisis usando ChimeraSlayer.
- j) La asignación taxonómica se realizará mediante el alineamiento de las secuencias contra la base de datos Green Genes.

13.5 Medición de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

- a) Acondicionar el equipo HPLC PerkinElmer, usando 1 mL de flujo con fosfato monobásico de sodio y acetonitrilo (80:20).
- b) Una vez que el equipo este trabajando a una presión estable inyectar los estándares correspondientes a ácido acético, propiónico y butírico a una concentración conocida.
- c) Determinar el tiempo de retención y unidades de absorbancia de los estándares.
- d) En las mismas condiciones inyectar una por una las muestras previamente guardadas para determinación de AGCC.

- e) Determinar el tiempo de retención y las unidades de absorbancia de las muestras.
- f) Calcular la concentración de AGCC con el método de estándar externo.

13.6 Extracción de componentes fenólicos en cerveza

- a) Tomar 8 mL de cerveza y pasarlo a un tubo de polipropileno de 15 mL.
- b) Ajustar el pH a 5 con NaOH 0.1 M midiendo potenciómetro.
- c) Agregar 500 μ L de solución Tritón X114 y 1.25 g de NaCl.
- d) Mezclar en vórtex por 2 minutos.
- e) Incubar a 70°C por 10 minutos.
- f) Centrifugar a 1.5 g (4,000 rpm) durante 5 minutos.
- g) Tomar con una pipeta de 1 mL 300-500 μ L de sobrenadante con mucho cuidado de no mover la fase acuosa.
- h) Agregar 500 μ L de metanol grado HPLC.
- i) Mezclar en vórtex y almacenar hasta su análisis en HPLC.
- j) Analizar en HPLC

13.7 Extracción de componentes fenólicos en suero

- a) Tomar 0.8-1 mL de suero sanguíneo y pasarlo a un tubo de polipropileno de 1.5 mL.
- b) Ajustar el pH a 5 con HCl 0.1 M midiendo pH con tiras reactivas.
- c) Agregar 50 μ L de solución Tritón X114 y 20 mg de NaCl.
- d) Mezclar en vórtex por 2 minutos.
- e) Incubar a 70°C por 10 minutos.
- f) Centrifugar a 1.5 g (4,000 rpm) durante 5 minutos.
- g) Tomar con una pipeta de 1 mL 300-500 μ L de sobrenadante con mucho cuidado de no mover la fase acuosa.
- h) Agregar 500 μ L de metanol grado HPLC.
- i) Mezclar en vórtex y almacenar hasta su análisis en HPLC.
- j) Analizar en HPLC

13.8 Análisis de los componentes polifenólicos de cerveza y suero con HPLC

- a) Acondicionar el equipo HPLC PerkinElmer, usando 1 mL de flujo con metanol ácido acético glacial al 0.5% (80:20).
- b) Una vez que el equipo este trabajando a una presión estable y a 364 y 290 nm de longitud de onda, inyectar el estándar de xantohumol a una concentración conocida.
- c) Determinar el tiempo de retención y unidades de absorbancia del estándar.
- d) En las mismas condiciones inyectar una por una las muestras previamente guardadas para determinación de los componentes polifenólicos.
- e) Determinar el tiempo de retención y las unidades de absorbancia de las muestras.
- f) Calcular la concentración de xantohumol con el método de estándar externo.

Anexo 2. Tablas.

Tabla 14	“Barcodes” utilizados por muestra en el primer sentido 5’ a 3’	79
Tabla 15	Índices de riqueza y diversidad bacteriana por grupo	82
Tabla 16	Índices de riqueza y diversidad bacteriana por género (masculino)	82
Tabla 17	Índices de riqueza y diversidad bacteriana por género (femenino)	82

Tabla. 14. “Barcodes” utilizados por muestra en el primer sentido 5’ a 3’

Folio	Tiempo	Chip	Barcode		Adaptor
2 ARS	Día 1	CSA 1	Barcode 1	GATCTGCGATCC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
4 APE	Día 1	CSA 1	Barcode 2	CAGCTCATCAGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
5 ABC	Día 1	CSA 1	Barcode 3	CAAACAACAGCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
6 BRF	Día 1	CSA 1	Barcode 4	GCAACACCATCC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
8 DRS	Día 1	CSA 1	Barcode 5	GCGATATATCGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
9 EGGD	Día 1	CSA 1	Barcode 6	CGAGCAATCCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
10 EFML	Día 1	CSA 1	Barcode 7	AGTCGTGCACAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
11 ERT	Día 1	CSA 1	Barcode 8	GTATCTGCGCGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
14 FHQ	Día 1	CSA 1	Barcode 9	CGAGGGAAAGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
17 GICH	Día 1	CSA 1	Barcode 10	CAAATTCGGGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
20 JRGG	Día 1	CSA 1	Barcode 11	AGATTGACCAAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
23 MFPP	Día 1	CSA 1	Barcode 12	AGTTACGAGCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
27 MHL	Día 1	CSA 1	Barcode 13	GCATATGCACTG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
28 OML	Día 1	CSA 1	Barcode 14	CAACTCCCGTGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
34 SARS	Día 1	CSA 1	Barcode 15	TTGCGTTAGCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
35 SDET	Día 1	CSA 1	Barcode 16	TACGAGCCCTAA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
36 UOGL	Día 1	CSA 1	Barcode 17	CACTACGCTAGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
40 AAO	Día 1	CSA 1	Barcode 18	TGCAGTCCTCGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
41 ACMN	Día 1	CSA 1	Barcode 19	ACCATAGCTCCG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
42 DYZG	Día 1	CSA 1	Barcode 20	TGGACATCTCTT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
43 EGV	Día 1	CSA 1	Barcode 21	GAACACTTTGGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
44 FJRF	Día 1	CSA 1	Barcode 22	GAGCCATCTGTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
45 JRH	Día 1	CSA 1	Barcode 23	TTGGGTACACGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
49 LANM	Día 1	CSA 1	Barcode 24	AAGGCGCTCCTT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
50 LMA	Día 1	CSA 1	Barcode 25	TAATACGGATCG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
51 RVR	Día 1	CSA 1	Barcode 26	TCGGAATTAGAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
53 EMR	Día 1	CSA 1	Barcode 27	TGTGAATTCGGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
54 DPRL	Día 1	CSA 1	Barcode 28	CATTCGTGGCGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
55 JGM	Día 1	CSA 1	Barcode 29	AACGCACGCTAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
56 NAV	Día 1	CSA 1	Barcode 30	ACACTGTTTCATG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
57 RMPM	Día 1	CSA 1	Barcode 31	ACCAGACGATGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
58 APCM	Día 1	CSA 1	Barcode 32	ACGCTCATGGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
59 HSL	Día 1	CSA 1	Barcode 33	ACTCACGGTATG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
60 EOPS	Día 1	CSA 1	Barcode 34	AGACCGTCAGAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
61 AKGB	Día 1	CSA 1	Barcode 35	AGCACGAGCCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
2 ARS	Día 15	CSA 1	Barcode 36	ACAGACCACTCA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
4 APE	Día 15	CSA 1	Barcode 37	ACCAGCGACTAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
5 ABC	Día 15	CSA 1	Barcode 38	ACGGATCGTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
6 BRF	Día 15	CSA 1	Barcode 39	AGCTTGACAGCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG

8 DRS	Día 15	CSA 1	Barcode 40	AACTGTGCGTAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
9 EGGD	Día 15	CSA 1	Barcode 41	ACCGCAGAGTCA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
10 EFML	Día 15	CSA 1	Barcode 42	ACGGTGAGTGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
11 ERT	Día 15	CSA 1	Barcode 43	ACTCGATTGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
14 FHQ	Día 15	CSA 1	Barcode 44	AGACTGCGTACT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
17 GICH	Día 15	CSA 1	Barcode 45	AGCAGTCGCGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
20 JRGG	Día 15	CSA 1	Barcode 46	AGGACGCACTGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
23 MFPP	Día 15	CSA 1	Barcode 47	AAGAGATGTGCA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
27 MHL	Día 15	CSA 1	Barcode 48	ACAGCAGTGGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
28 OML	Día 15	CSA 1	Barcode 49	ACGTACTIONGATG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
34 SARS	Día 15	CSA 2	Barcode 1	GATCTGCGATCC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
35 SDET	Día 15	CSA 2	Barcode 2	CAGCTCATCAGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
36 UOGL	Día 15	CSA 2	Barcode 3	CAAACAACAGCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
40 AAO	Día 15	CSA 2	Barcode 4	GCAACACCATCC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
41 ACMN	Día 15	CSA 2	Barcode 5	GCGATATATCGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
42 DYZG	Día 15	CSA 2	Barcode 6	CGAGCAATCCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
43 EGV	Día 15	CSA 2	Barcode 7	AGTCGTGCACAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
44 FJRF	Día 15	CSA 2	Barcode 8	GTATCTGCGCGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
45 JRH	Día 15	CSA 2	Barcode 9	CGAGGGAAAGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
49 LANM	Día 15	CSA 2	Barcode 10	CAAATTCGGGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
50 LMA	Día 15	CSA 2	Barcode 11	AGATTGACCAAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
51 RVR	Día 15	CSA 2	Barcode 12	AGTTACGAGCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
53 EMR	Día 15	CSA 2	Barcode 13	GCATATGCACTG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
54 DPRL	Día 15	CSA 2	Barcode 14	CAACTCCCGTGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
55 JGM	Día 15	CSA 2	Barcode 15	TTGCGTTAGCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
56 NAV	Día 15	CSA 2	Barcode 16	TACGAGCCCTAA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
57 RMPM	Día 15	CSA 2	Barcode 17	CACTACGCTAGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
58 APCM	Día 15	CSA 2	Barcode 18	TGCAGTCTCGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
59 HSL	Día 15	CSA 2	Barcode 19	ACCATAGCTCCG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
60 EOPS	Día 15	CSA 2	Barcode 20	TGGACATCTCTT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
61 AKGB	Día 15	CSA 2	Barcode 21	GAACACTTTGGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
2 ARS	Día 30	CSA 2	Barcode 22	GAGCCATCTGTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
4 APE	Día 30	CSA 2	Barcode 23	TTGGGTACACGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
5 ABC	Día 30	CSA 2	Barcode 24	AAGGCGCTCCTT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
6 BRF	Día 30	CSA 2	Barcode 25	TAATACGGATCG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
8 DRS	Día 30	CSA 2	Barcode 26	TCGGAATTAGAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
9 EGGD	Día 30	CSA 2	Barcode 27	TGTGAATTGGA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
10 EFML	Día 30	CSA 2	Barcode 28	CATTCGTGGCGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
11 ERT	Día 30	CSA 2	Barcode 29	AACGCACGCTAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
14 FHQ	Día 30	CSA 2	Barcode 30	ACACTGTTGATG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
17 GICH	Día 30	CSA 2	Barcode 31	ACCAGACGATGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG

20 JRGG	Día 30	CSA 2	Barcode 32	ACGCTCATGGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
23 MFPP	Día 30	CSA 2	Barcode 33	ACTCACGGTATG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
27 MHL	Día 30	CSA 2	Barcode 34	AGACCGTCAGAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
28 OLM	Día 30	CSA 2	Barcode 35	AGCACGAGCCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
34 SARS	Día 30	CSA 2	Barcode 36	ACAGACCACTCA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
35 SDET	Día 30	CSA 2	Barcode 37	ACCAGCGACTAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
36 UOGL	Día 30	CSA 2	Barcode 38	ACGGATCGTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
40 AAO	Día 30	CSA 2	Barcode 39	AGCTTGACAGCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
41 ACMN	Día 30	CSA 2	Barcode 40	AACTGTGCGTAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
42 DYZG	Día 30	CSA 2	Barcode 41	ACCGCAGAGTCA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
43 EGV	Día 30	CSA 2	Barcode 42	ACGGTGAGTGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
44 FJRF	Día 30	CSA 2	Barcode 43	ACTCGATTTCGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
45 JRH	Día 30	CSA 2	Barcode 44	AGACTGCGTACT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
49 LANM	Día 30	CSA 2	Barcode 45	AGCAGTCGCGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
50 LMA	Día 30	CSA 2	Barcode 46	AGGACGCACTGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
51 RVR	Día 30	CSA 2	Barcode 47	AAGAGATGTGCA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
53 EMR	Día 30	CSA 2	Barcode 48	ACAGCAGTGGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
54 DPRL	Día 30	CSA 2	Barcode 49	ACGTACTIONAGTG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
55 JGM	Día 30	KF	Barcode 40	AACTGTGCGTAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
56 NAV	Día 30	KF	Barcode 41	ACCGCAGAGTCA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
57 RMPM	Día 30	KF	Barcode 42	ACGGTGAGTGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
58 APCM	Día 30	KF	Barcode 43	ACTCGATTTCGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
59 HSL	Día 30	KF	Barcode 44	AGACTGCGTACT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
60 EOPS	Día 30	KF	Barcode 45	AGCAGTCGCGAT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
61 AKGB	Día 30	KF	Barcode 46	AGGACGCACTGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
Todos	Todos	Todos	V3-518 R	No aplica	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT

Tabla 15. Índices de riqueza y diversidad bacteriana por grupo

Índices	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Número de participantes	35	35	35	ND
Observadas	2491±963	2625±1098	3111±1672	0.300 ^a
Chao1	4777±1632	5052±1852	5771±2486	0.110 ^b
Shannon	4.50±0.39	4.42±0.49	4.70±0.38	0.028 ^a
Simpson	0.96±0.02	0.96±0.03	0.97±0.02	0.144 ^a
Observadas: Riqueza de especies observadas; Chao1: Estimado de riqueza de especies; Shannon: Índice de diversidad Shannon-Wiener; Simpson: Índice de diversidad de Simpson; ND: no determinado. Datos estadísticos promedio ± desviación estándar. Los valores p fueron calculados con: ^a Kruskal-Wallis y ^b ANOVA. Un valor p<0.05 es considerado estadísticamente significativo.				

Tabla 16. Índices de riqueza y diversidad bacteriana por género (masculino)

Índices	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Número de participantes	35	35	35	nd
Observadas	2518±1031	2556±866	3028±1831	0.670 ^a
Chao1	4815±1761	4960±1444	5692±2770	0.685 ^a
Shannon	4.53±0.43	4.45±0.43	4.66±0.44	0.301 ^b
Simpson	0.96±0.02	0.96±0.03	0.96±0.02	0.670 ^a
Observadas: Riqueza de especies observadas; Chao1: Estimado de riqueza de especies; Shannon: Índice de diversidad Shannon-Wiener; Simpson: Índice de diversidad de Simpson; ND: no determinado. Datos estadísticos promedio ± desviación estándar. Los valores p fueron calculados con: ^a Kruskal-Wallis y ^b ANOVA. Un valor p<0.05 es considerado estadísticamente significativo.				

Tabla 17. Índices de riqueza y diversidad bacteriana por género (femenino)

Índices	Día 1	Día 15	Día 30	Valor-p
Número de participantes	35	35	35	nd
Observadas	2449±887	2728±1408	3236±1458	0.267 ^b
Chao1	4721±1480	5188±2394	5890±2082	0.316 ^b
Shannon	4.44±0.33	4.38±0.58	4.77±0.24	0.036 ^b
Simpson	0.96±0.01	0.95±0.03	0.97±0.01	0.088 ^a
Observadas: Riqueza de especies observadas; Chao1: Estimado de riqueza de especies; Shannon: Índice de diversidad Shannon-Wiener; Simpson: Índice de diversidad de Simpson; ND: no determinado. Datos estadísticos promedio ± desviación estándar. Los valores p fueron calculados con: ^a Kruskal-Wallis y ^b ANOVA. Un valor p<0.05 es considerado estadísticamente significativo.				

Anexo 3. Figuras.

Figura 42	Análisis MaAsLin de los participantes por grupo.	86
Figura 43	Análisis MaAsLin de los participantes por grupo.	86
Figura 44	Análisis MaAsLin de los participantes por grupo.	87
Figura 45	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cadera.	87
Figura 46	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cadera.	88
Figura 47	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura.	88
Figura 48	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura.	89
Figura 49	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura.	89
Figura 50	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura.	90
Figura 51	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura.	90
Figura 52	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura.	91
Figura 53	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de estatura.	91
Figura 54	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC.	92
Figura 55	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC.	92
Figura 56	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC.	93
Figura 57	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC.	93
Figura 58	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC.	94
Figura 59	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC.	94
Figura 60	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC.	95
Figura 61	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra peso.	95
Figura 62	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra presión diastólica.	96
Figura 63	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	96
Figura 64	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	97

Figura 65	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	97
Figura 66	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	98
Figura 67	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	98
Figura 68	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT.	99
Figura 69	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina indirecta.	99
Figura 70	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina total.	100
Figura 71	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa.	100
Figura 72	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa.	101
Figura 73	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa.	101
Figura 74	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa.	102
Figura 75	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol.	102
Figura 76	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol.	103
Figura 77	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol.	103
Figura 78	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol.	104
Figura 79	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	104
Figura 80	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	105
Figura 81	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	105
Figura 82	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	106
Figura 83	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	106
Figura 84	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	107
Figura 85	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	107
Figura 86	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina.	108
Figura 87	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	108

Figura 88	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	109
Figura 89	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	109
Figura 90	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	110
Figura 91	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	110
Figura 92	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	111
Figura 93	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	111
Figura 94	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	112
Figura 95	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	112
Figura 96	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	113
Figura 97	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	113
Figura 98	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	114
Figura 99	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	114
Figura 100	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	115
Figura 101	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero.	115
Figura 102	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra HDL.	116
Figura 103	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra HDL.	116
Figura 104	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra índice aterogénico.	117
Figura 105	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL.	117
Figura 106	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL.	118
Figura 107	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL.	118
Figura 108	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL.	119
Figura 109	Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL.	119

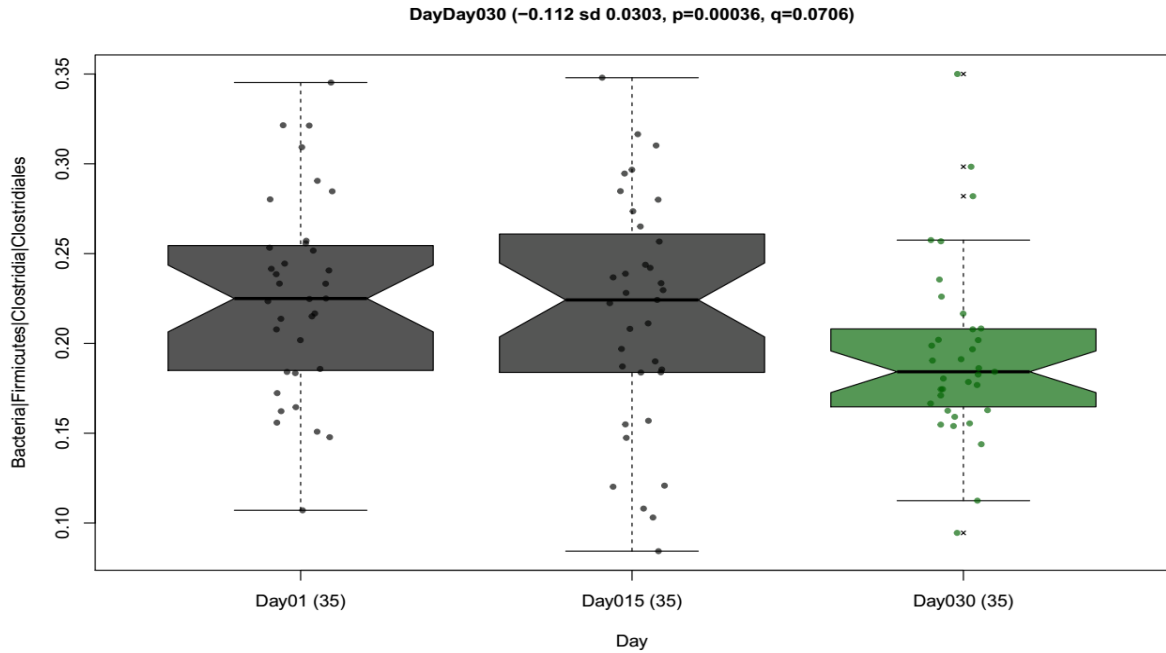


Figura 42. Análisis MaAsLin de los participantes por grupo. Se realizó una comparación de los datos de abundancia bacteriana, y agrupando por tiempo (día 1, 15 y 30). Se observa una asociación del orden *Clostridiales*. que no fue significativa de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

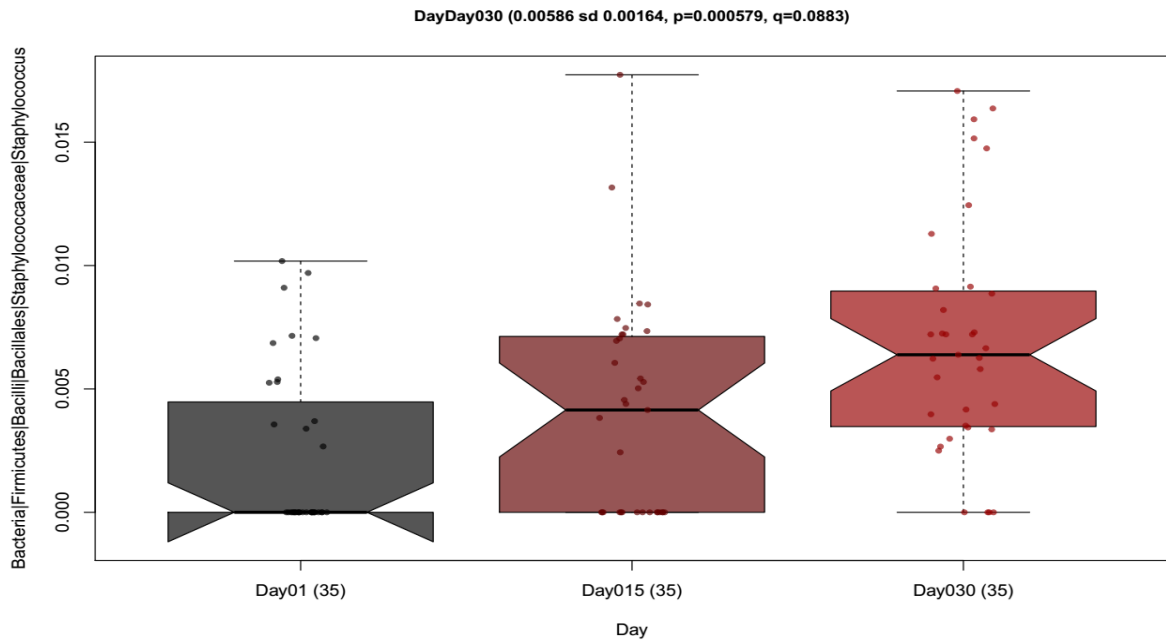


Figura 43. Análisis MaAsLin de los participantes por grupo. Se realizó una comparación de los datos de abundancia bacteriana, y agrupando por tiempo (día 1, 15 y 30). Se observa una asociación del género *Staphylococcus* spp. que no fue significativa de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

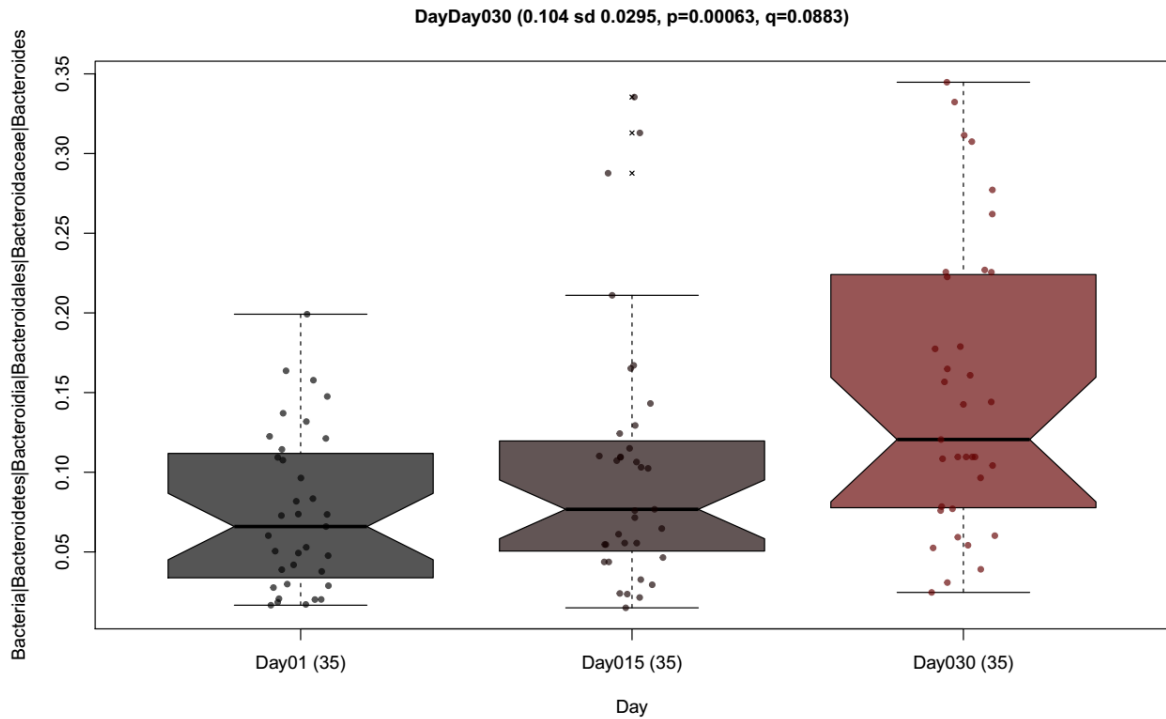


Figura 44. Análisis MaAsLin de los participantes por grupo. Se realizó una comparación de los datos de abundancia bacteriana, y agrupando por tiempo (día 1, 15 y 30). Se observa una asociación del género *Bacteroides* spp. que no fue significativa de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

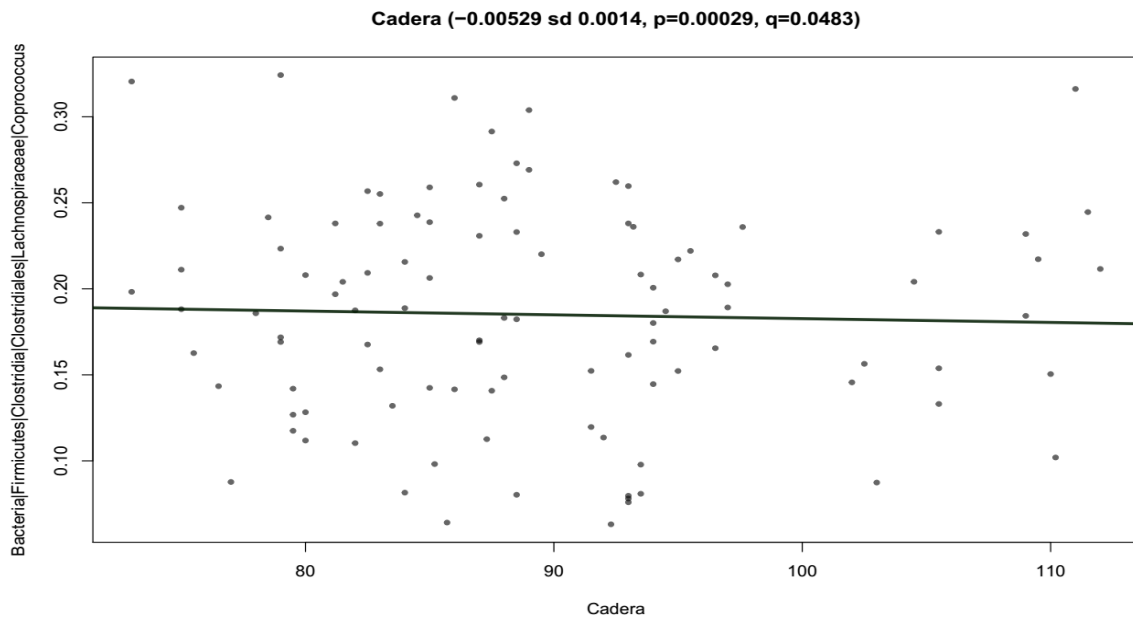


Figura 45. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cadera. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cadera (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Coprococcus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

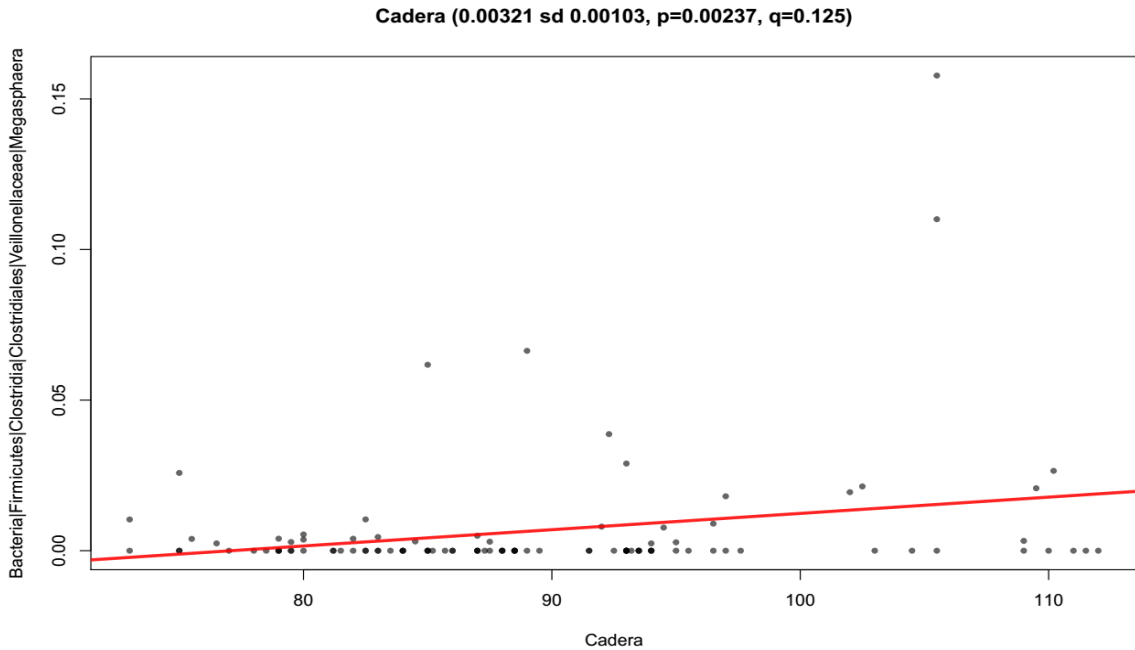


Figura 46. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cadera. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cadera (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Megasphaera* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

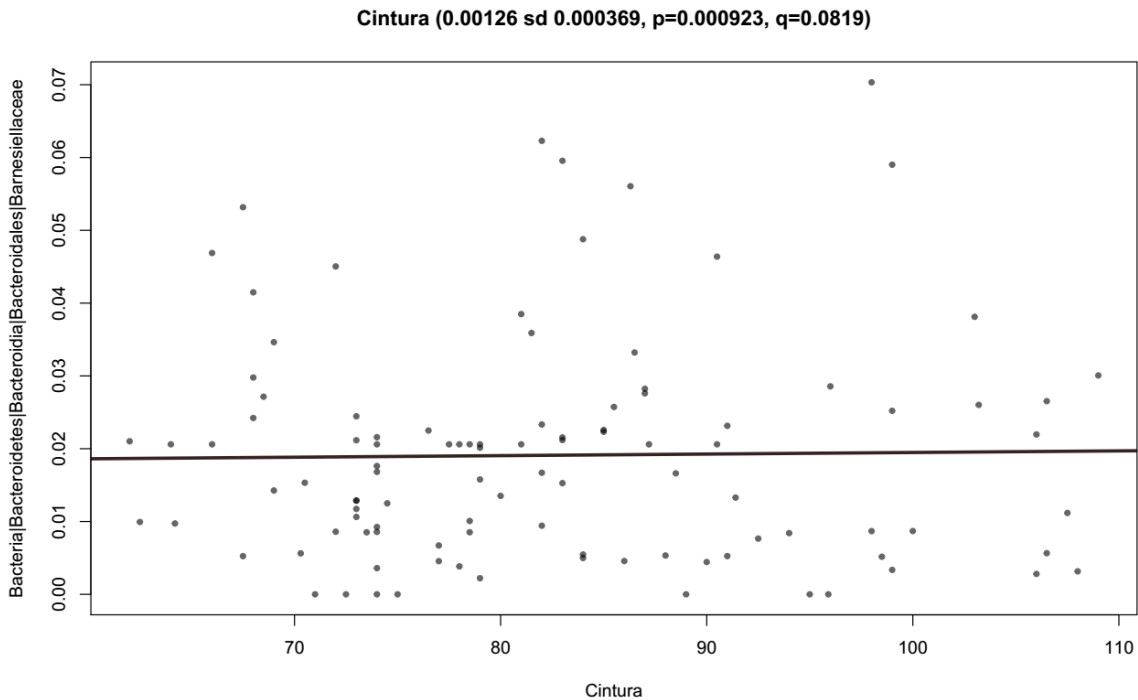


Figura 47. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cintura (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Barnesiellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

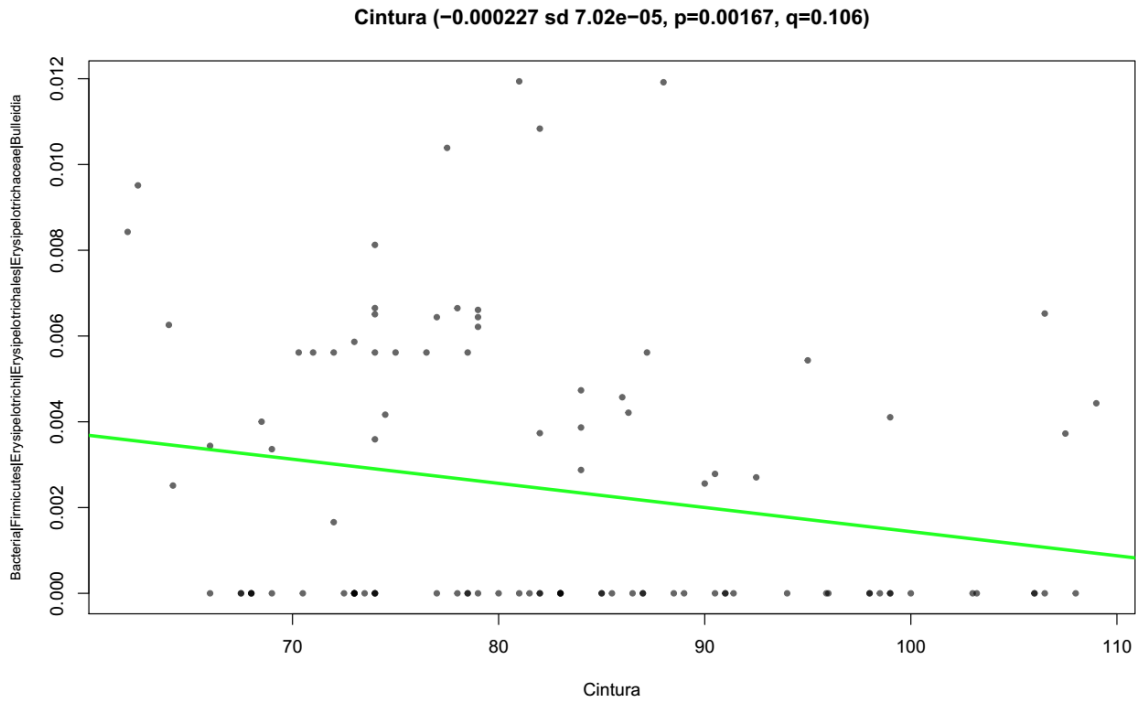


Figura 48. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cintura (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Bulleidia* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

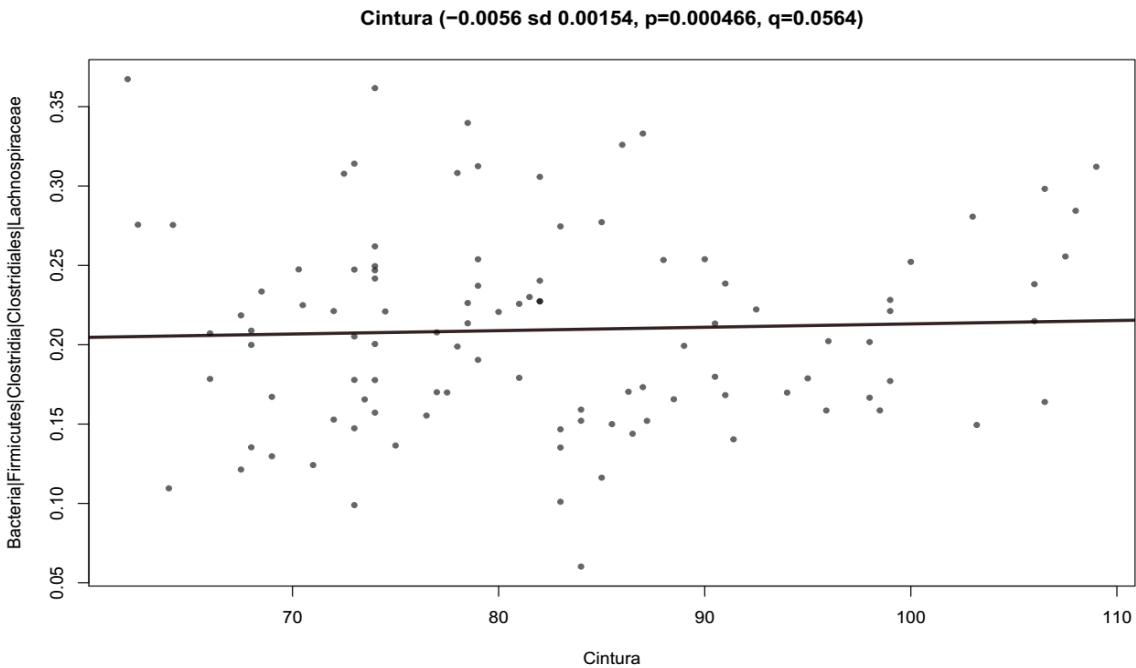


Figura 49. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cintura (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Lachnospiraceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

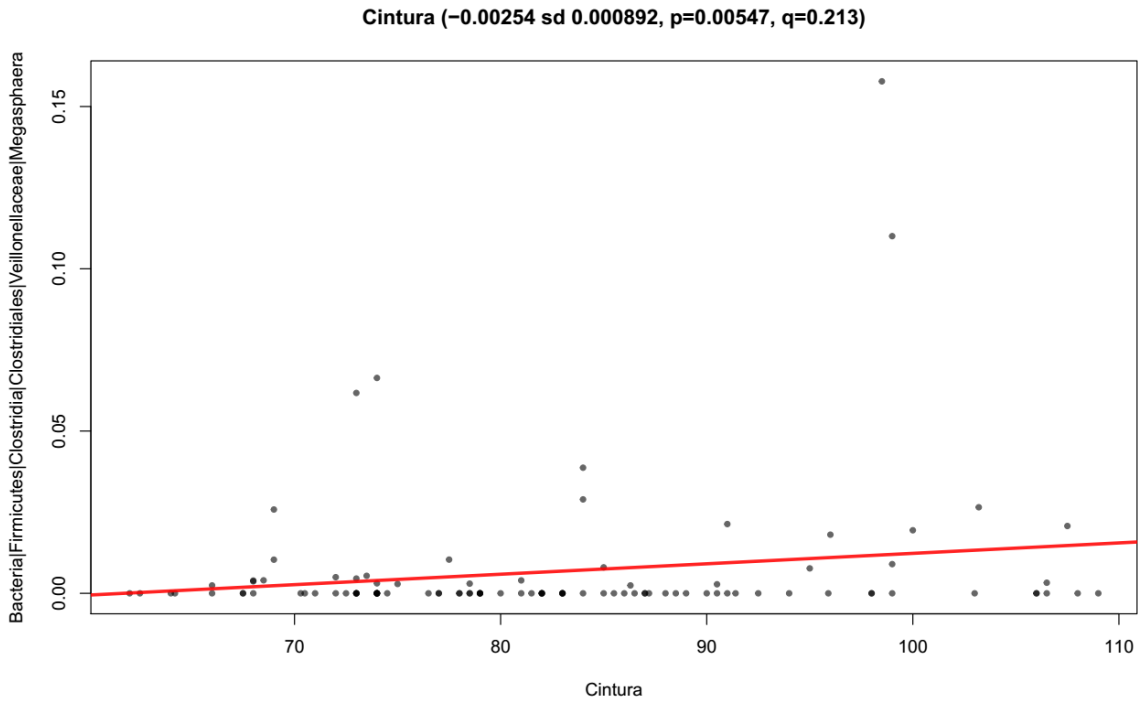


Figura 50. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cintura (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Megasphaera* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

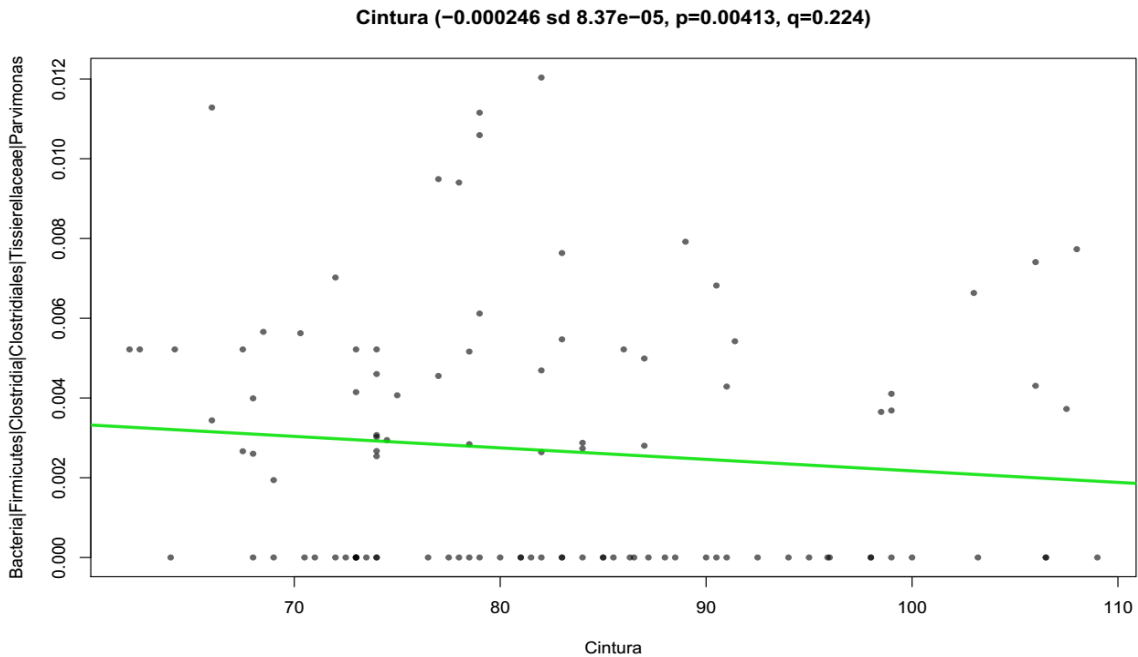


Figura 51. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cintura (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Parvimonas* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

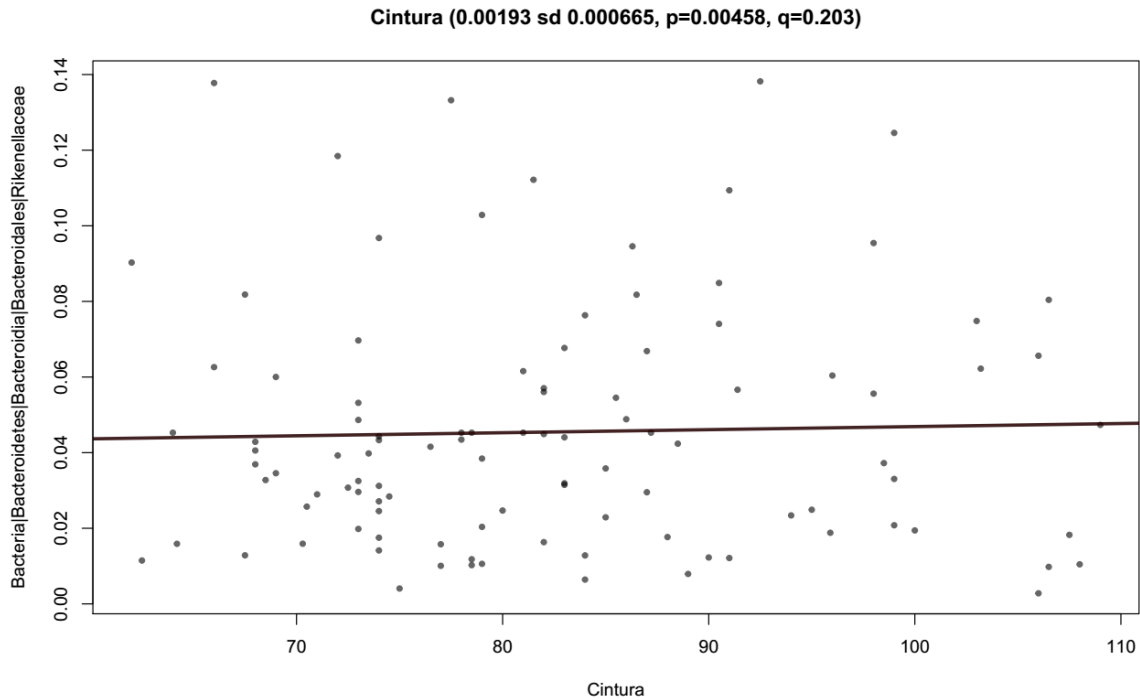


Figura 52. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de cintura. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de cintura (cm) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Rickenellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

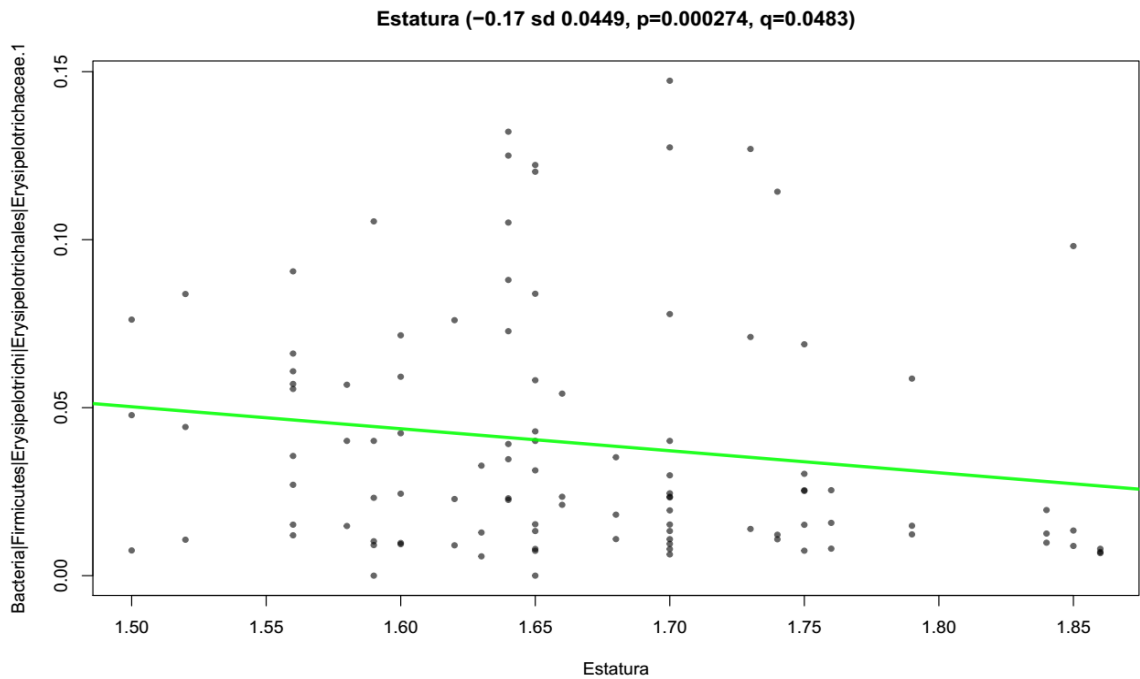


Figura 53. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra la medida de estatura. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de estatura (m) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Erysipelotrichaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

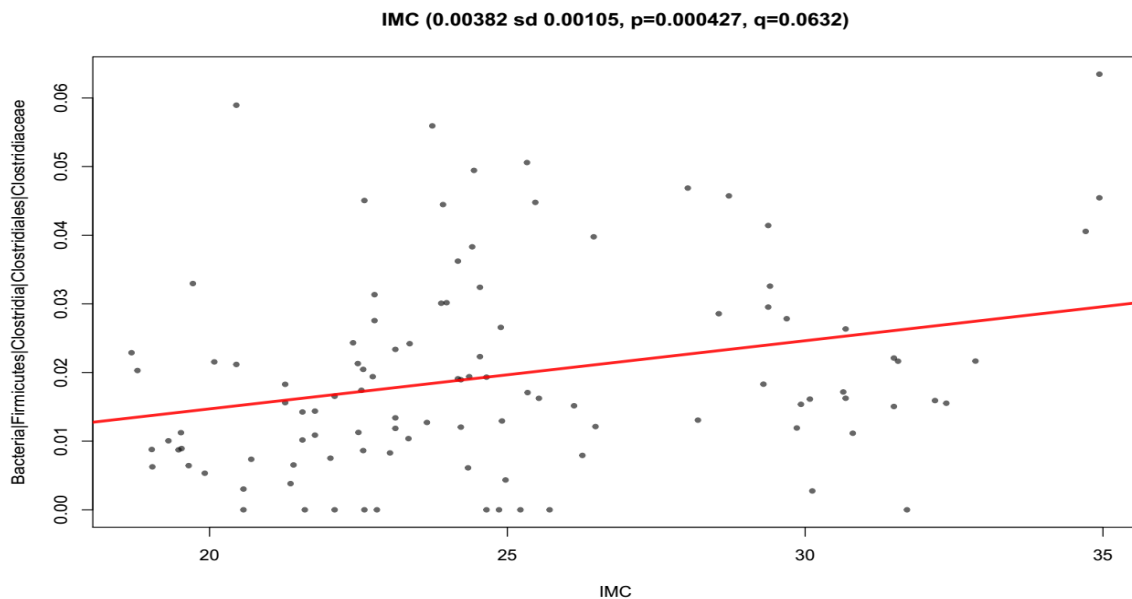


Figura 54. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de IMC (kg/m^2) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Clostridiaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

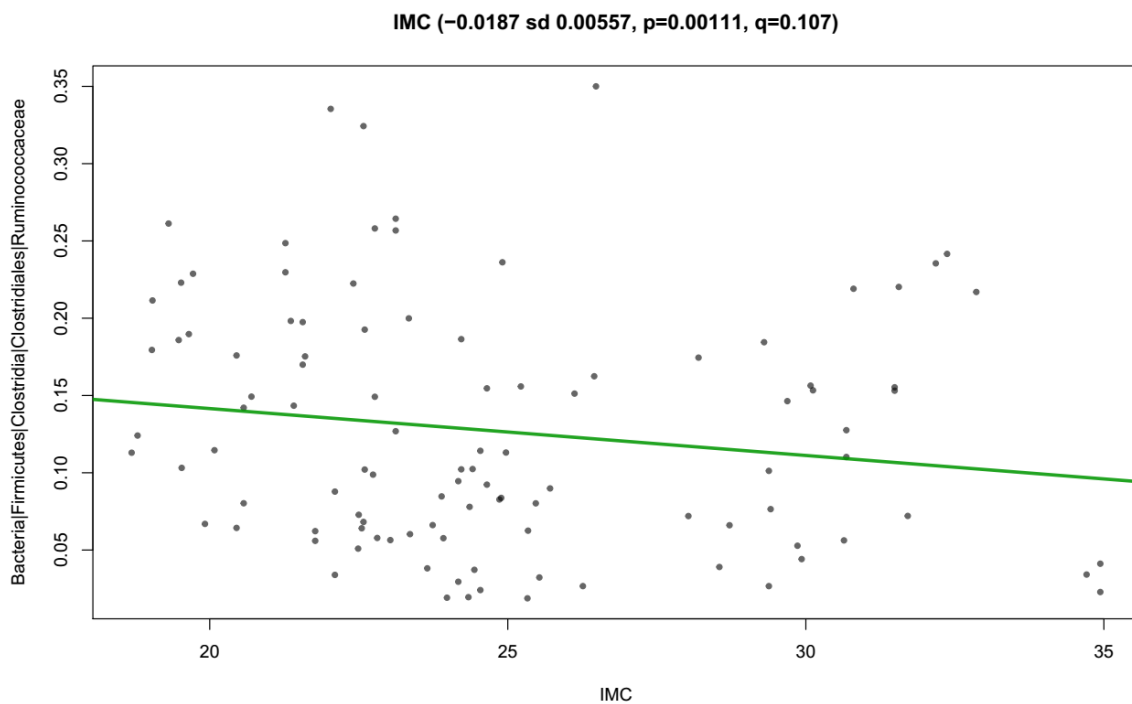


Figura 55. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de IMC (kg/m^2) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Ruminococcaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

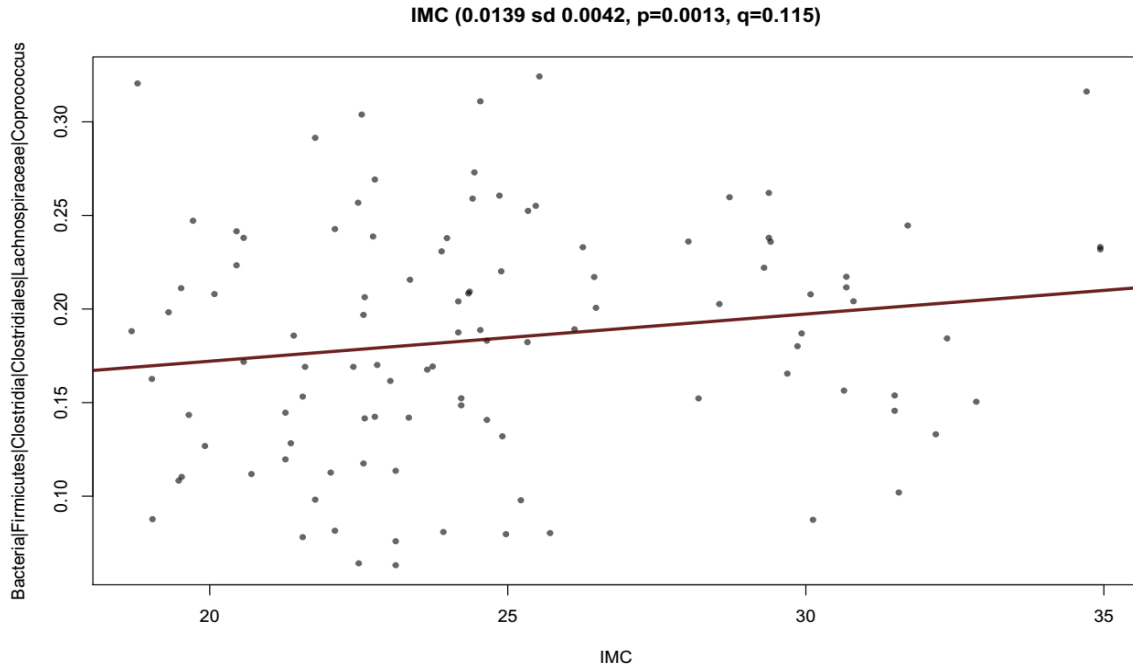


Figura 56. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de IMC (kg/m²) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Coprococcus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

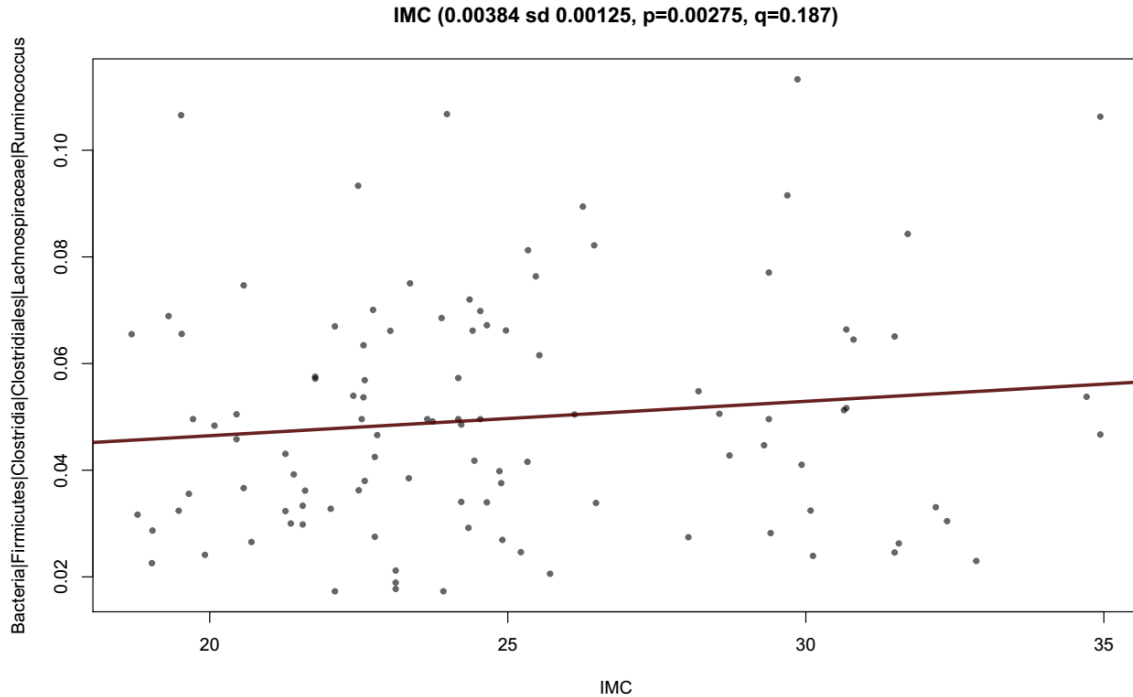


Figura 57. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de IMC (kg/m²) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Ruminococcus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

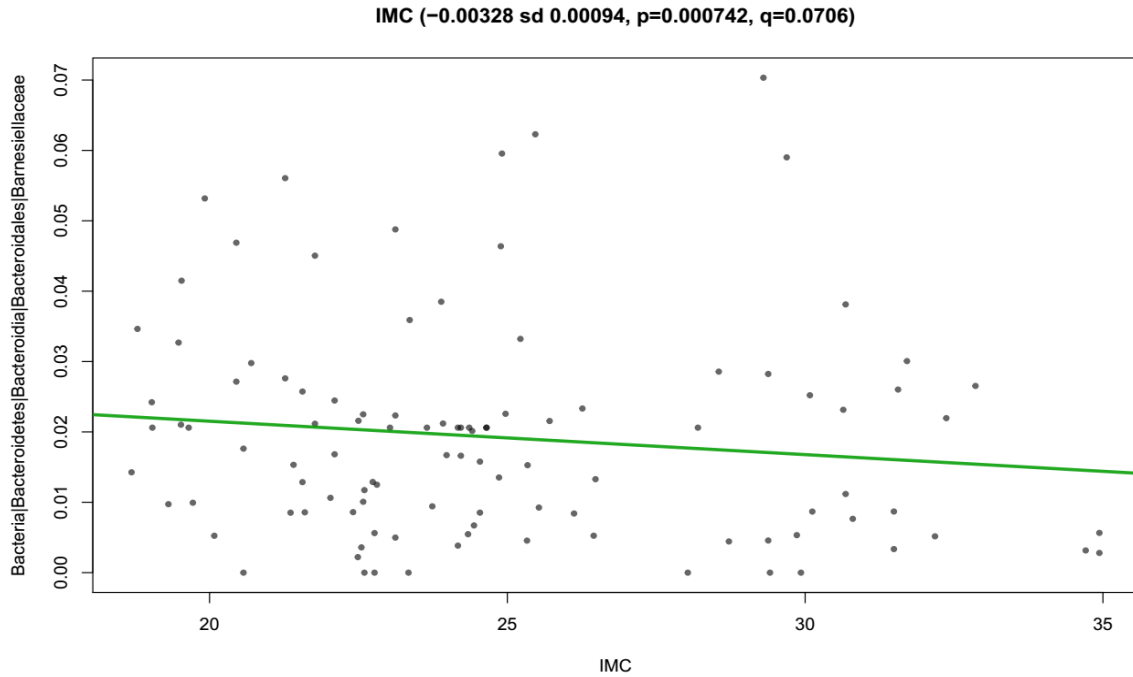


Figura 58. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de IMC (kg/m²) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Barnesiellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

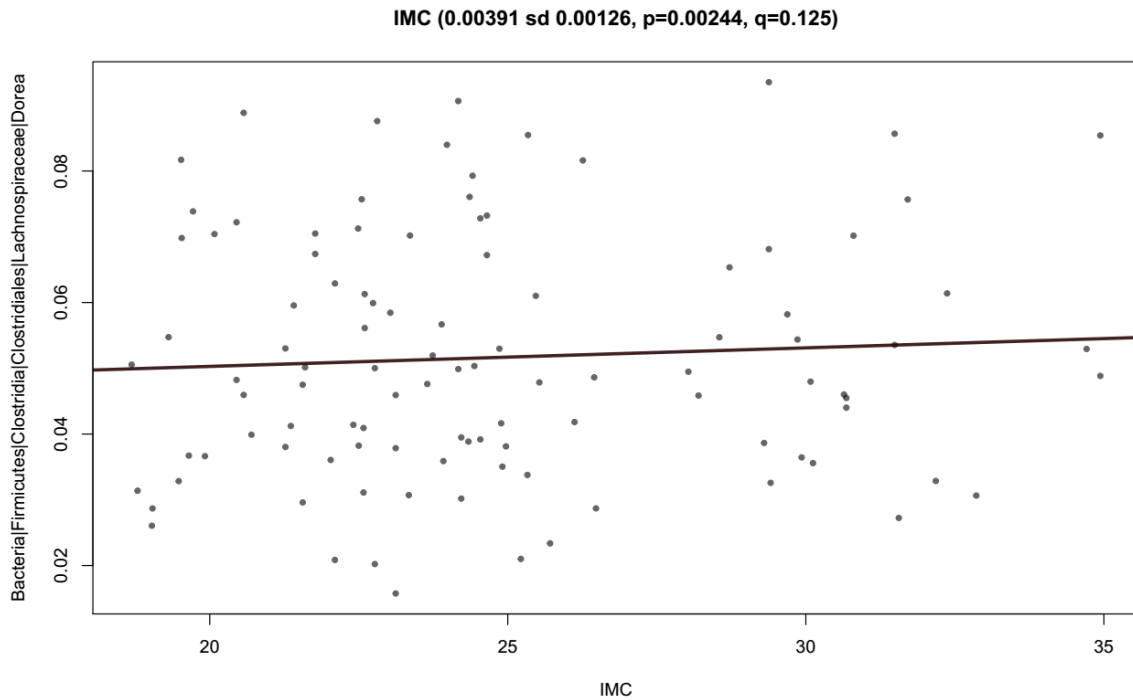


Figura 59. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de IMC (kg/m²) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Dorea* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

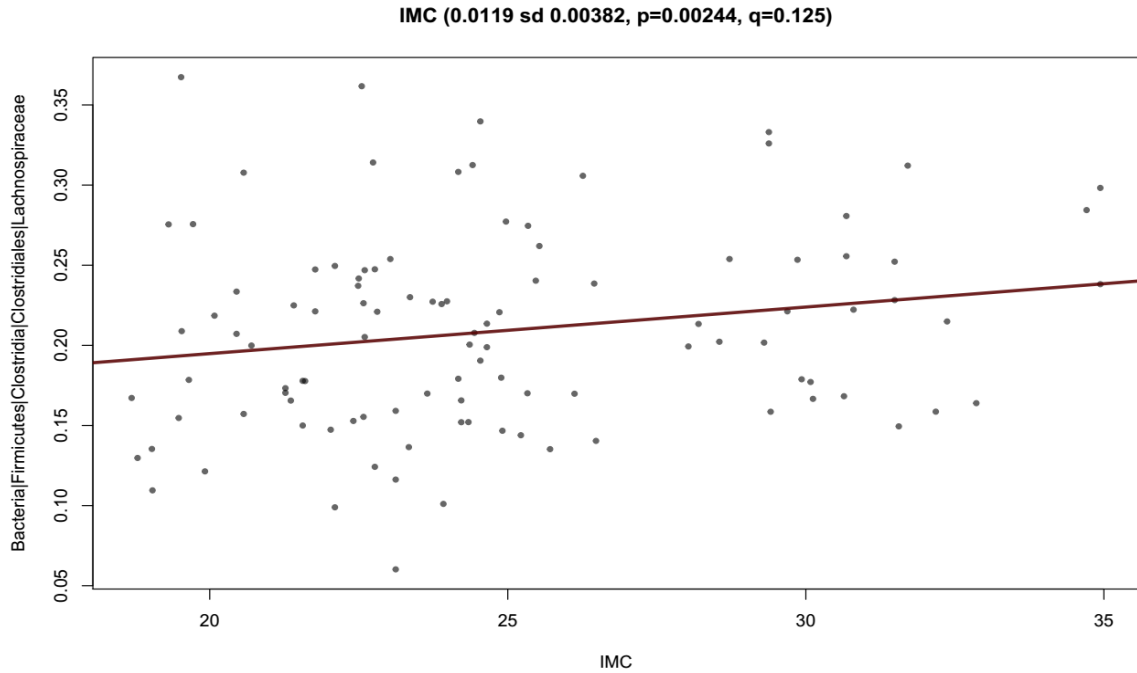


Figura 60. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra IMC. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de IMC (kg/m²) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Lachnospiraceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

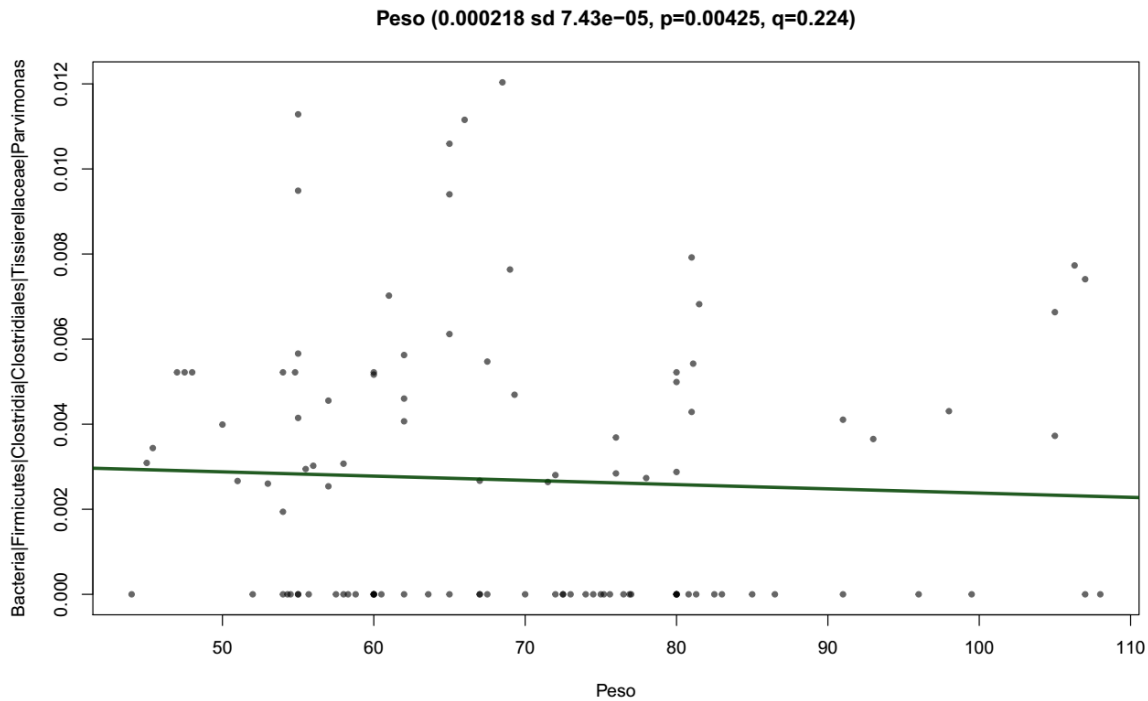


Figura 61. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra peso. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de peso (kg) contra abundancia relativa, observándose una asociación del género *Parvimonas* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

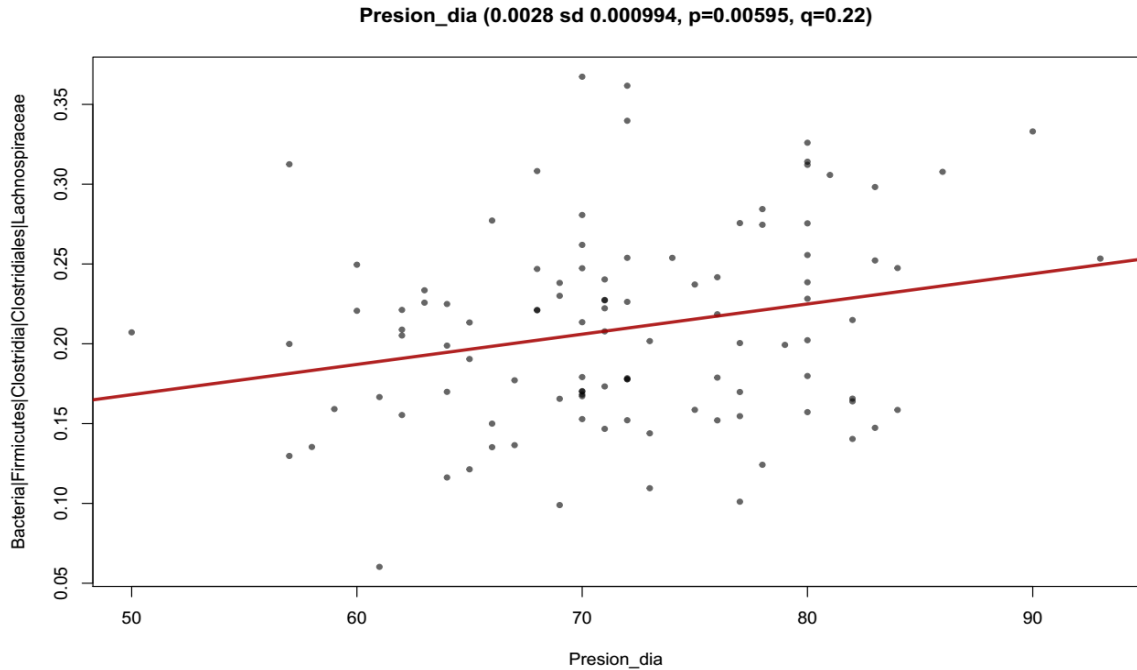


Figura 62. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra presión diastólica. Se realizó una comparación de los datos antropométricos de presión diastólica (mmHg) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Lachnospiraceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

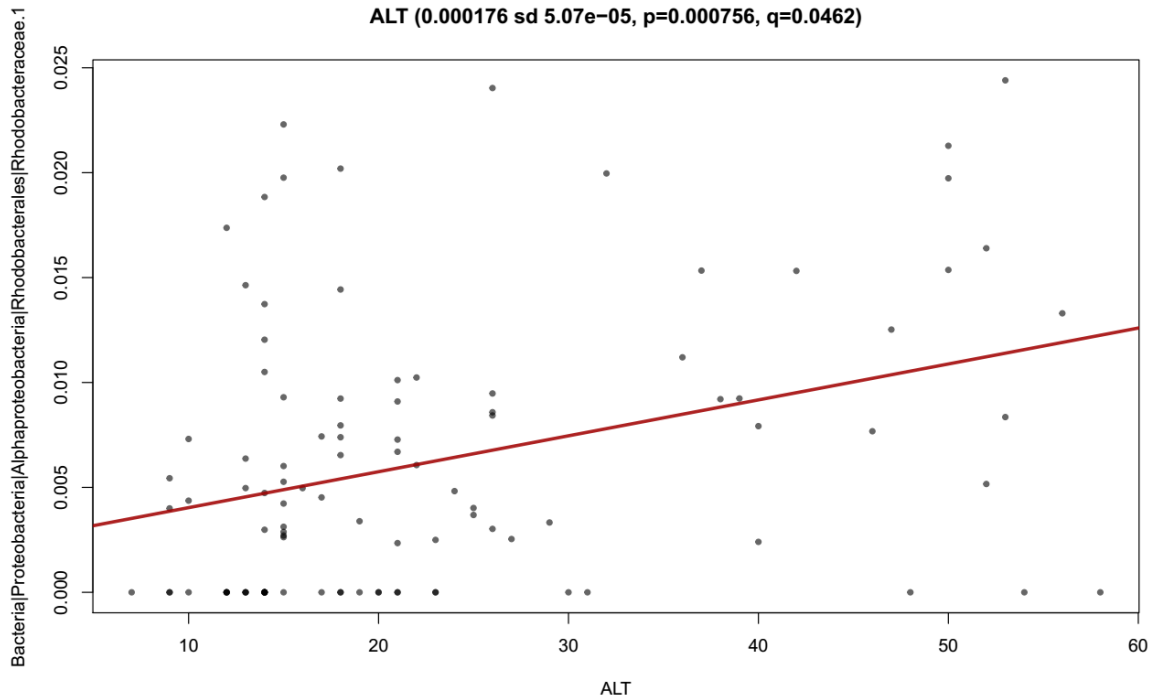


Figura 63. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Rhodobacteraceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

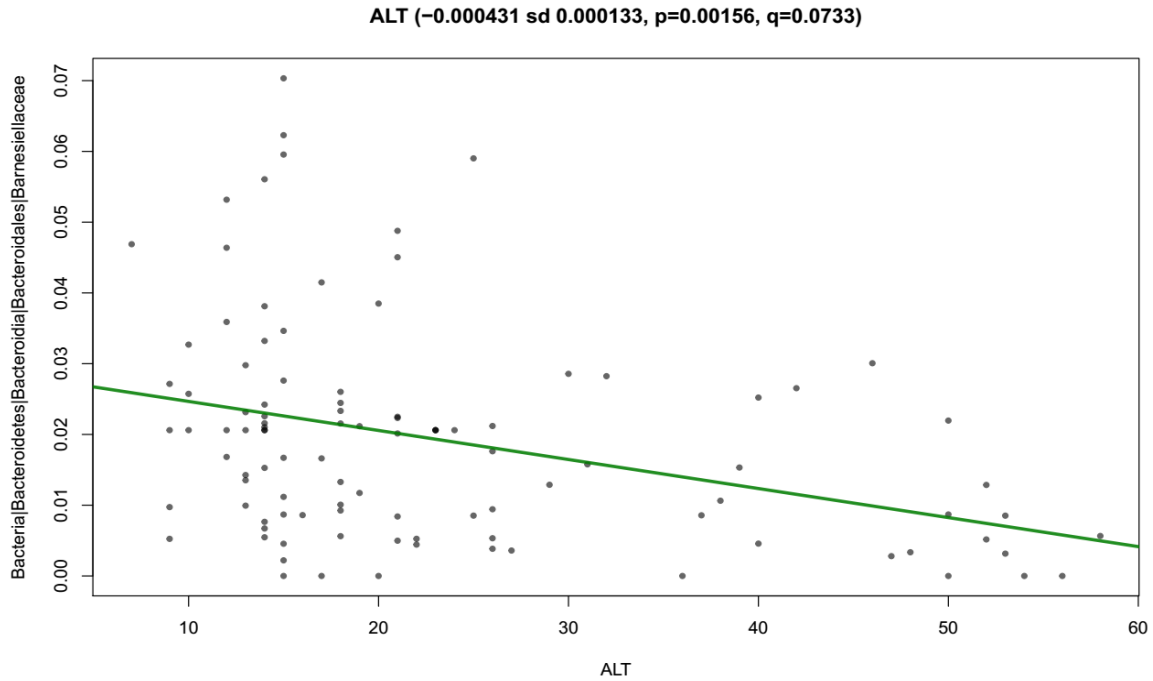


Figura 64. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Barnesiellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

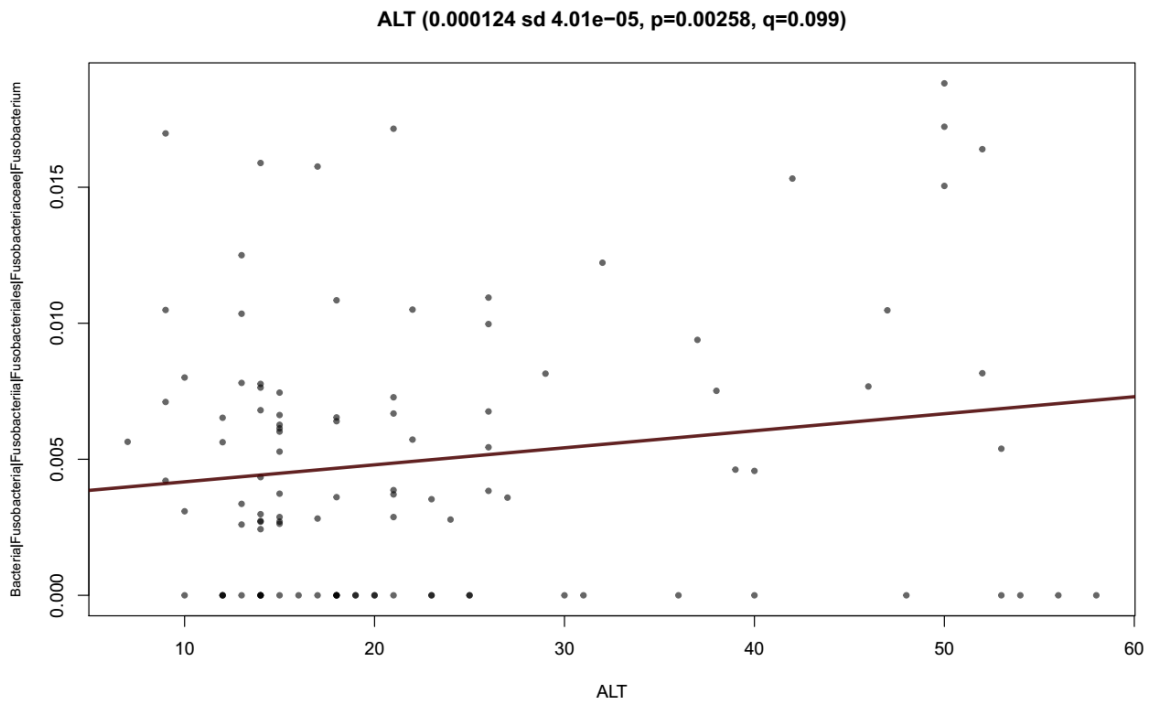


Figura 65. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Fusobacterium* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

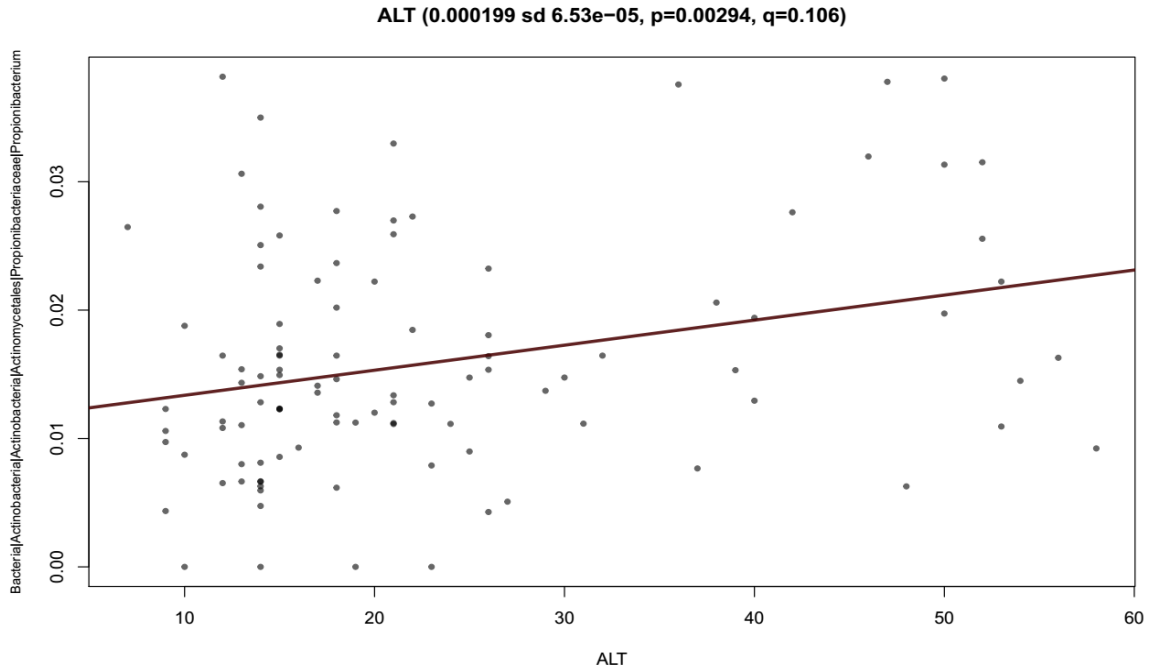


Figura 66. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Propionibacterium* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

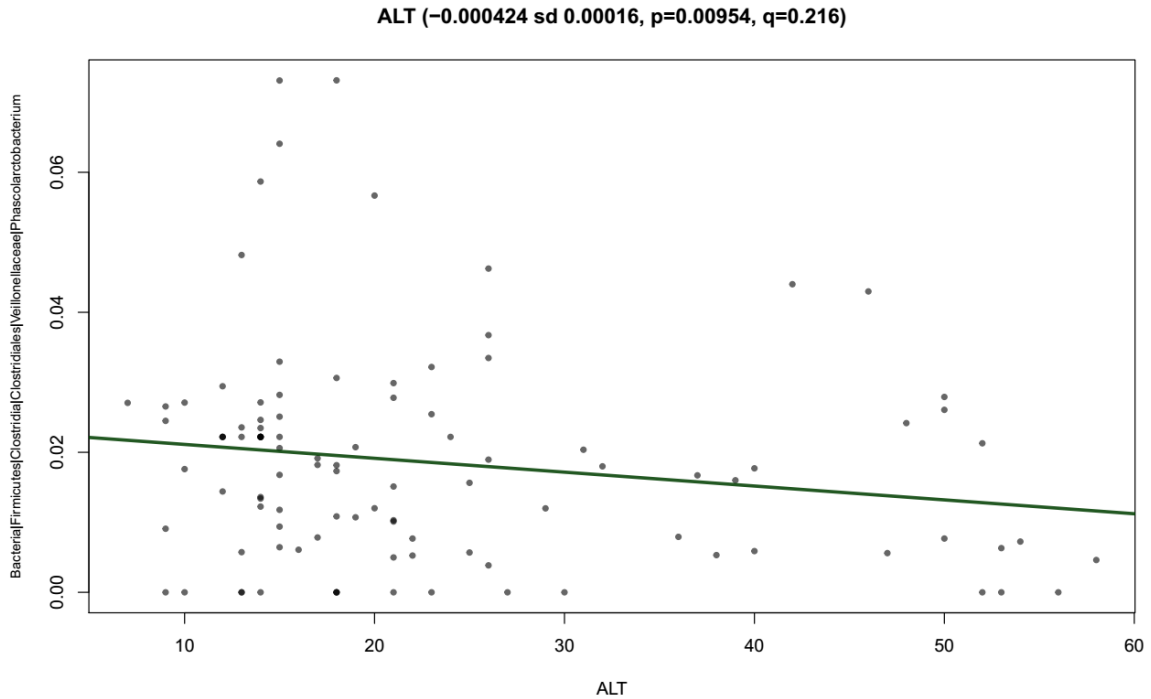


Figura 67. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Phascolarctobacterium* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

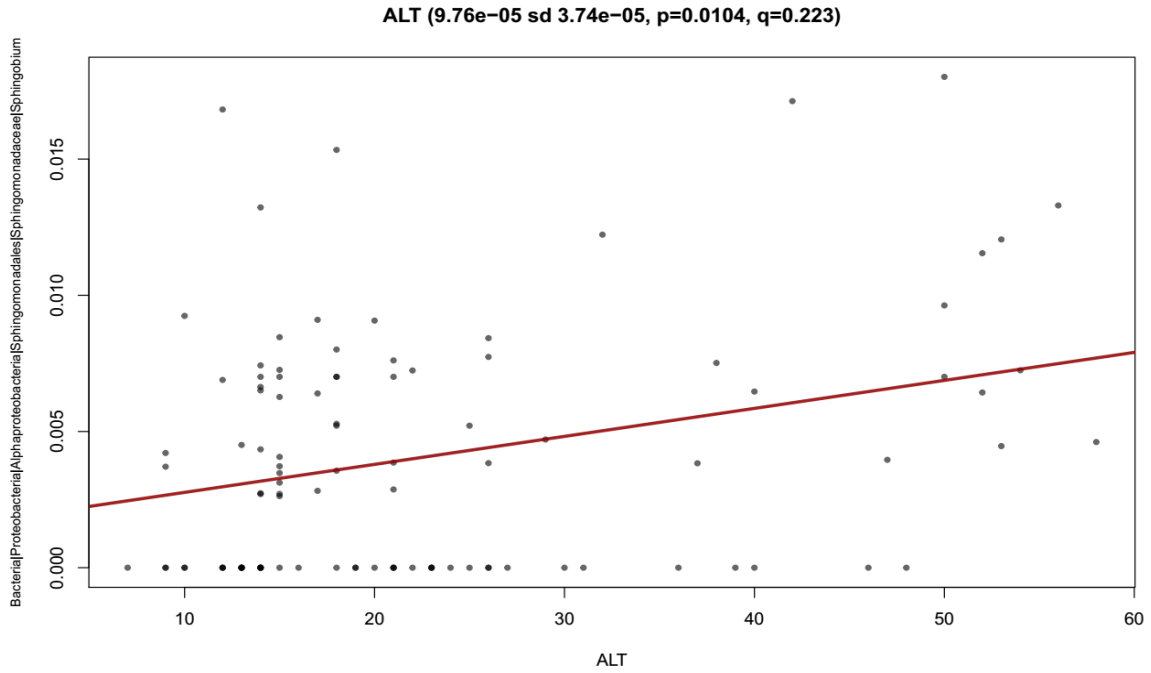


Figura 68. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra ALT. Se realizó una comparación de los datos clínicos de ALT (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Sphingobium* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

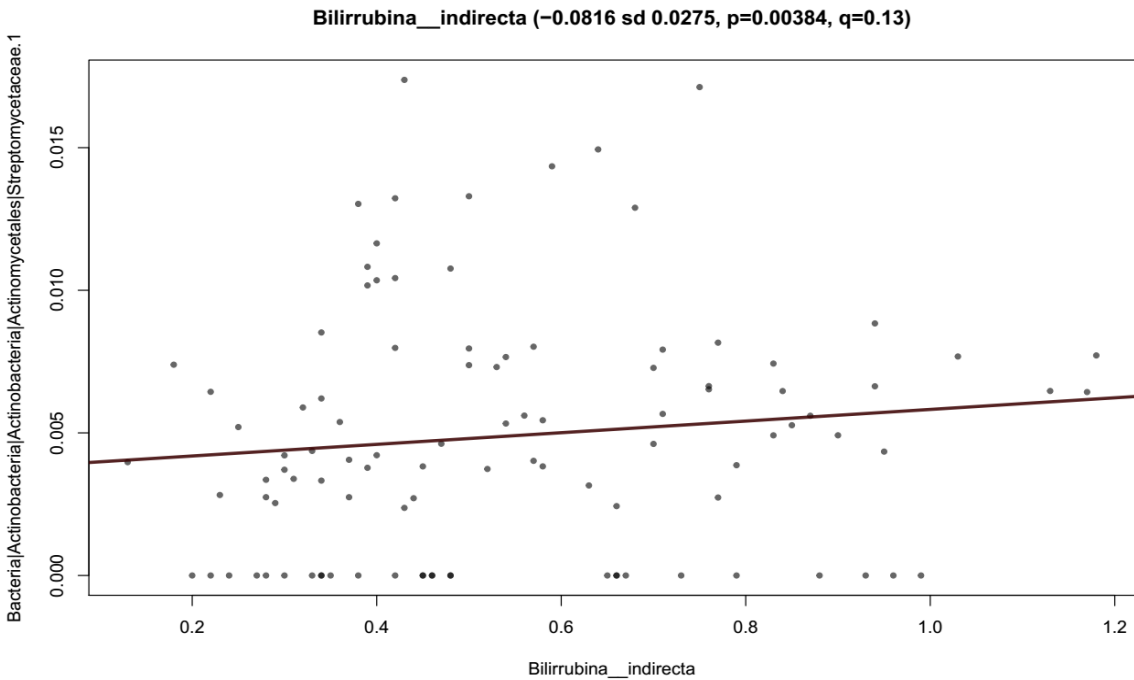


Figura 69. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina indirecta. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina indirecta (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Streptomycetaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

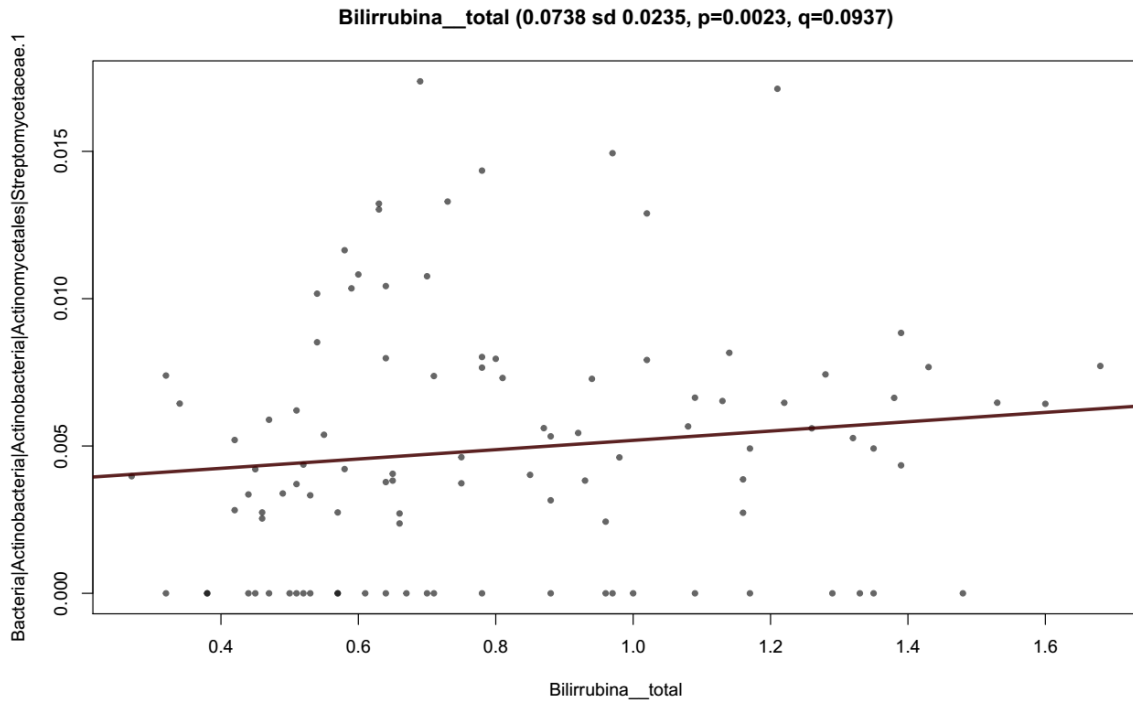


Figura 70. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina total. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina total (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Streptomyetaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

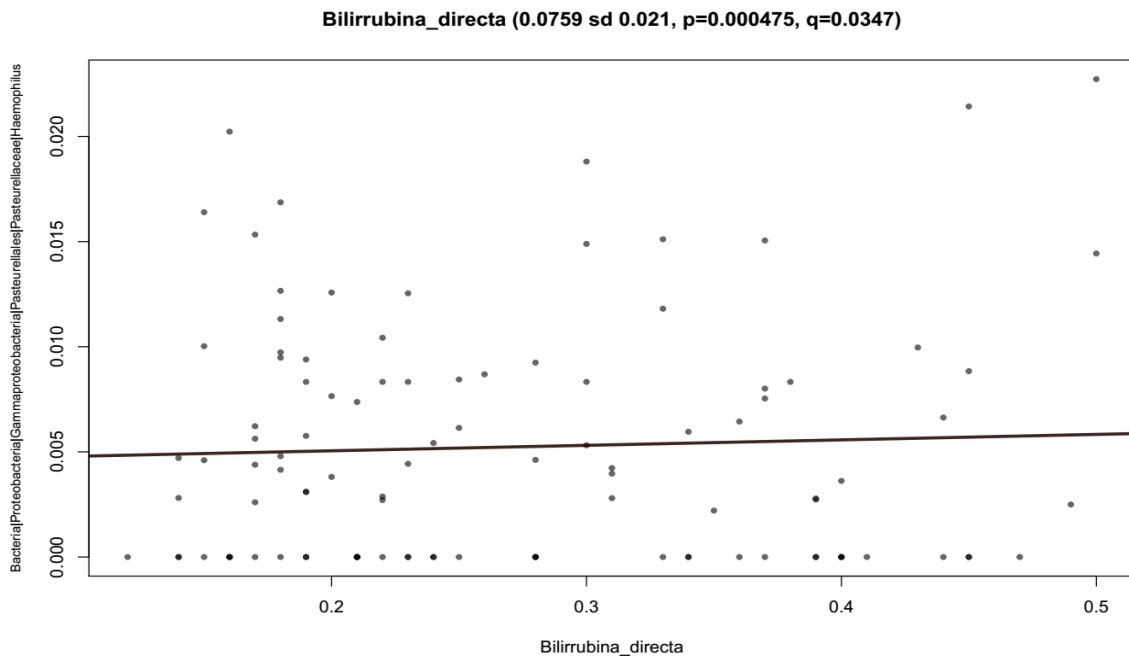


Figura 71. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina directa (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Haemophilus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

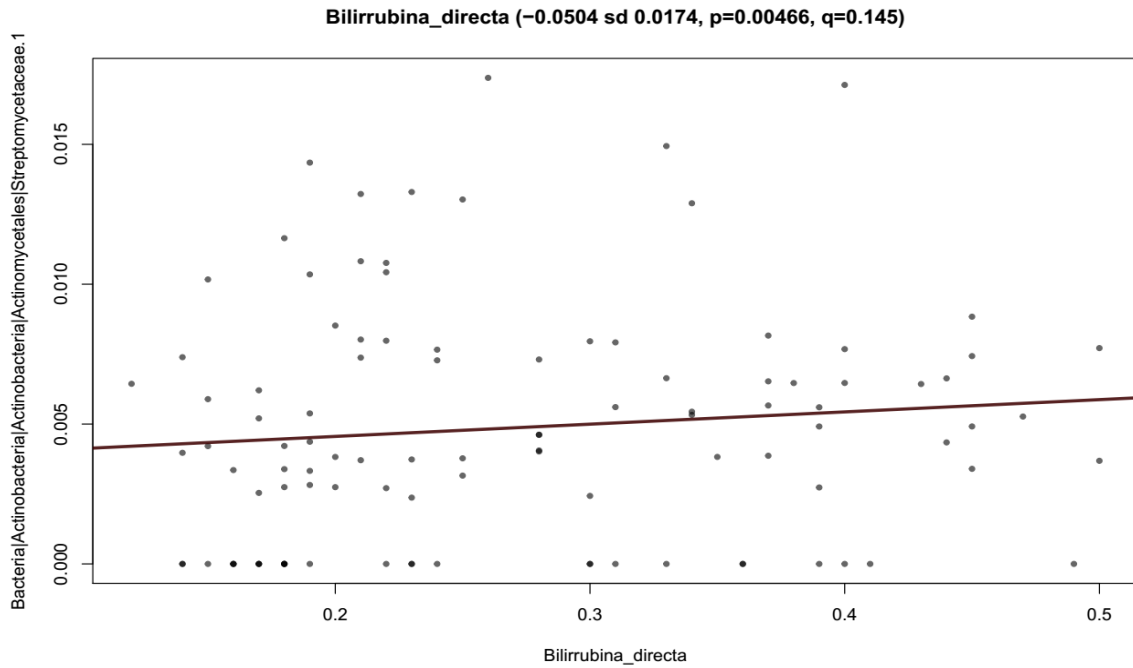


Figura 72. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina directa (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Streptomyetaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

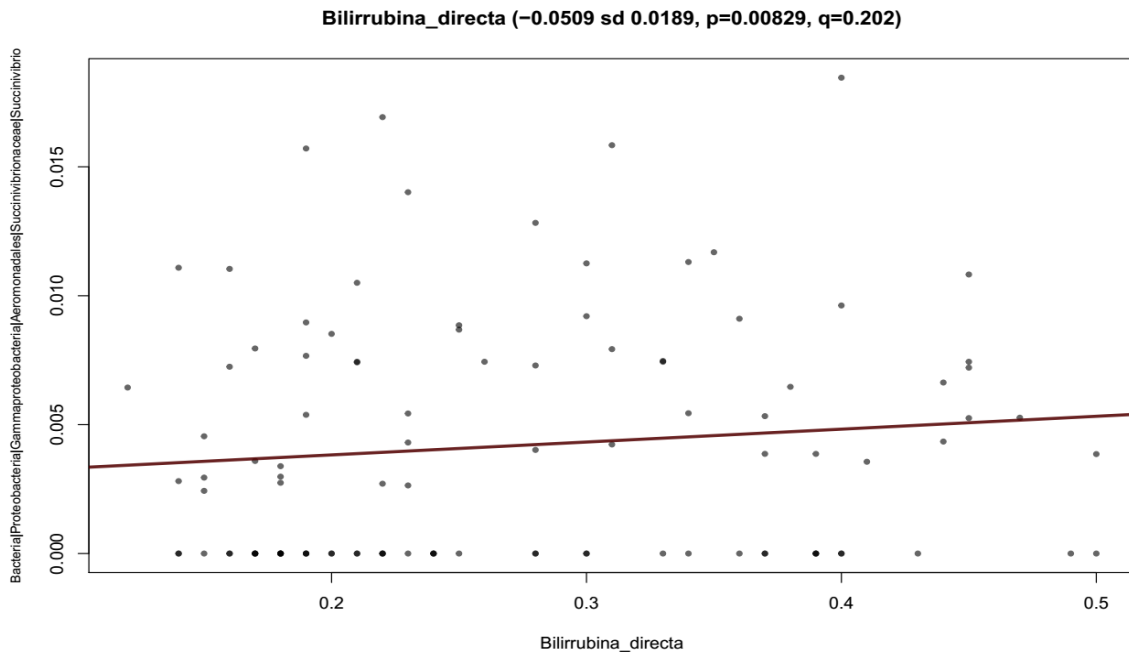


Figura 73. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina directa (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Succinivibrio* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

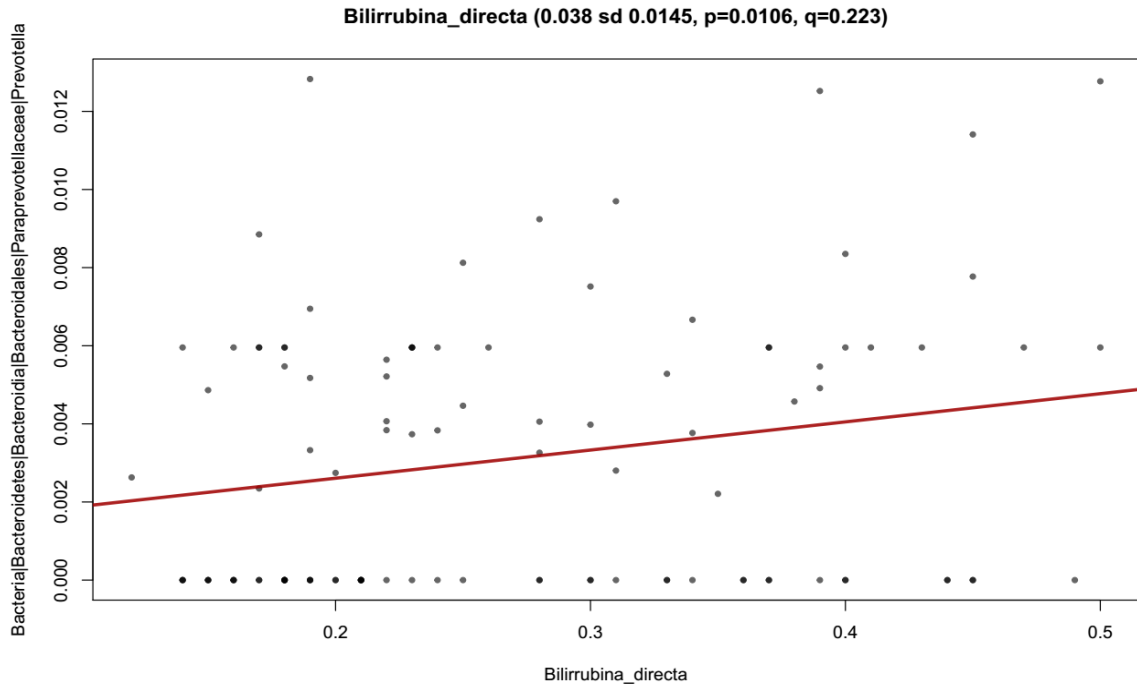


Figura 74. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra bilirrubina directa. Se realizó una comparación de los datos clínicos de bilirrubina directa (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Prevotella* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

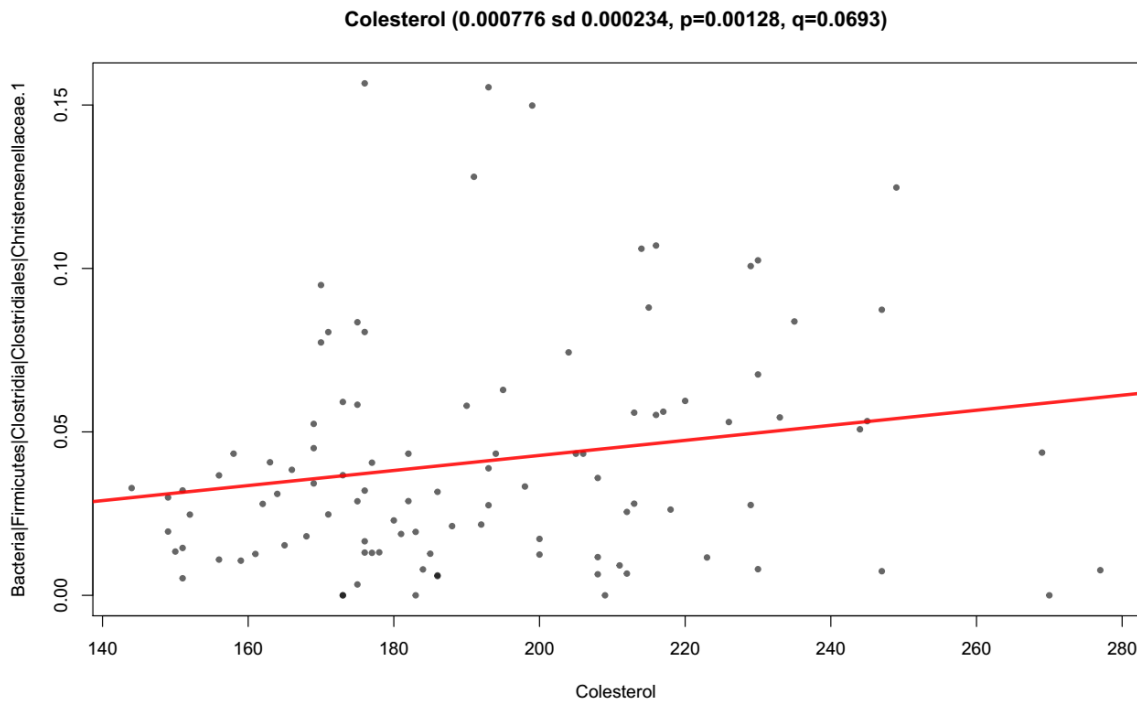


Figura 75. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol. Se realizó una comparación de los datos clínicos de colesterol (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Christenellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

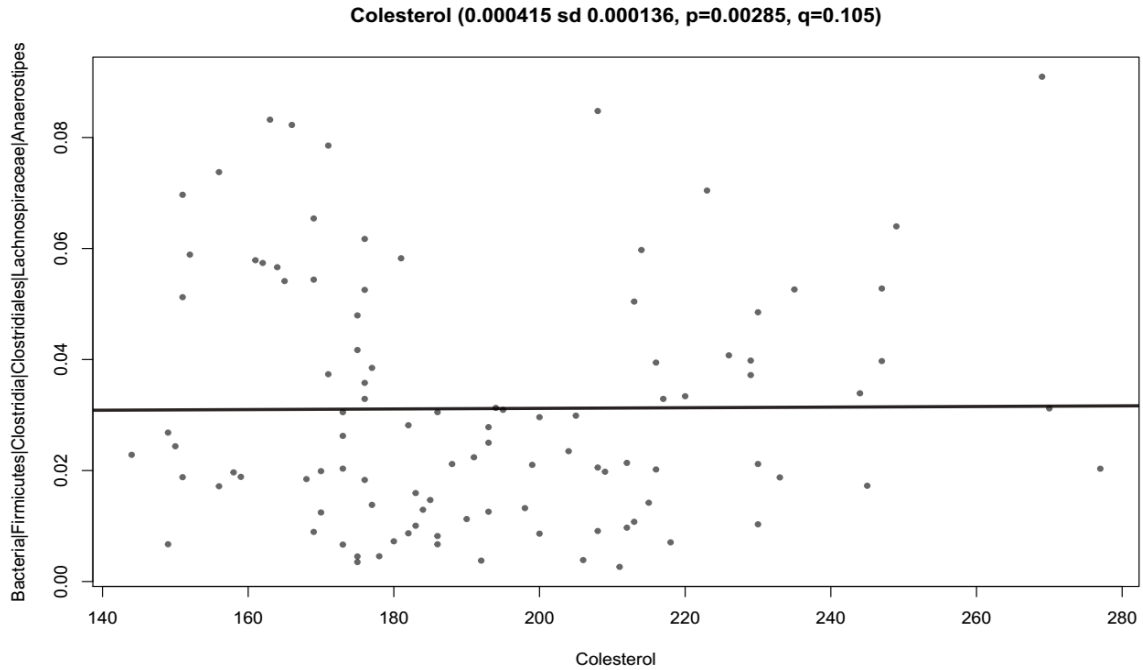


Figura 76. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol. Se realizó una comparación de los datos clínicos de colesterol (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Anaerostipes* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

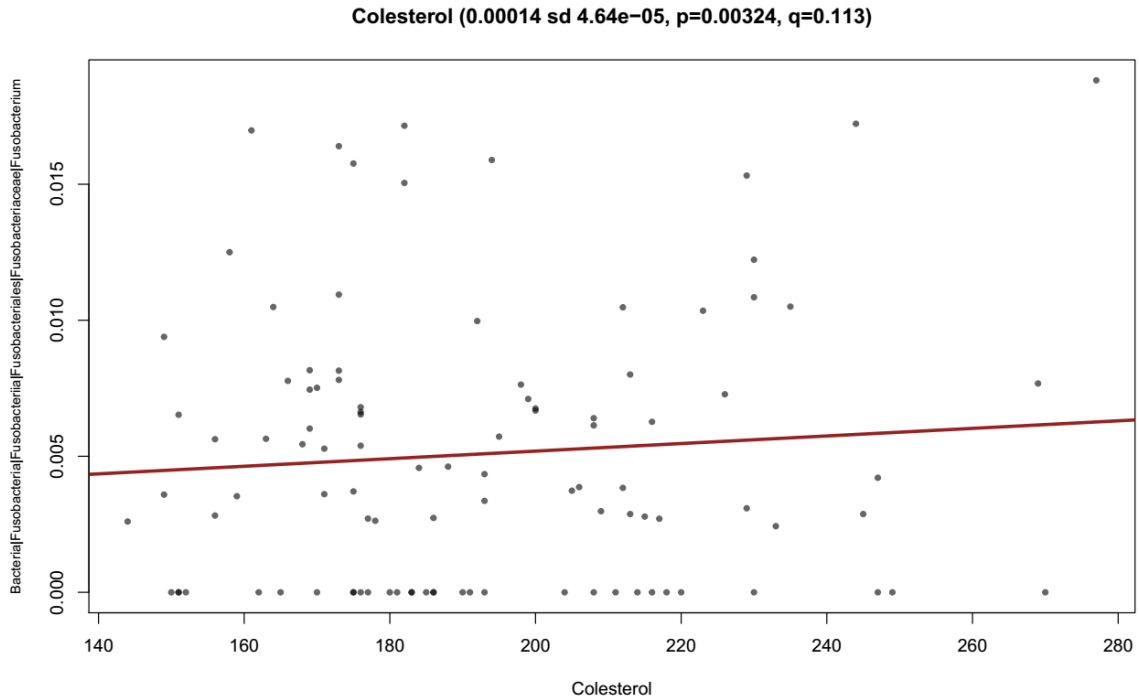


Figura 77. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol. Se realizó una comparación de los datos clínicos de colesterol (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Fusobacterium* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

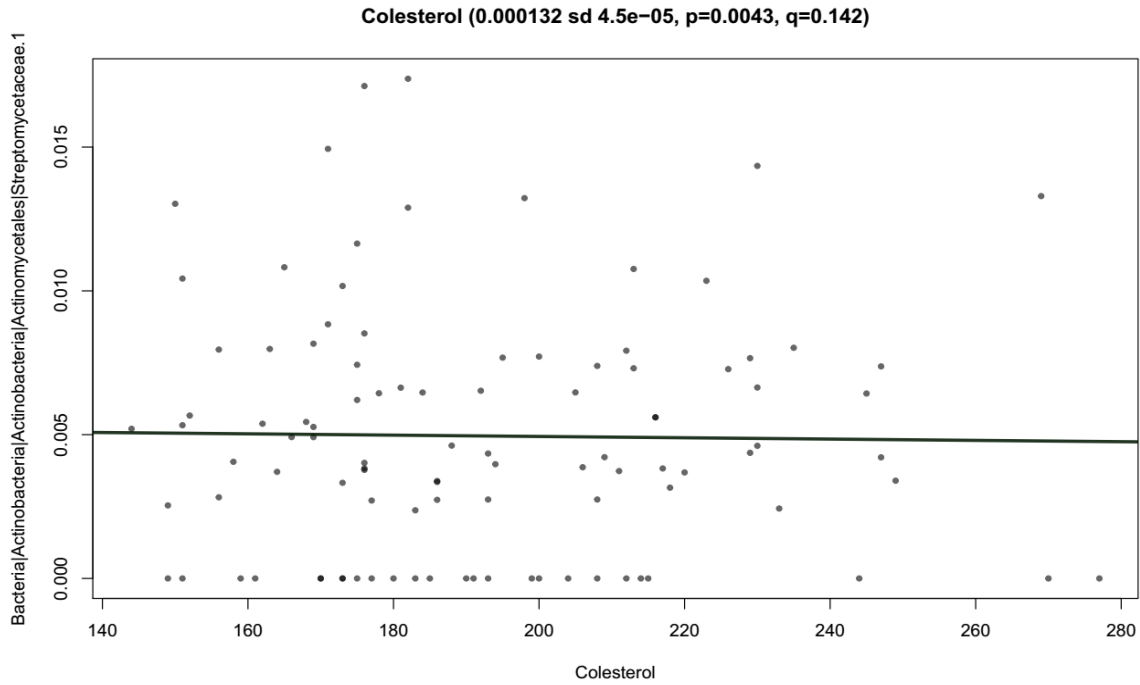


Figura 78. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra colesterol. Se realizó una comparación de los datos clínicos de colesterol (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación de la familia *Streptomycetaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

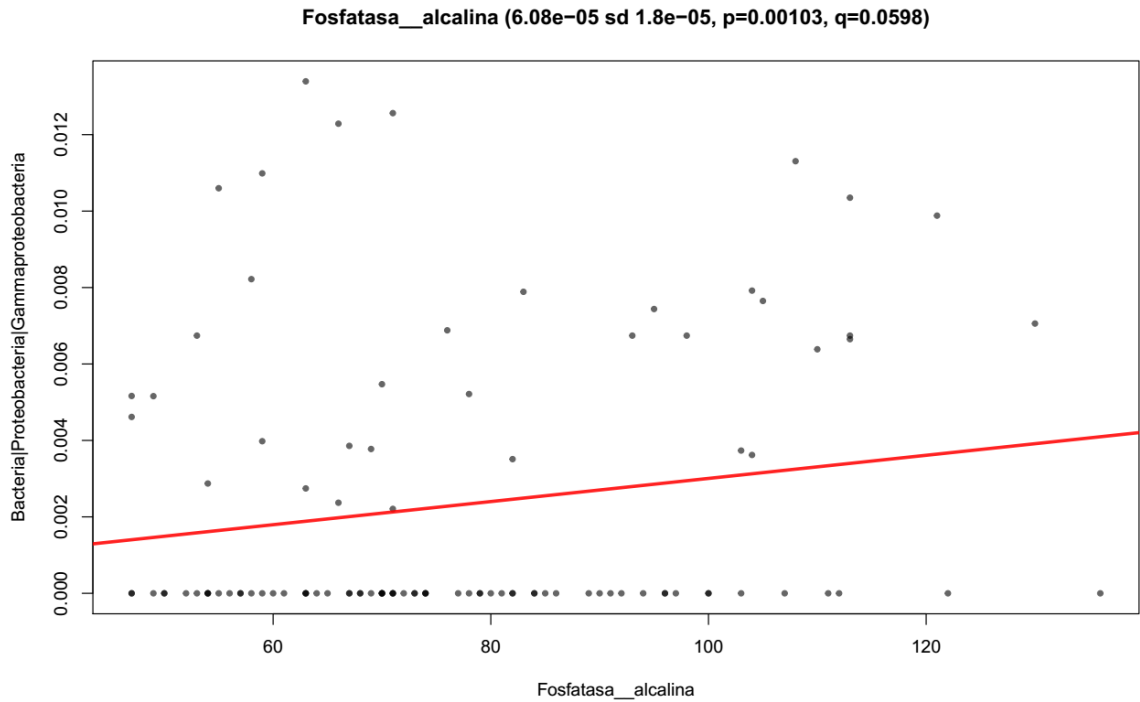


Figura 79. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el orden *Gammaproteobacteria*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

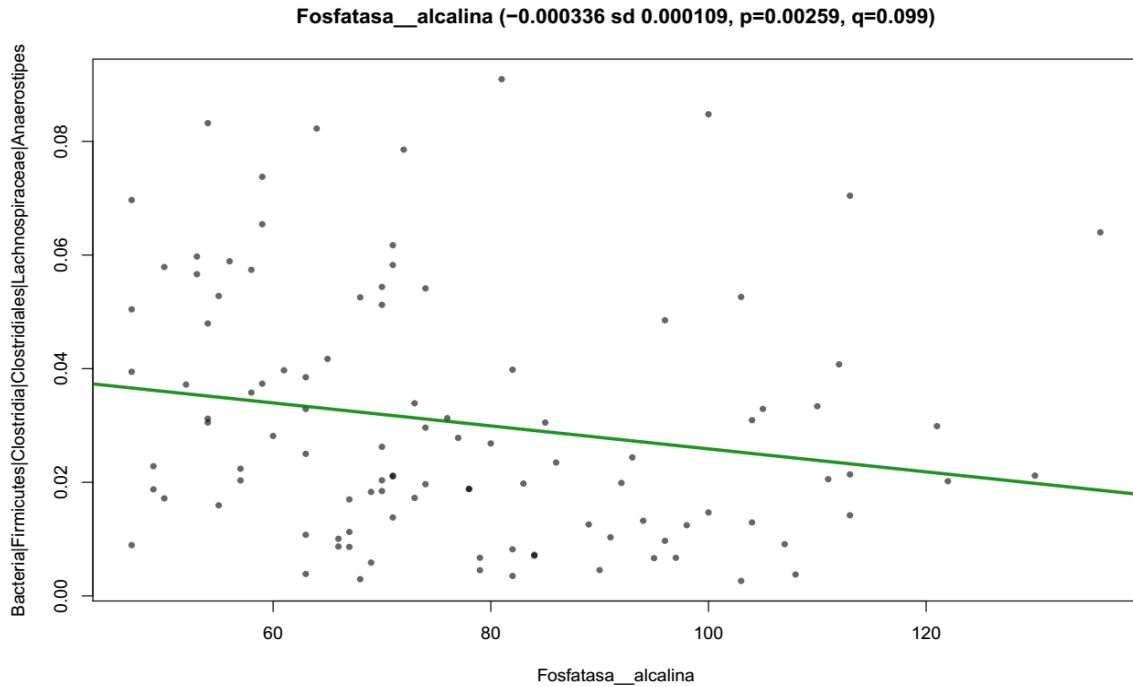


Figura 80. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Anaerostipes* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

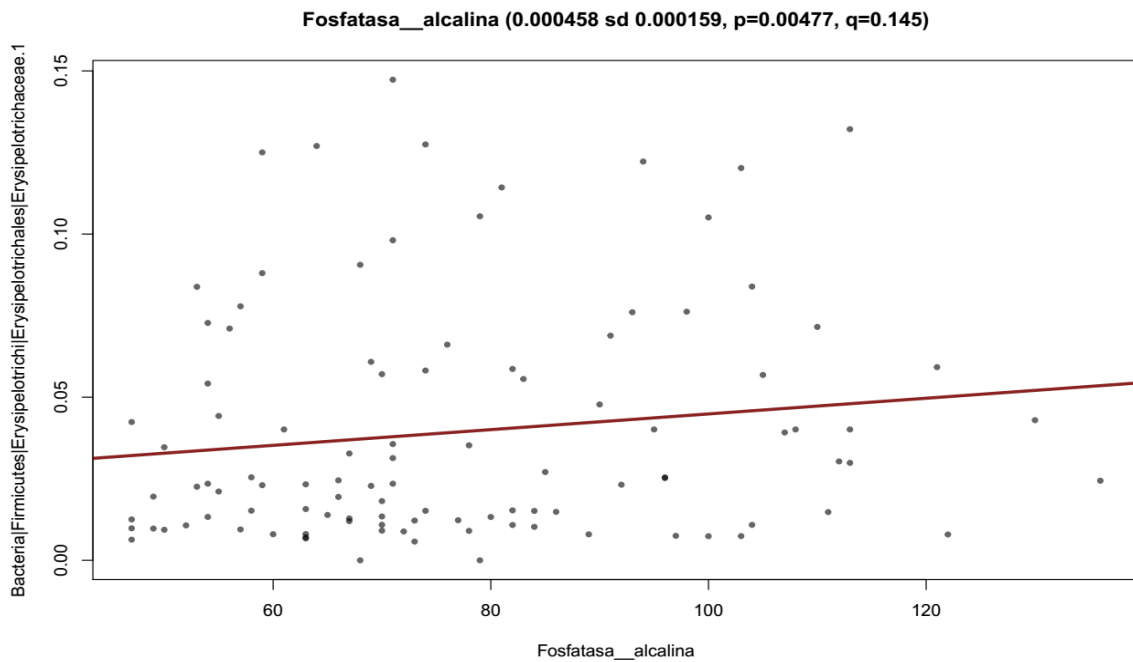


Figura 81. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Erysipelotrichaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

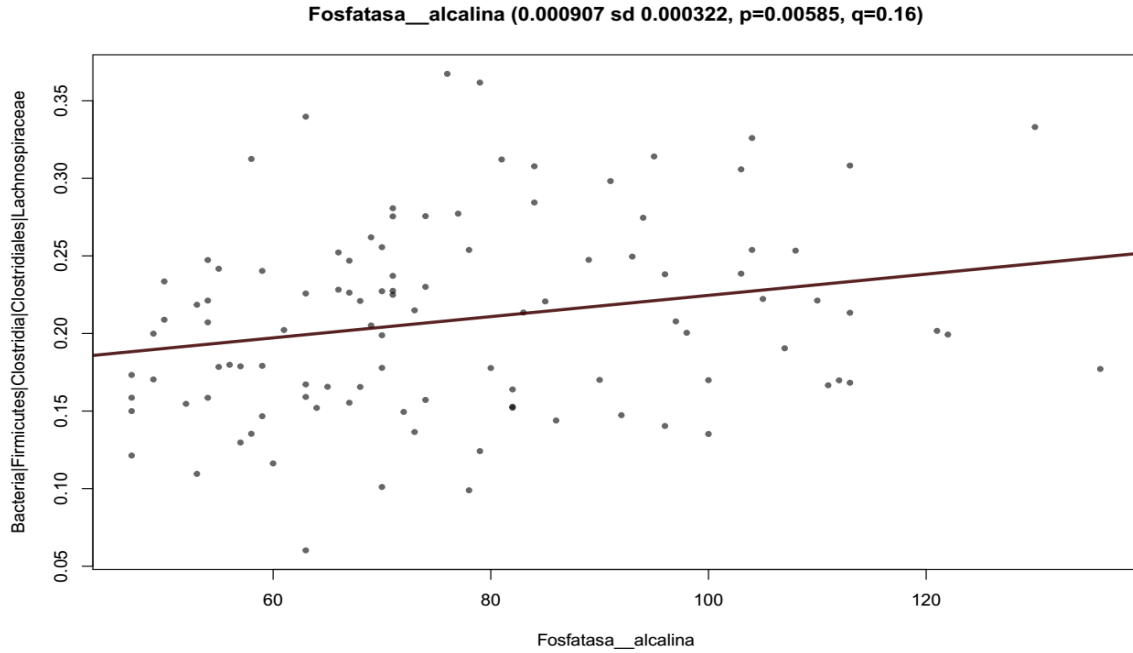


Figura 82. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Lachnospiraceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

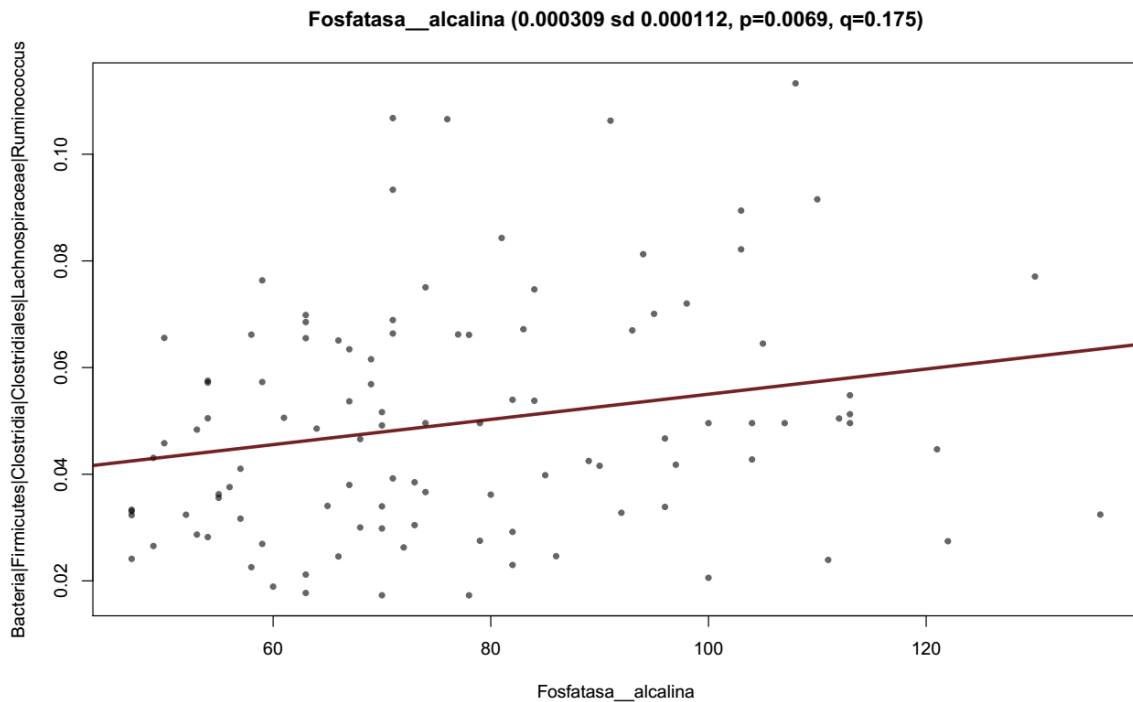


Figura 83. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Ruminococcus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

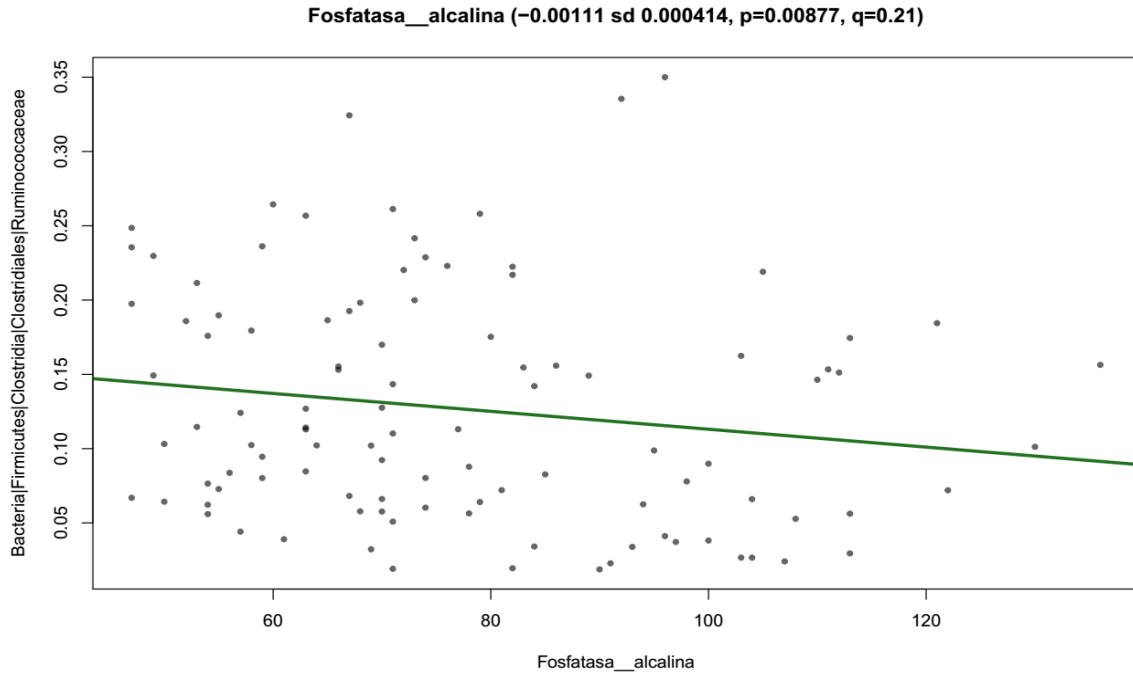


Figura 84. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Ruminococcaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

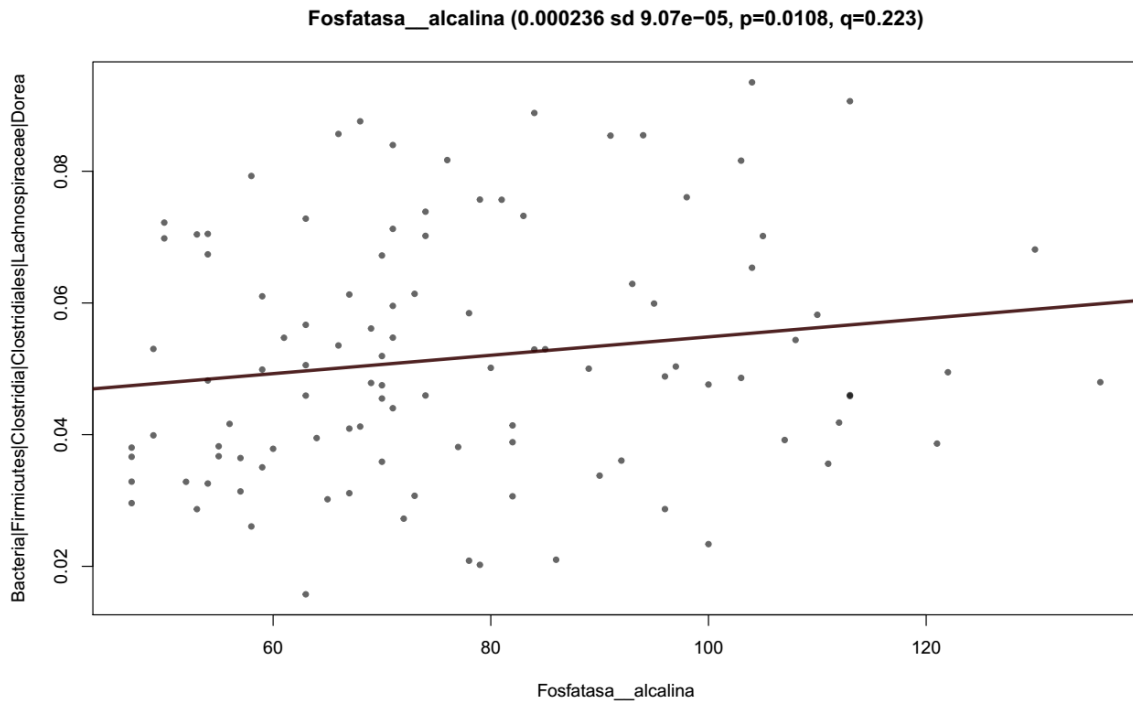


Figura 85. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Dorea* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

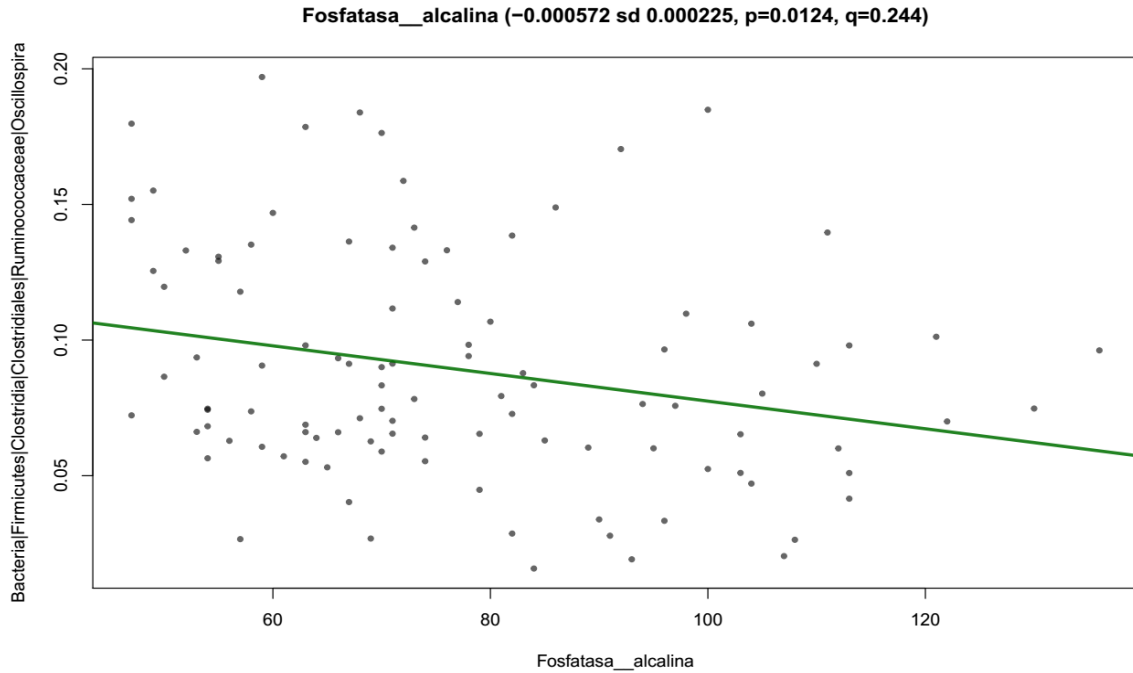


Figura 86. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra fosfatasa alcalina. Se realizó una comparación de los datos clínicos de fosfatasa alcalina. (U/L) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Oscillospira* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

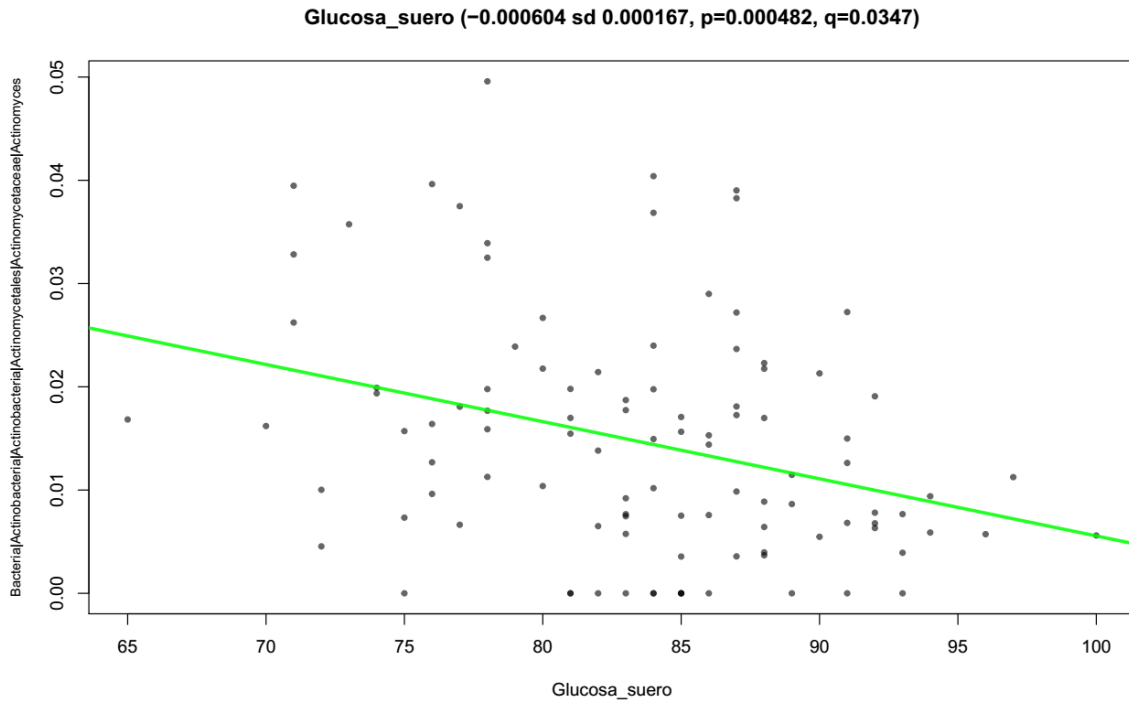


Figura 87. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Actinomyces* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

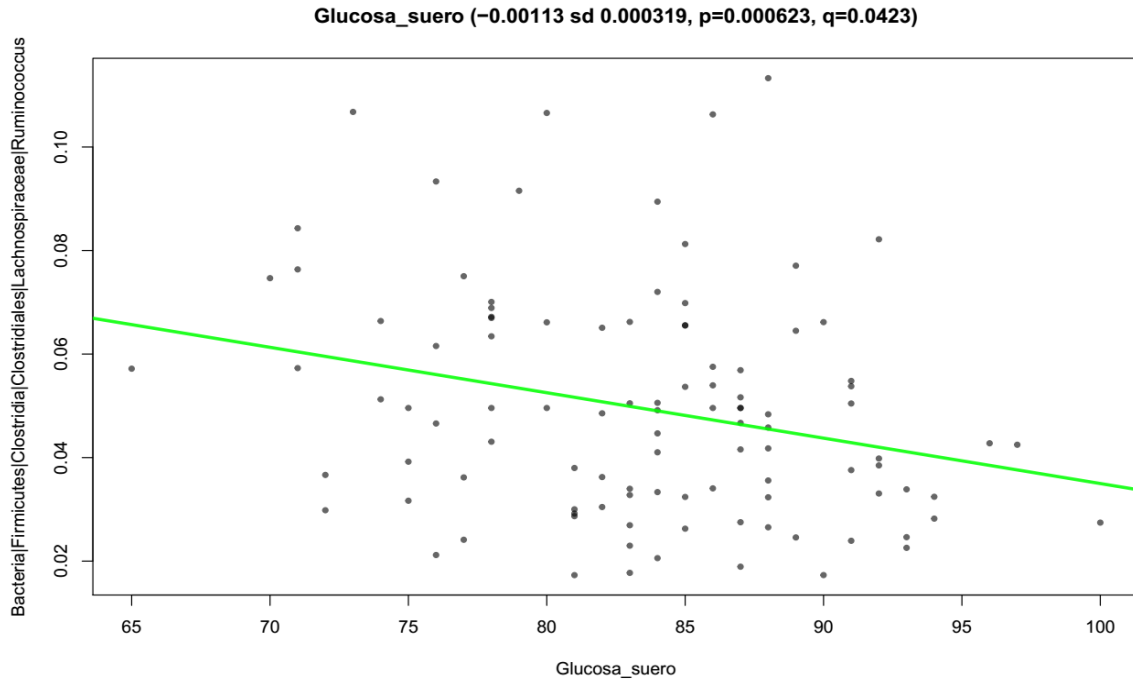


Figura 88. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Ruminococcus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

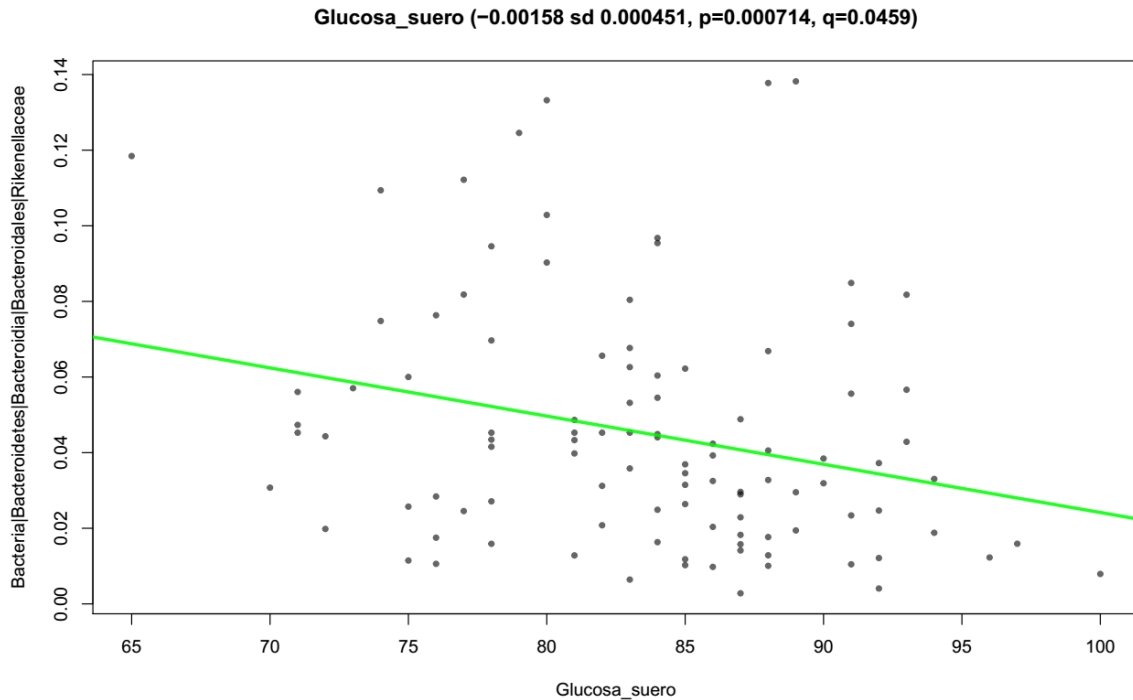


Figura 89. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Rickellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

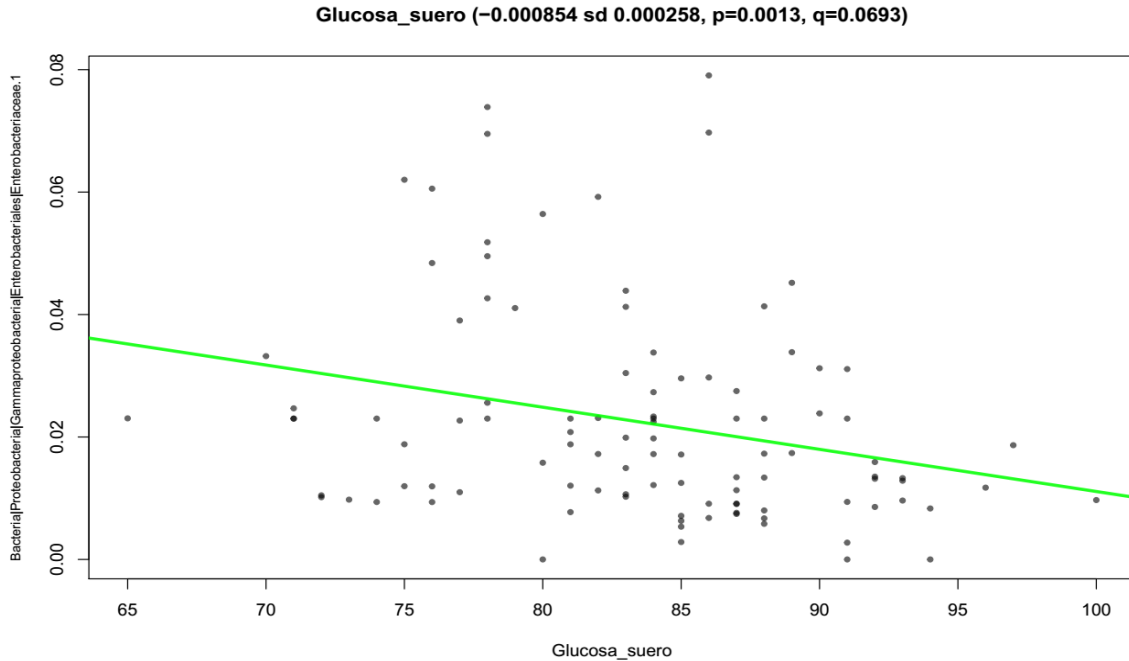


Figura 90. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Enterobacteriaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

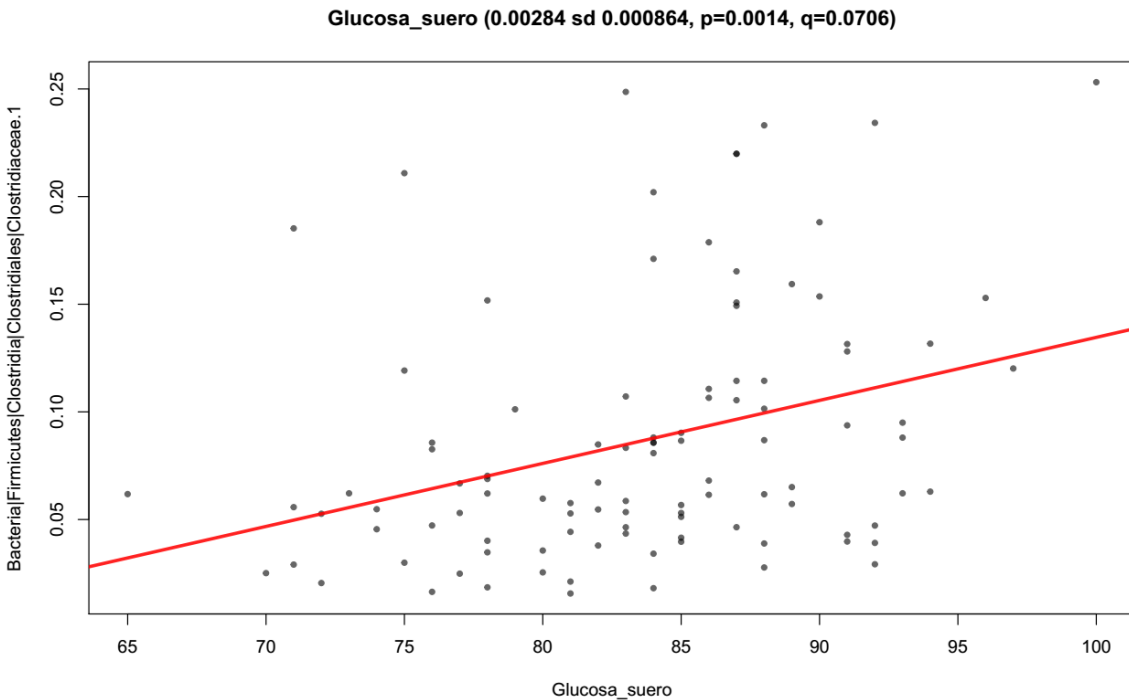


Figura 91. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Clostridiaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

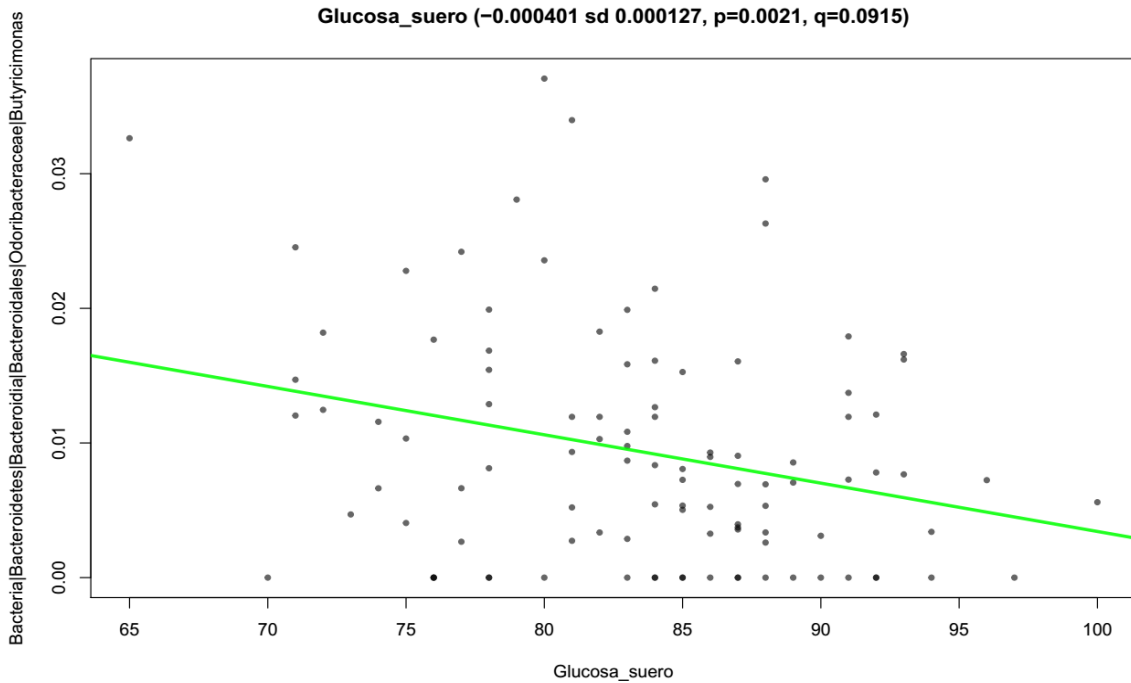


Figura 92. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Butyricimonas* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

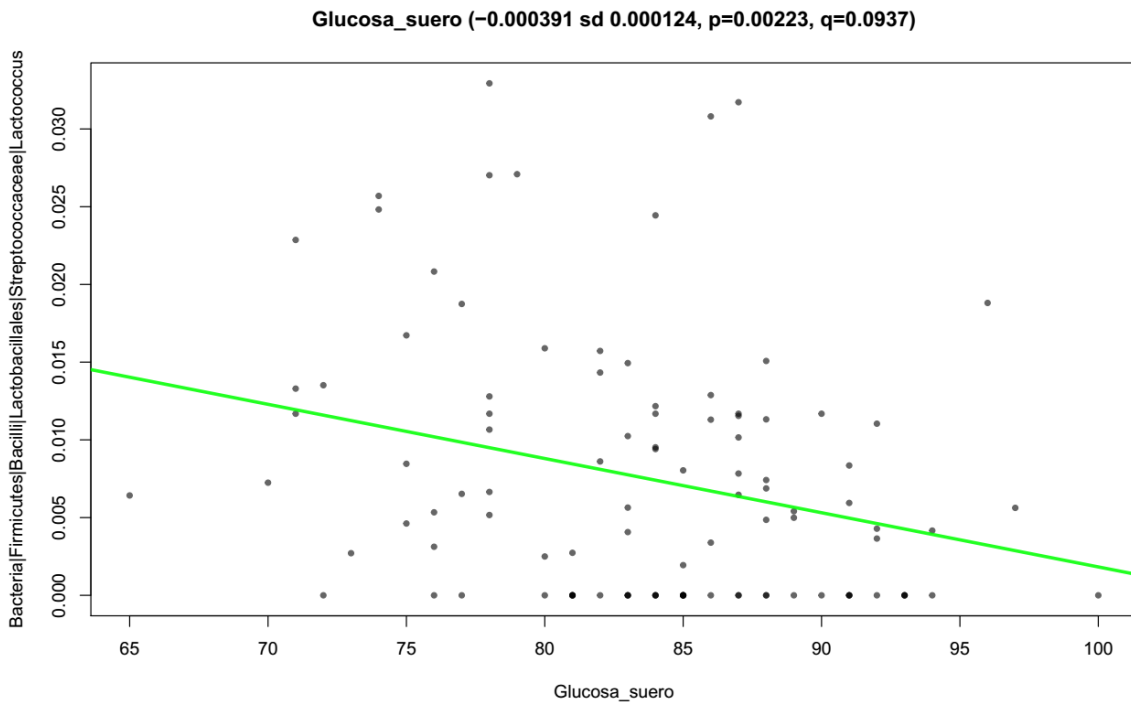


Figura 93. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Lactococcus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

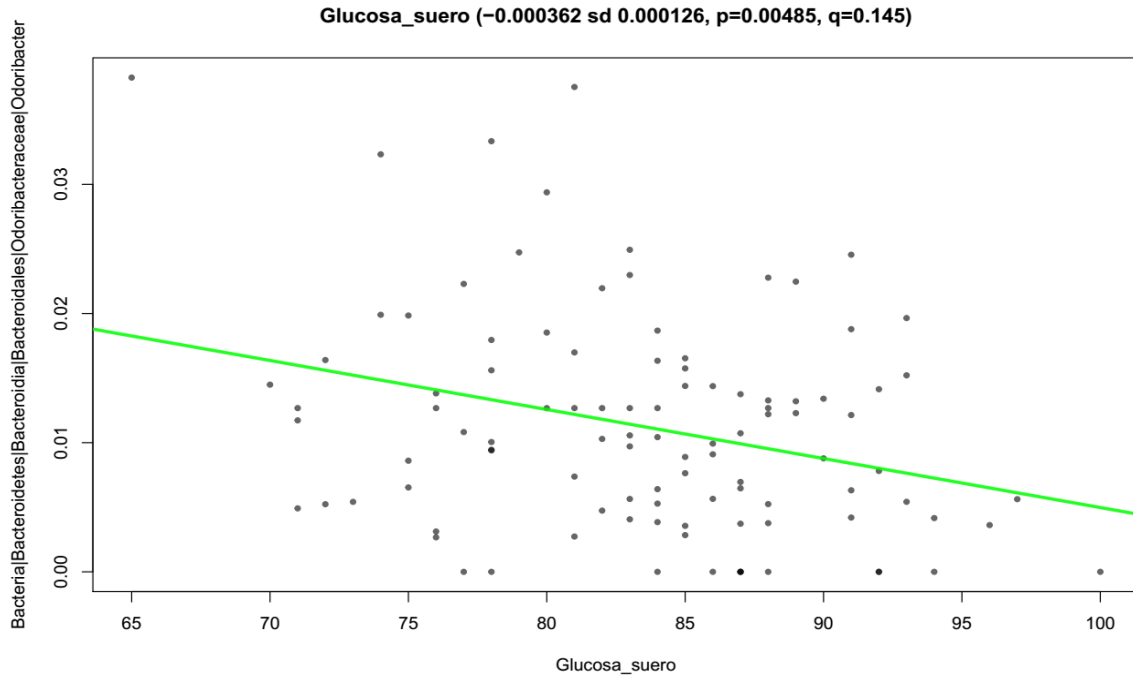


Figura 94. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Odoribacter* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

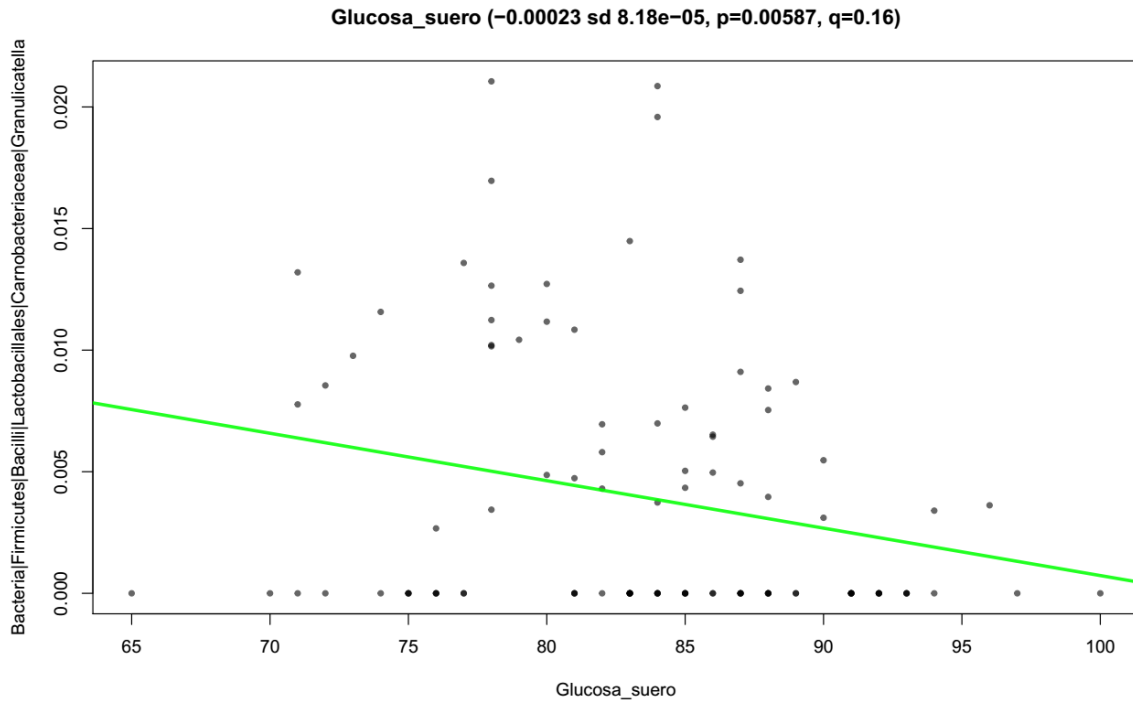


Figura 95. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Granulicatella* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

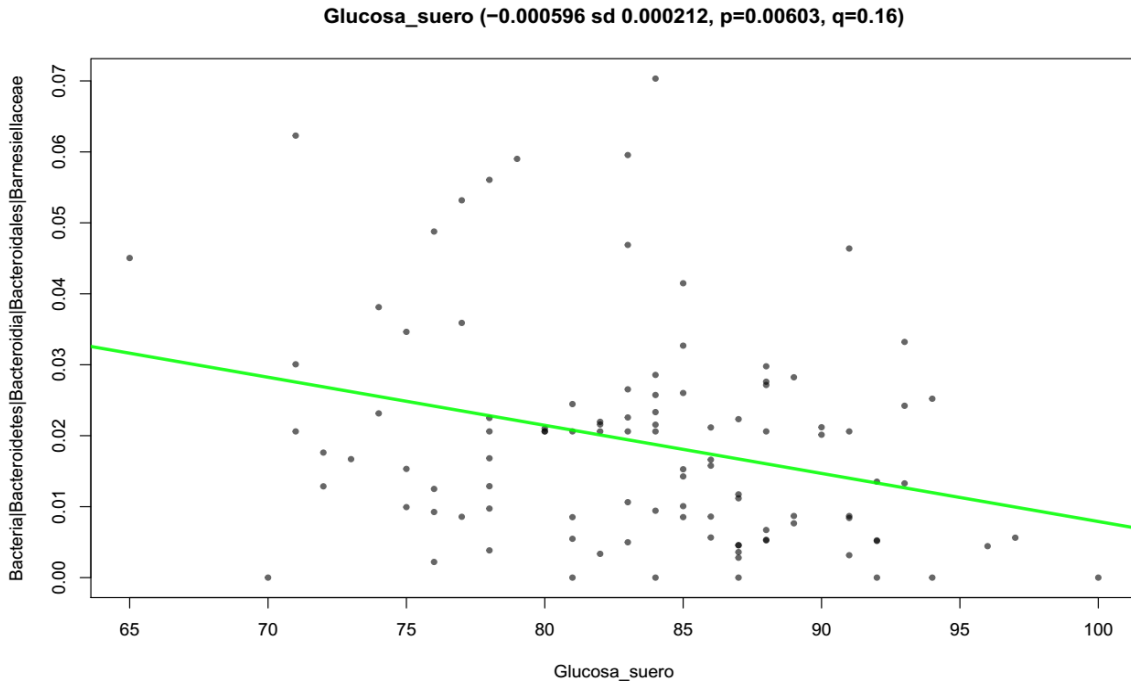


Figura 96. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Barnesiellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

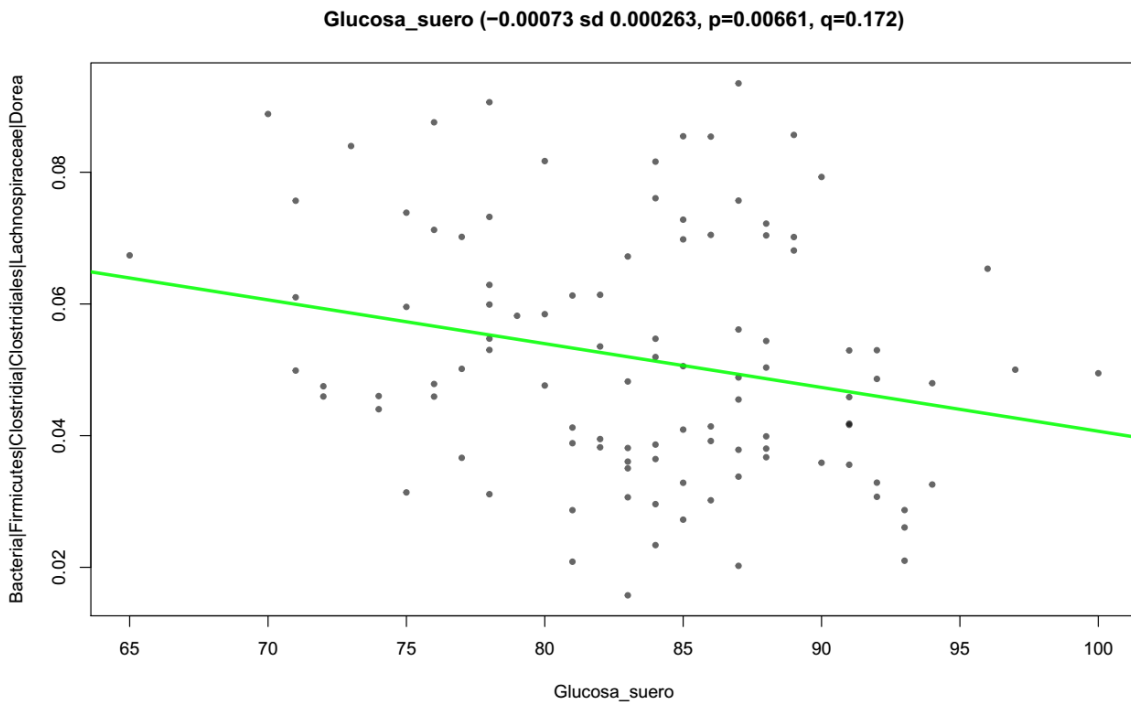


Figura 97. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Dorea* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

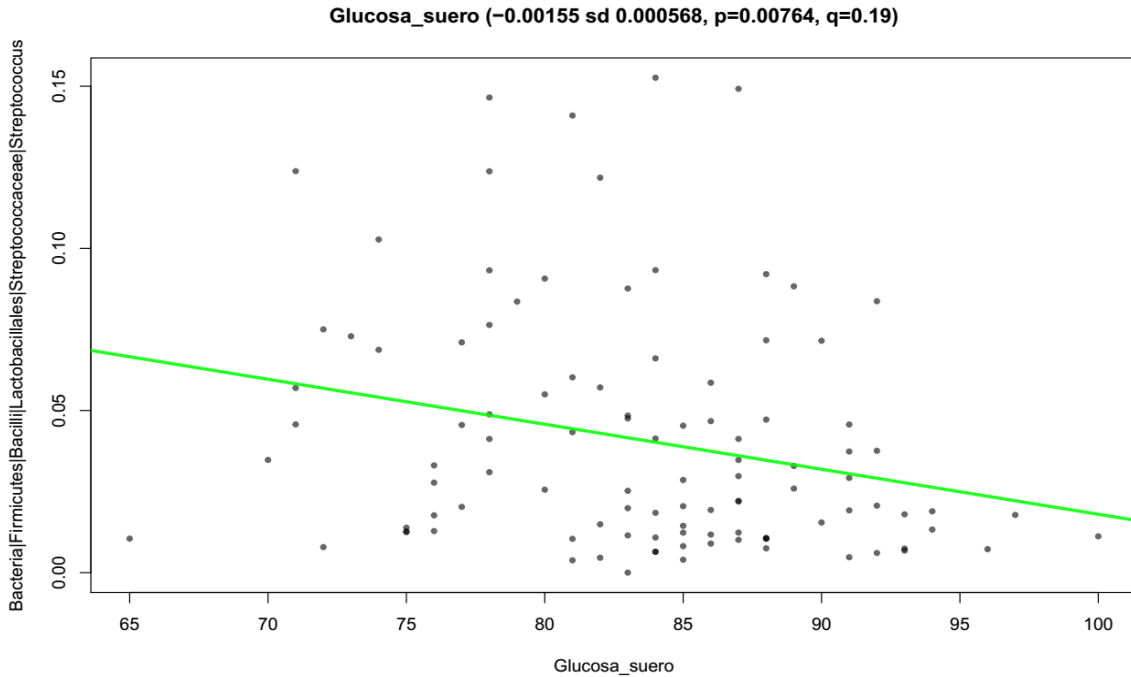


Figura 98. Análisis MaASLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Streptococcus* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

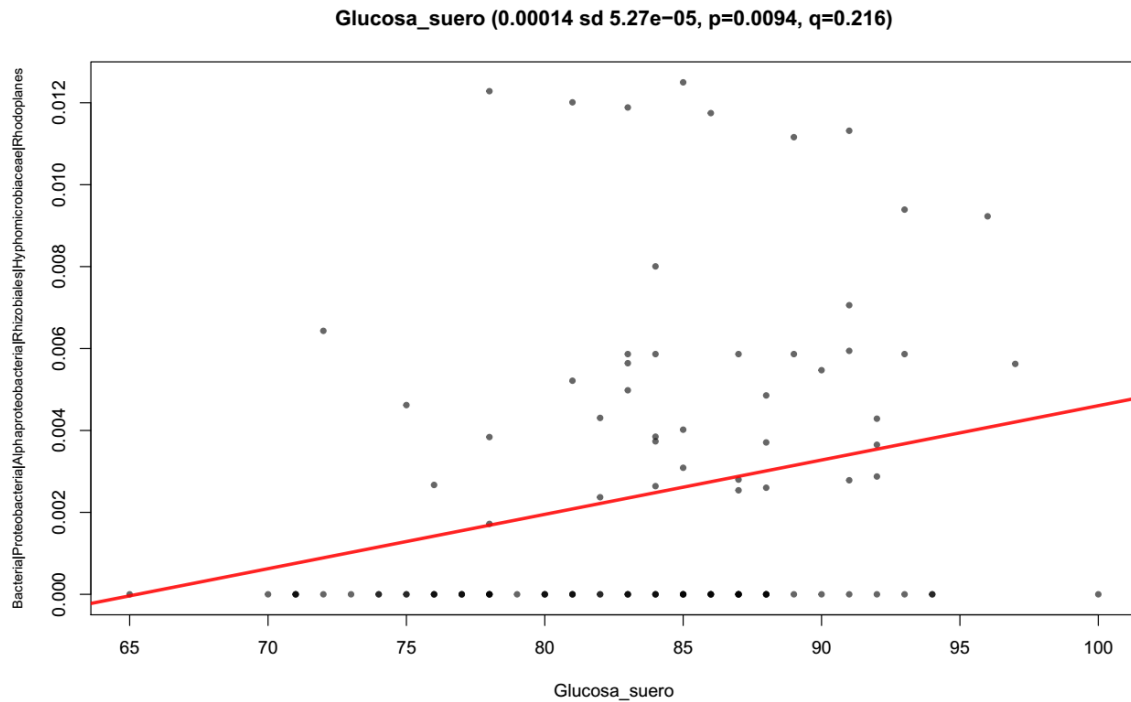


Figura 99. Análisis MaASLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Rhodoplanes* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

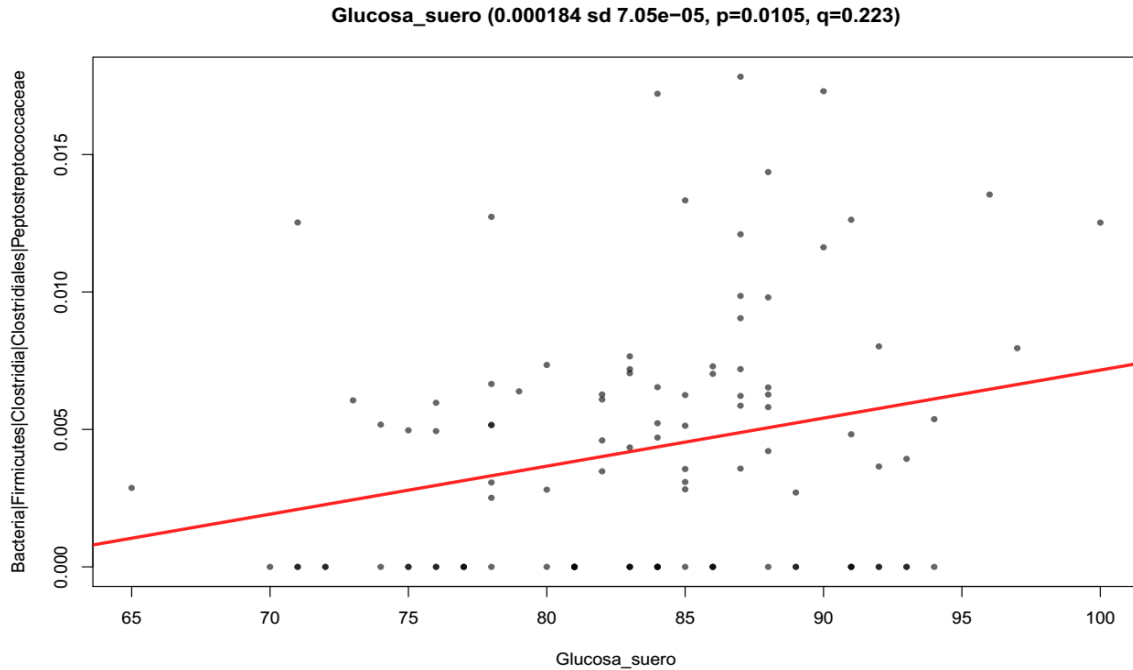


Figura 100. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Peptostreptococcaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

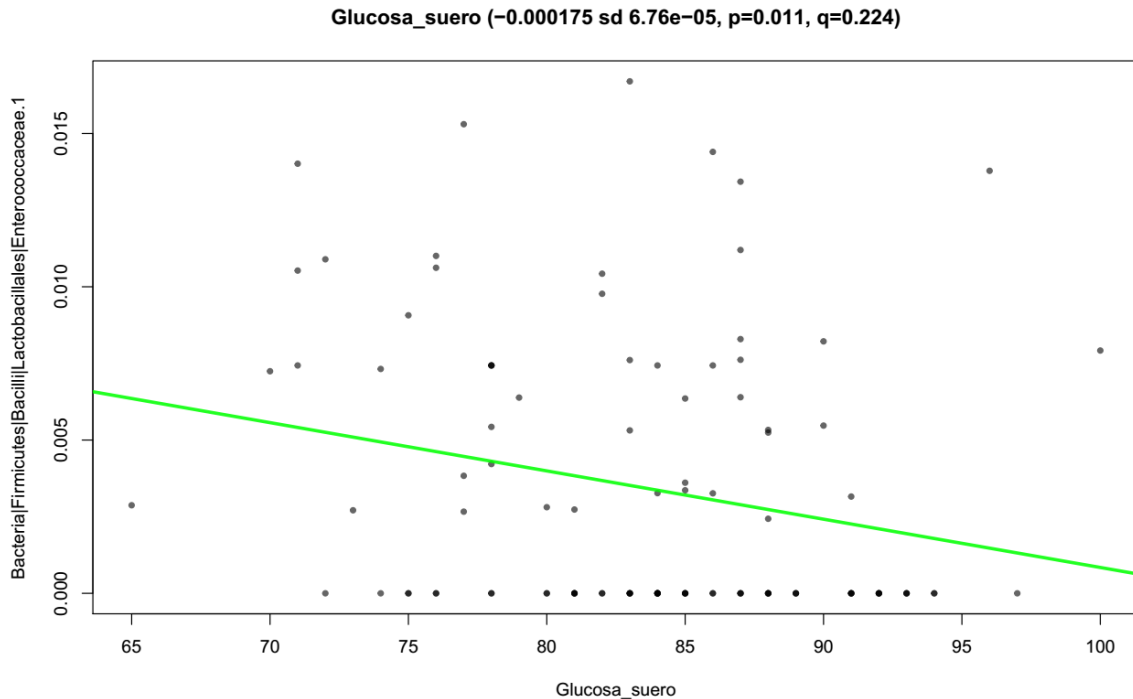


Figura 101. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra glucosa en suero. Se realizó una comparación de los datos clínicos de glucosa en suero. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Enterococcaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

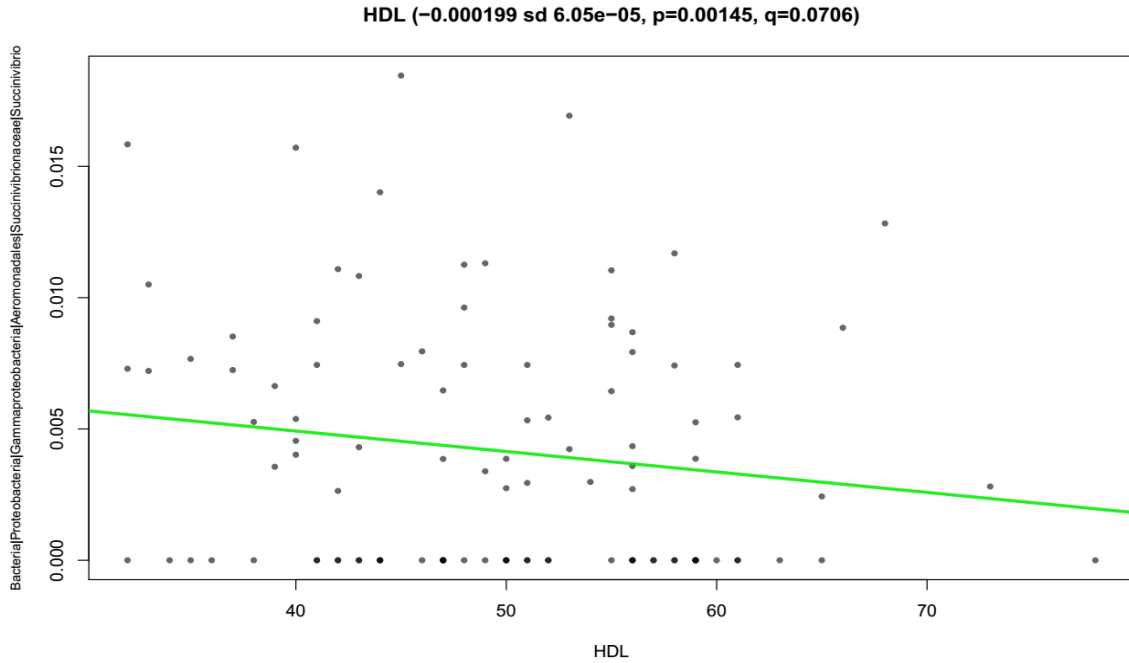


Figura 102. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra HDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de HDL. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Succinivibrio* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

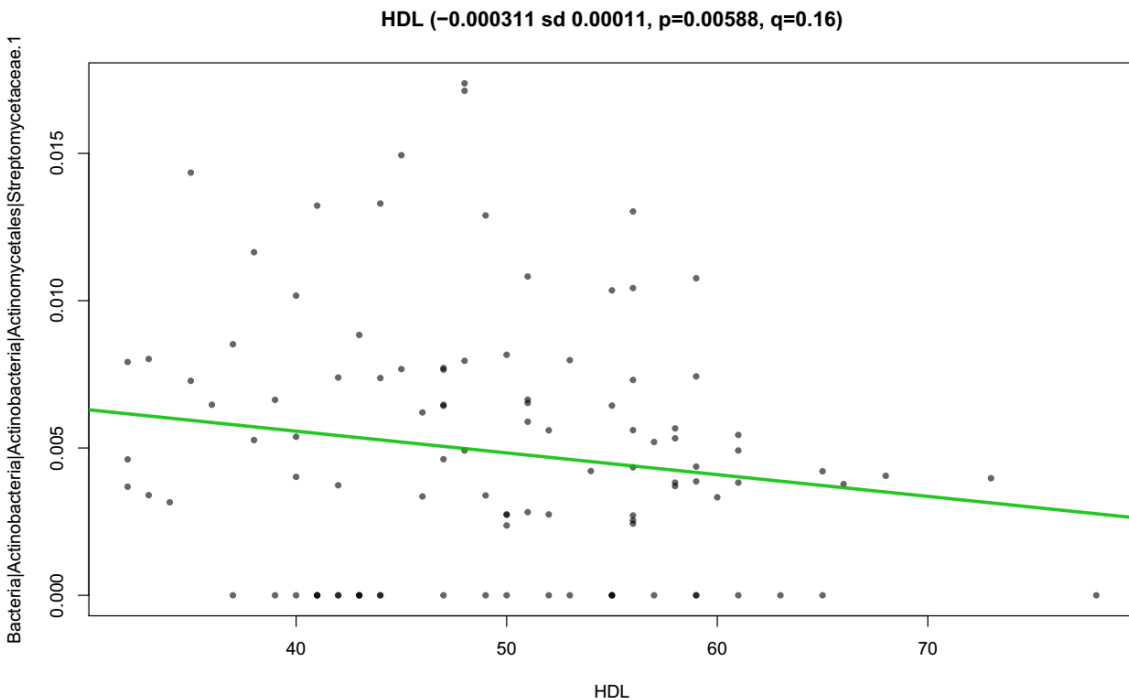


Figura 103. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra HDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de HDL. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Streptomycetaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

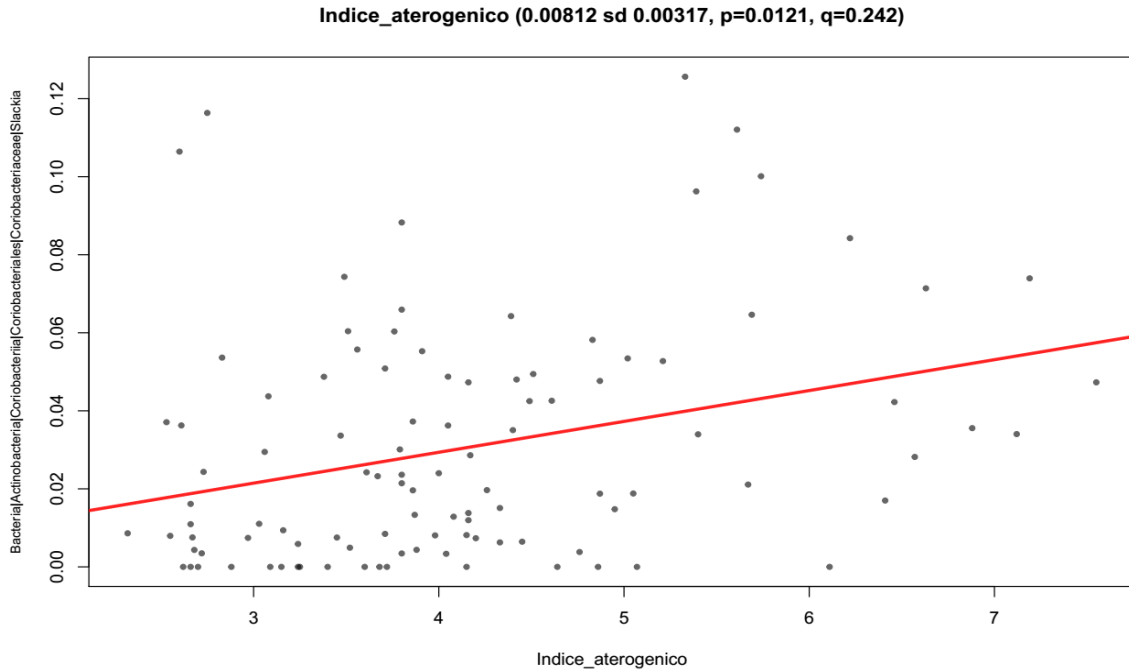


Figura 104. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra índice aterogénico. Se realizó una comparación de los datos clínicos de índice aterogénico contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Slackia* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

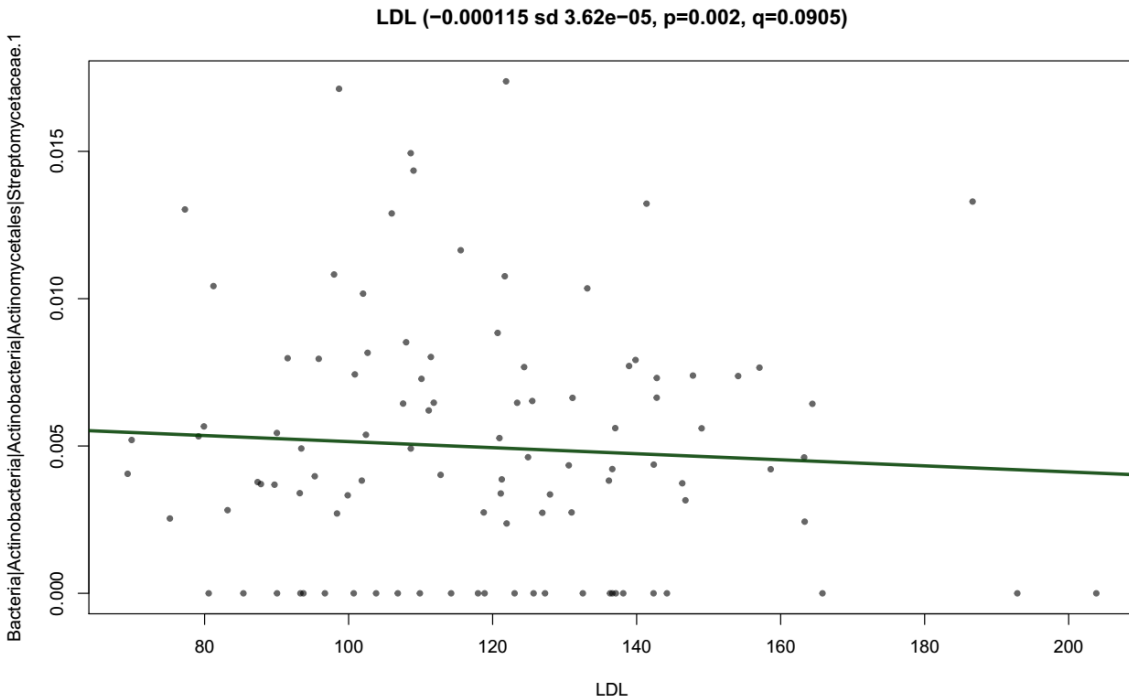


Figura 105. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de LDL. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Streptomycetaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

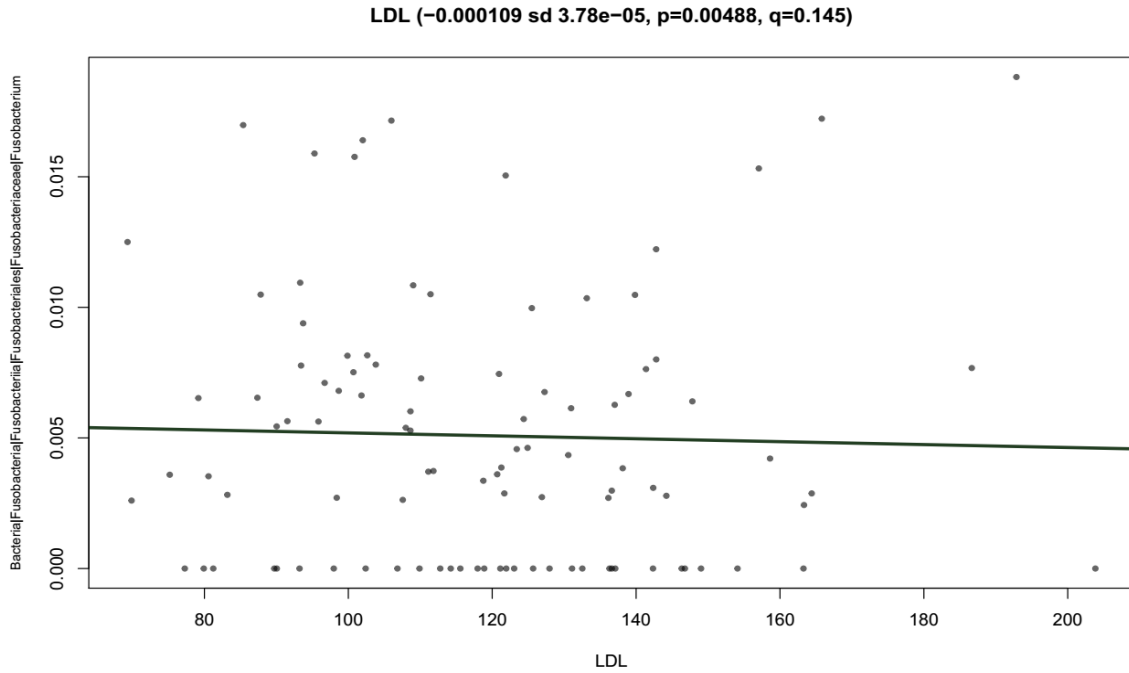


Figura 106. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de LDL. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Fusobacterium* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

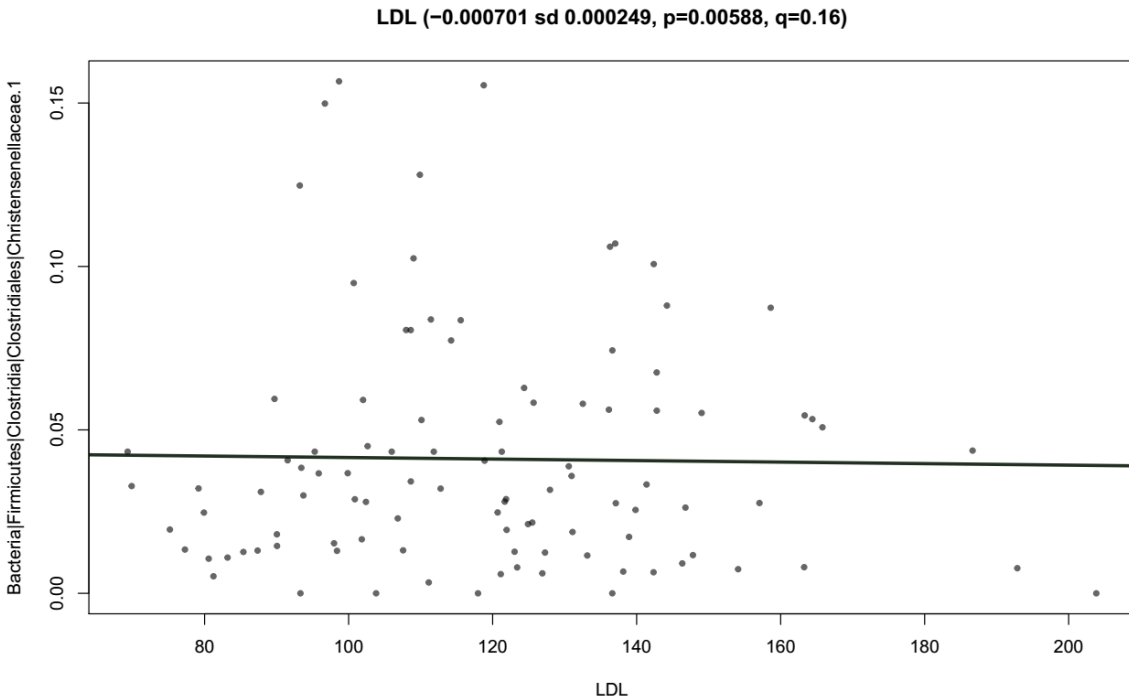


Figura 107. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de LDL. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con la familia *Christenellaceae*, sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

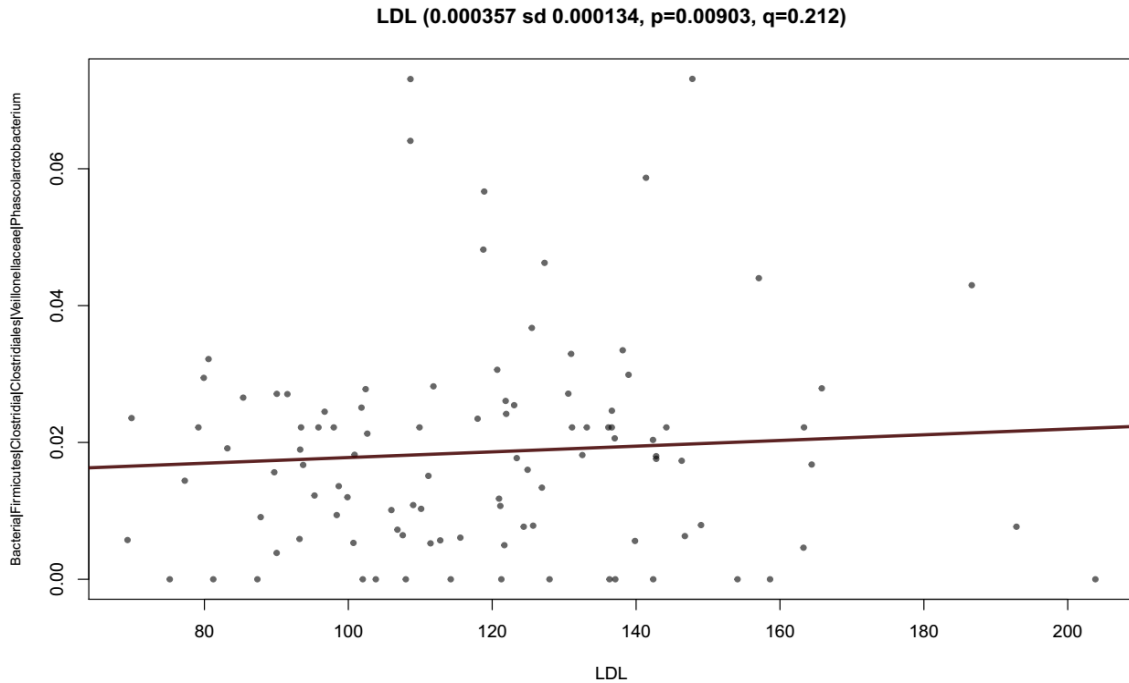


Figura 108. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de LDL. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Phascolarctobacterium* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

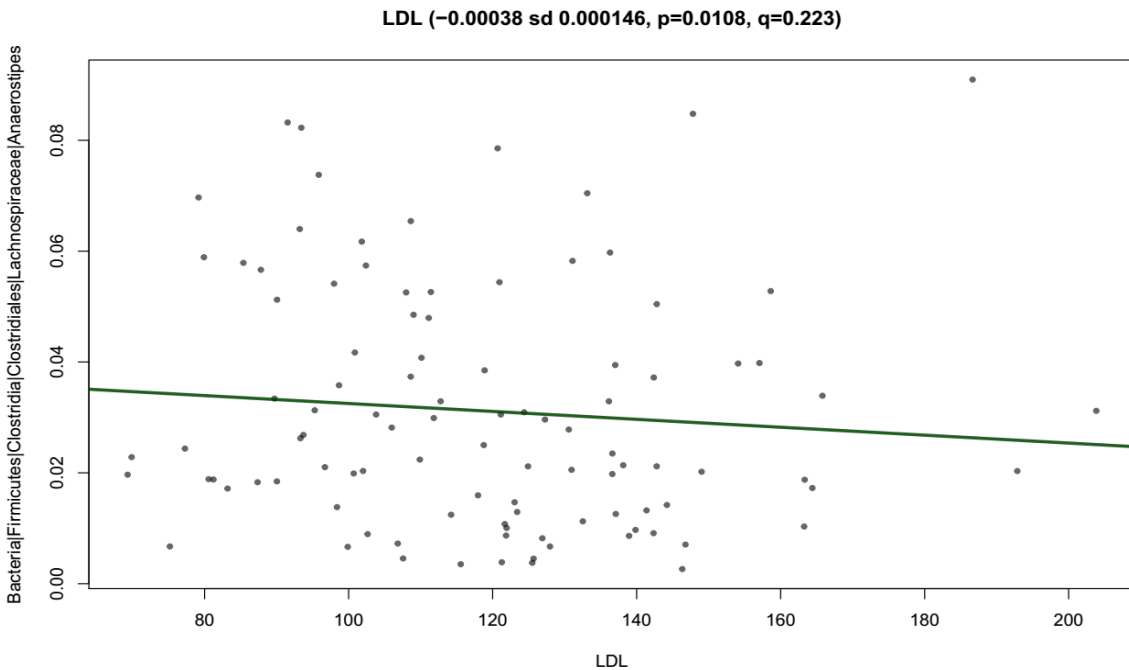


Figura 109. Análisis MaAsLin de los participantes abundancia relativa contra LDL. Se realizó una comparación de los datos clínicos de LDL. (mg/dL) contra abundancia relativa, observándose una asociación con el género *Anaerostipes* spp., sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo con los valores de p y q simultáneamente.

Anexo 4. Carta de consentimiento

PROYECTO INFLUENCIA DEL CONSUMO MODERADO DE CERVEZA SOBRE LA SALUD A TRAVÉS DE LA FUNCIONALIDAD DEL BIOMA MICROBIANO DEL TRACTO DIGESTIVO

Investigador Principal: DR. JAIME GARCÍA MENA, jgmena@cinvestav.mx

Le estamos invitando a participar en un estudio que es realizado por el Laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas, del Departamento de Genética y Biología Molecular (Lab 0) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco y financiado por el Consejo de Investigación sobre Salud y Cerveza de México, A. C. El objetivo es caracterizar el efecto que una ingesta moderada de cerveza tiene sobre su estado nutricional (normopeso, sobrepeso y obesidad) y determinar si existen diferencias significativas en la diversidad de los microorganismos que habitan su tracto digestivo. En este estudio no se le realizará ningún tratamiento médico ni nutricional. Si usted acepta participar le solicitaremos nos pueda proporcionar una muestra de sangre y material fecal, para esta última se le proporcionará un kit de recolección. Este estudio nos permitirá conocer el efecto que tiene el consumo moderado de cerveza y su relación con el desarrollo de una microbiota bacteriana saludable en el tracto digestivo. La participación es absolutamente voluntaria.

PROCEDIMIENTOS DEL PROTOCOLO DE ESTUDIO

Si usted acepta participar se le hará un examen médico general, recolección de copro y toma de muestra sanguínea de dos tubos de 5 ml en la vena antecubital el día 0. Las muestras de sangre y copro serán tomadas y colectadas en el Lab 0 del Cinvestav por un laboratorio clínico profesional particular. Las muestras de sangre serán procesadas y analizadas en el laboratorio clínico profesional particular y las muestras de copro serán analizadas en el Lab 0 del Cinvestav. Dependiendo de los resultados se le aceptará en el estudio. Una vez aceptado para participar y dependiendo del grupo de estudio en que participe, se le proporcionará una “bebida” que será una cerveza regular (355 mL), o una cerveza sin alcohol (355 mL) o una botella de agua (300 mL) (grupo control) para consumo exclusivo en la comida durante 30 días (“bebida”) día 1. Posteriormente se le tomarán muestras de copro y sangre los días 15, 30. En las muestras sanguíneas se determinará el perfil hepático, química sanguínea, perfil de lípidos, biometría hemática, proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular y estrés oxidante mitocondrial en el laboratorio clínico particular. En las muestras de copro se caracterizará la diversidad bacteriana y se medirá la concentración de ácidos grasos de cadena corta en las muestras de copro en el Lab 0 del Cinvestav. Todo el proceso de toma de muestra será supervisado por la Dra. María Luisa Pizano Zárate, quien es médico investigador del INPer y participante de todo el proyecto.

COMPROMISOS DEL PARTICIPANTE

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

1. Brindar las muestras requeridas en las fechas proporcionadas al inicio del estudio.
2. Acudir al Lab 0 del Cinvestav para valorar datos clínicos, antropométricos, antecedentes de consumo de antibióticos, vitaminas, antecedentes personales patológicos y consumo de alcohol. Brindar datos verdaderos acerca de su edad, talla, peso, si tiene algún padecimiento en el que esté siendo tratado o si tiene algún problema en relación con el consumo de alcohol.
4. Durante los treinta días del estudio tomar exclusivamente la “bebida” proporcionada en la comida y no consumir alguna bebida alcohólica durante estos. En caso de formar parte del

grupo control, no consumir cerveza ni alguna otra bebida alcohólica durante los treinta días del estudio para no alterar los resultados. Permitir que sus muestras sean procesadas en el laboratorio clínico particular y en el Lab 0 del Cinvestav. Si su muestra no se encuentra en condiciones necesarias para realizar las pruebas para este estudio, si sus datos no son proporcionados completamente, si no completa sus tres visitas al estudio o si usted retira su consentimiento, se finalizará su participación en el mismo.

RIESGOS Y MALESTAR ESPERADOS

El participar en este estudio NO TIENE NINGÚN RIESGO NO GENERA NINGÚN RIESGO, el material que se utiliza es estéril y se realiza con técnica antiséptica, puede haber temporalmente dolor característico de una punción venosa. Su participación no interferirá en su estilo de vida ni costumbres.

BENEFICIOS

Entre los beneficios de participar en este proyecto, estará conocer su estado de salud a través del examen médico y estudios bioquímicos. Los resultados del presente estudio contribuirán a estudiar si la cerveza puede alterar la microbiota intestinal pudiendo favorecer el crecimiento del filum de Bacteroidetes en comparación con los Firmicutes. El beneficio personal que obtendrá será el conocer la diversidad de los microorganismos que habitan su colon, así como sus parámetros bioquímicos, estrés oxidante mitocondrial 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 sus muestras, entendemos esto como una contribución voluntaria a la investigación. Las muestras se utilizarán exclusivamente para los fines de investigación. Asimismo, los estudios que se le realicen serán completamente gratuitos.

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 participar en el estudio su participación es voluntaria y no se ejerce coerción en ella. En caso de que después de haber aceptado participar usted cambie de opinión, su 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 sí 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 participar en el estudio.

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 PARTICIPANTE

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: INFLUENCIA DEL CONSUMO MODERADO DE CERVEZA SOBRE LA SALUD A TRAVÉS DE LA FUNCIONALIDAD DEL BIOMA

MICROBIANO DEL TRACTO DIGESTIVO. El propósito de esta investigación es conocer el efecto que el consumo moderado de cerveza tiene sobre la funcionalidad de la microbiota bacteriana del tracto digestivo. Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Autorizar el uso de una muestra de sangre de 10 mL y de copro, para medir metabolitos y obtener DNA, que habrá de congelarse. Declaro que se me han informado los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio y que son los siguientes: La molestia de una punción venosa y el donar una muestra de copro. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento; así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán al cabo, los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento además de informarme los resultados de la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que con ello afecte la atención médica que recibo del instituto. El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esto pudiera hacerme cambiar de opinión respecto de mi permanencia en el estudio. Al firmar este documento, doy permiso para usar mis muestras para los fines que el documento describe. Al firmar este documento no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

- Declaro que no padezco algún trastorno crónico que pueda ser agravado por el consumo de alcohol.**
- Declaro que no tengo problemas con mi manera de beber alcohol y/o no soy alcohólico.**
- Declaro no tener diagnóstico de algún trastorno neurológico o psiquiátrico ni consumir medicamentos controlados de manera regular.**
- Declaro que no haré responsable al investigador, al proyecto, al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, o al Consejo de Investigación sobre Salud y Cerveza de México, A.C., por algún accidente o problema en mi salud durante y después de mi participación en este proyecto.**

Nombre completo del participante:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Nombre completo del Testigo 1:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Nombre completo del Testigo 2:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Nombre completo del investigador:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Anexo 5. Carta de aviso de privacidad



AVISO DE PRIVACIDAD Y CONSENTIMIENTO EXPRESO POR PARTE DE LAS PERSONAS FÍSICAS QUE PROPORCIONAN SUS DATOS PERSONALES AL DR. JAIME GARCÍA MENA (EN ADELANTE "DR. GARCÍA MENA").

Para efectos del presente aviso de privacidad y sin perjuicio de lo que establezca la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares se entiende por:

- **"Dr. García Mena"**: Se refiere al Dr. Jaime García Mena.
- **"La Ley"**: Se refiere a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares.
- **"Datos Personales"**: Aquellos datos "referentes a la persona" o "sobre de la persona", incluyendo, mas no limitando, nombre, dirección, teléfonos, edad, fecha de nacimiento, correo electrónico, antecedentes médicos, expediente clínico, entre otros.
- **"Datos personales sensibles"**: Datos de carácter personal identificados así por "La Ley", que requieran un tratamiento especial, incluyendo en algunas circunstancias, la necesidad de obtener el consentimiento explícito. Estas categorías incluyen, de manera enunciativa más no limitativa, datos de carácter personal sobre origen racial o étnico, opiniones políticas, creencias religiosas u otras creencias similares, pertenencia a sindicatos, salud física o mental, vida sexual o antecedentes penales, entre otros.
- **"Derechos ARCO"**: Derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición a sus datos personales, de conformidad con lo establecido por "La Ley".

POR FAVOR LEA CUIDADOSAMENTE Y ACEPTÉ LOS TÉRMINOS SIGUIENTES ANTES DE COMPARTIR CUALQUIER DATO PERSONAL O INFORMACIÓN DE SU PERSONA.

1.- CONOCIMIENTO, FINALIDAD Y USO DE DATOS PERSONALES:

Por medio del presente, doy mi consentimiento expreso para que los datos de carácter personal referentes a mi persona sean procesados por el "Dr. García Mena", con la finalidad de realizar el estudio de investigación denominado "*Influencia del consumo moderado de cerveza sobre la salud a través de la funcionalidad del bioma microbiano del tracto digestivo*" (en adelante "La Investigación").

Así mismo, confirmo que los datos personales que proporciono y aquellos que llegue a proporcionar al "Dr. García Mena" son correctos y en este acto otorgo al "Dr. García Mena" mi consentimiento para que:

- Almacene por el tiempo que estime conveniente y que utilice dicha información personal con el fin de llevar a cabo "La Investigación";
- Cree bases de datos;
- Procese mis datos personales en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco y el personal asignados en "La Investigación";
- El procesamiento de datos personales sensible sobre mí, para los fines necesarios de "La Investigación";
- Enviarme información y comunicados a mis cuentas y números personales y laborales; y
- Enviarme notificaciones de cambios del presente aviso de privacidad;

Dr. Jaime García Mena
Última actualización, Junio de 2016



2.- DATOS PERSONALES RECABADOS:

Para las finalidades señaladas en el presente aviso de privacidad, otorgo al "Dr. García Mena", de manera enunciativa más no limitativa, los siguientes datos:

Nombre completo, Domicilio Particular, Domicilio Comercial, Teléfono Casa, Otro Teléfono de contacto, E-mail personal, Fecha de nacimiento, Lugar de Nacimiento, Nacionalidad, Género, Estado Civil, Escolaridad, Información del centro de Estudios, Contacto de emergencia, historial médico, entre otros.

No obstante lo anterior, estoy consciente y acepto que el "Dr. García Mena" podrá recabar datos personales adicionales a los anteriormente enumerados, a través de: (i) entrevistas o personales; (ii) vía telefónica; (iii) correo electrónico; (iv) mediante el personal que designe para los efectos; o a través de otras fuentes que están permitidas por "La Ley".

3.- TRANSFERENCIA DE DATOS PERSONALES:

Estoy consciente y acepto que el "Dr. García Mena" podrá divulgar mis datos personales a sus empleados, colaboradores, médicos asignados a "La Investigación", empleados o colaboradores del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, empleados, para los propósitos de "La Investigación", y además cuando así lo requiera la Ley que divulgue dichos datos personales a las autoridades pertinentes en los Estados Unidos Mexicanos o cualquier otra jurisdicción, quedando prohibido que el "Dr. García Mena" divulgue esta información a terceros para cualquier propósito que se aparte de lo anteriormente descrito, salvo lo previsto en la Ley.

4.- NOMBRE Y DOMICILIO DEL RESPONSABLE DE LOS DATOS PERSONALES:

Para cualquier información sobre este aviso de privacidad, o para el ejercicio de sus "Derechos ARCO", por favor de contactar a los siguientes números y direcciones:

Domicilio: Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México 07360.

Correo electrónico: jgmena@cinvestav.mx

Teléfono: 01 55 5747 3800 ext. 5327

5.- CAMBIOS AL PRESENTE AVISO DE PRIVACIDAD:

El "Dr. García Mena" se reserva el derecho de efectuar en cualquier momento, cambios, modificaciones o actualizaciones al presente aviso de privacidad, para la atención de novedades legislativas o jurisprudenciales, nuevos requerimientos para la debida ejecución de "La Investigación".

Estas modificaciones estarán disponibles al público en la dirección señalada anteriormente en el presente documento.

6.-DERECHO DE REVOCACIÓN, RECTIFICACIÓN, OPOSICIÓN DEL USO DE DATOS PERSONALES:

Para el ejercicio de los "Derechos Arco" de conformidad con lo establecido por "La Ley", es necesario que presente una petición escrita vía electrónico al correo electrónico a jgmena@cinvestav.mx

Dicho correo deberá de contener el nombre del solicitante, su correo electrónico, especificar si desea revocar, rectificar,

Dr. Jaime García Mena
Última actualización, Junio de 2016



cancelar, limitar u oponerse al uso o divulgación de sus datos personales y dos datos personales a los que se refiere la petición (ejemplo, Teléfono, dirección o correo electrónico).

El "Dr. García Mena" contará con un plazo máximo de 120 (ciento veinte) días hábiles para atender dicha petición y se informará sobre la procedencia de la misma al correo electrónico que para estos fines usted nos proporcione. El "Dr. García Mena" no se hará responsable si dicho correo se encuentra saturado, incorrecto o suspendido para recibir la notificación a la que se refiere el presente párrafo.

7.- DATOS PERSONALES SENSIBLES:

Le informamos que para cumplir con las finalidades previstas en este aviso, pudieran ser recabados y tratados datos personales sensibles, como por ejemplo:

Origen racial o étnico, estado de salud presente y futuro, información genética, creencias religiosas, filosóficas y morales, afiliación sindical, opiniones políticas, preferencia sexual y datos de historial médico por lo que el "Dr. García Mena" hará su mejor esfuerzo para que los mismos sean tratados bajo medidas de seguridad, siempre garantizando su confidencialidad.

Por lo anterior, en este acto consiento que mis datos personales sensibles sean tratados conforme a los términos y condiciones indicados en el presente aviso de privacidad.

Consiento que mis datos personales sean tratados, almacenados y transferidos en los términos y condiciones que señala el presente aviso de privacidad.

Consiento que mis datos personales sensibles sean tratados conforme a los términos y condiciones del presente aviso de privacidad.

Nombre:

Fecha:

Firma:

Dr. Jaime García Mena
Última actualización, Junio de 2016

-fin de texto-