



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Efectos del consumo moderado de cerveza durante 30 días
sobre la microbiota intestinal y la salud**

Tesis que presenta:

M. en C. Fernando Hernández Quiroz

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de Tesis

Dr. César Ángel Hernández Guerrero
Universidad Iberoamericana, Ciudad de México.

Dr. Jaime García Mena

Ciudad de México

Agosto del año 2021

COMITÉ TUTORAL

ASESORES

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional

Dr. Bulmaro Cisneros Vega
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional

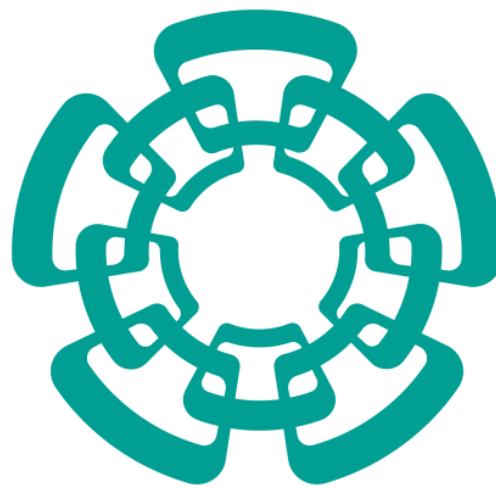
ASESOR EXTERNO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Dr. Carlos Hoyo Vadillo
Departamento de Farmacología
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional

ASESOR EXTERNO AL CINVESTAV

Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer
Departamento Ingeniería Bioquímica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

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 del Dr. César Hernández Guerrero, profesor investigador de la Universidad Iberoamericana, Ciudad de México.



Cinvestav

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 la Lic. Viridiana Rosas Ocegueda por su apoyo administrativo.

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. Luis Yoshio Kameyama Kawabe por su apoyo como parte del comité tutorial.
- Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer por su apoyo como parte del comité tutorial.
- Dr. César Ángel Hernández Guerrero, por su apoyo como codirector y su disposición para proporcionar el material necesario para el trabajo.
- Dr. Jaime García Mena por aceptarme en su equipo de trabajo y brindarme su tutoría y apoyo durante el desarrollo no sólo del proyecto, sino de la generación de varios artículos publicados durante mi estancia en el doctorado.

y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada durante el transcurso del doctorado (CVU: 705105, beca: 291236).

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, Daniel por el apoyo en el trabajo y aguantar el “bully”, Kari por su apoyo durante la ejecución del proyecto, la Dra Igrid García, Khem por la buena comida y su apoyo en el trabajo, Alejandra por su amistad, Marcos por su asesoría tanto en trabajo como cosas de “gamers” sobre todo en “Pokemon-go” junto con Cintia, Loan, Arlene, Emmanuel y Juan Carlos, Fernandito, Marcos, Juan Carlos y Cintia por acompañarme a las quimioterapias, Loan por su asesoría en los análisis bioinformáticos junto con Khem, Karina por su buen sentido del humor en memes y la lasaña, Aida por los buenos ratos y bromas, Arlene por los buenos momentos, Emmanuel por los ratos cheleando y jugando videojuegos y la chica del servicio (La Cintia) por su apoyo. En general un agradecimiento muy grande para todos los del laboratorio cero por su apoyo durante el desarrollo de todos los proyectos que trabajé, 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 doctorado: Karlita, por los paseos, idas a comer y por los buenos ratos que pasamos, Carlos, por las buenas bromas y comentarios fuera de lugar que hacemos, Gerson por esa carne asada, amistad y buenos consejos. Las Cintias de verano (Paulina, Andrea y la Cintia original), que compartimos buenos ratos durante el trabajo y la comida. Sin olvidar tampoco a mis compañeros que están estudiando su posgrado en Europa, Noé, Daniela, María Cafeína y mi mentor en bioinformática Otoniel.

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, Hipólito (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.

Finalmente, un agradecimiento a las personas importantes en mi vida durante esta pandemia, a mi “premade” de DBD para pasar el rato (Juan Carlos, Marcos, Alonso y Loan), la “premade” campeona de torneos (BlueberryPoro, IraCalisto y Calvo con lentes). Y mis profesores de guitarra (Alexis Huerta) y de canto (Natalia Barocio). Y los grupos de amigos virtuales que pude hacer durante este último año, Michel Pérez, Andy Vashe, Jesús Cenzano, Erza Scarlet, Mayita, René Josafat y Ezequiel Alejandro.

También agradecimientos especiales a la Sra. Gabriela Mora Macías, secretaria de la Coordinación Académica del Departamento de Genética y Biología Molecular, la cual me apoyo asesorándome durante el doctorado en todos los trámites que realicé.

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
CCA	Cerveza con alcohol
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CSA	Cerveza sin alcohol
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 densidad
VSG	Velocidad de sedimentación globular
VGM	Volumen globular medio
VPM	Volumen plaquetario medio

Índice de figuras

Figura 1	Proceso de elaboración de cerveza.	4
Figura 2	Estructura de los compuestos polifenólicos en la cerveza.	6
Figura 3	Representación esquemática de las Phyla de la microbiota intestinal del ser humano.	8
Figura 4	La participación de la microbiota puede contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas cuando se tiene una dieta con alto contenido energético.	10
Figura 5	Impacto de la microbiota intestinal en órganos locales y distantes contribuyendo al desarrollo y progreso de la obesidad.	11
Figura 6	Esquema de la región V3 del gen 16S ribosomal amplificada.	21
Figura 7	Cromatograma de iones totales de la cerveza sin alcohol y cerveza con alcohol	32
Figura 8	Análisis de espectrometría de masas de alta resolución de cerveza sin alcohol y cerveza con alcohol.	33
Figura 9.	Cromatograma de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante el consumo de cerveza sin alcohol.	34
Figura 10	Cromatograma de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante el consumo de cerveza con alcohol.	35
Figura 11	Cromatograma de los componentes de la cerveza durante el consumo de cerveza sin alcohol.	36
Figura 12	Cromatograma de los componentes de la cerveza durante el consumo de cerveza con alcohol.	36
Figura 13	Geles de agarosa con DNA genómico y producto de PCR.	37
Figura 14	Phyla bacterianas fecales durante el consumo moderado de CSA y CCA.	39
Figura 15	Diversidad de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza.	41
Figura 16	Cambio en la diversidad bacteriana intestinal por participante después de 30 días de consumo moderado de cerveza.	42
Figura 17	Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) de la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza.	44
Figura 18	Análisis de co-ocurrencia significativa durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol (CSA) y cerveza con alcohol (CCA).	46
Figura 19	Modelo para el efecto del consumo de cerveza sin alcohol (CSA).	61

Índice de tablas

Tabla 1	Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3 del gen 16S ribosomal con barcodes.	21
Tabla 2	Condiciones para la amplificación de la región V3 del gen 16S ribosomal con barcodes.	21
Tabla 3	Variables cuantificadas durante la intervención de cerveza sin alcohol.	30
Tabla 4	Variables cuantificadas durante la intervención de cerveza con alcohol.	31
Tabla 5	Ácidos grasos de cadena corta durante la intervención de cerveza.	35
Tabla 6	Resumen de la secuenciación después del corte.	38
Tabla 7	Abundancia relativa de Phyla bacterianas intestinal durante el consumo moderado de cerveza.	40
Tabla 8	Índices de diversidad de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza.	42
Tabla 9	Predicción de rutas metabólicas de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol.	45
Tabla 10	Lista de Taxones bacterianos con sus OTUs ID de la Figura 18.	47
Tabla 11	Correlación de metadatos con la microbiota intestinal usando la correlación Spearman.	48
Tabla 12	Metadatos asociados con la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza usando el análisis MaAsLin.	49
Tabla 13	Bacterias intestinales con cambios de abundancia significativos durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol y otros reportes.	57
Tabla 14	Bacterias intestinales con cambios de abundancia significativos durante el consumo moderado de cerveza con alcohol y otros reportes.	60

Índice

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	iv
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas.....	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Definición, elaboración y origen de la cerveza	3
1.2. Fitoquímica de la cerveza.....	5
1.3. Actividad biológica de los fitoquímicos de la cerveza.....	6
1.4. Composición de la microbiota intestinal y su relación con la salud	8
1.5. Función de la microbiota intestinal en relación con la salud.....	9
1.6. Efectos de los polifenoles sobre la microbiota.....	12
2. ANTECEDENTES.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVO GENERAL.....	15
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
7. ALCANCE	16
8. METODOLOGÍA.....	16
9. RESULTADOS.....	27
10. DISCUSIÓN.....	51
11. CONCLUSIÓN	61

12. BIBLIOGRAFÍA	62
13. Anexos	79
Anexo 1: Lista de métodos	79
Anexo 2: Tablas suplementarias	88
Anexo 3: Figuras suplementarias	110
Anexo 4: Geles de agarosa (0.5%) del DNA genómico de las muestras fecales de los participantes	118
Anexo 5: Geles de agarosa (2%) de los amplicones de la región V3 del gen 16S ribosomal a partir del DNA obtenido de las muestras fecales.....	120
Anexo 6: Cromatogramas de los AGCC de muestras fecales de los participantes	126
Anexo 7: Cromatogramas de los sueros de los participantes.....	144
Anexo 8: Carta de consentimiento.....	159
Anexo 9: Carta de aviso de privacidad	162

RESUMEN

La cerveza es una bebida que se ha consumido en todo el mundo durante miles de años debido a razones sociales, religiosas y culturales; contiene compuestos polifenólicos, así como ácidos fenólicos con un posible efecto positivo en la salud humana. Este estudio tuvo como objetivo explorar el impacto del consumo moderado de cerveza en la salud humana y la diversidad de microbiota intestinal. Los participantes consumieron diariamente trescientos cincuenta y cinco ml de cerveza sin alcohol (CSA) o cerveza con alcohol (CCA) durante 30 días en cada estudio. Las medidas antropométricas, las muestras sanguíneas para análisis bioquímicos y las muestras fecales para analizar la microbiota se recogieron el día 1 y el día 30. La diversidad microbiana se caracterizó por la secuenciación masiva de las genotecas de la región V3 del gen 16S ribosomal, utilizando el pipeline de QIIME. Encontramos que ambas cervezas tienen efectos sobre la composición de la microbiota intestinal, favoreciendo la proliferación de Bacteroidetes con respecto a Firmicutes. No se observó aumento en los parámetros de peso, cintura, cadera, además, el perfil hepático y lipídico no fueron modificados por el consumo de cerveza sin alcohol. Además, el consumo de cerveza sin alcohol disminuyó la glucosa en suero sanguíneo y aumentó las células β funcionales, mientras que la cerveza con alcohol aumentó la glucosa en suero sanguíneo y disminuyó las células β funcionales. En general, el consumo de cerveza no cambió los valores antropométricos ni afectó la función hepática. Aunque los valores de glucosa disminuyeron con el consumo de cerveza sin alcohol y aumentaron con el consumo de cerveza con alcohol, se mantuvieron dentro del rango normal. Nuestra conclusión es que el consumo moderado de cerveza sin alcohol tiene un efecto positivo en la salud humana por los polifenoles y ácidos fenólicos bioactivos, además del enriquecimiento de la diversidad de la microbiota intestinal con bacterias benéficas; mientras que el alcohol en la cerveza interfiere con los efectos positivos de la cerveza sin alcohol. Se debe trabajar más sobre este tema antes de sacar conclusiones generales.

ABSTRACT

Beer is a beverage that has been consumed worldwide for thousands of years due to social, religious, and cultural reasons; it contains polyphenolic compounds as well as phenolic acids with a potential positive effect on human health. This study aimed to explore the impact of moderate beer consumption on human health and gut microbiota diversity. Three hundred fifty-five mL of non-alcoholic beer (NAB) or alcoholic beer (AB) were consumed daily by the participants for 30 days in each study. Anthropometric measures, blood samples for biochemistry, and fecal samples for microbiota analysis were collected on Day 1 and Day 30. Microbial diversity was characterized by high-throughput sequencing of V3 region of the 16S ribosomal DNA libraries, and data were analyzed using the QIIME pipeline. We found that NAB and AB have effects on the composition of the gut microbiota, favoring the proliferation of Bacteroidetes with respect to Firmicutes. No increase in weight, waist, and hip parameters was observed, and the liver and lipid profile values were not modified for NAB. In addition, the consumption of NAB induced a decrease in fasting blood serum glucose and an increase in functional b cells, while, on the other hand, there was an increase in blood serum glucose and a decrease in functional b cells with the consumption of AB. In general, beer consumption neither changed anthropometric values, nor affected liver function. Although the glucose values decreased with NAB or increased with AB, they remained within the normal range. Our conclusion is that moderate consumption of NAB has a positive effect on human health via supplementation of biological active polyphenol and phenolic acids, and by enrichment of the gut microbiota diversity with beneficial bacteria, while the presence of alcohol in AB interferes with this effect. More work should be done on this topic before general conclusions are drawn.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición, elaboración y origen de la cerveza

La cerveza es una bebida natural obtenida mediante fermentación alcohólica de, 4 ingredientes principales; malta obtenida de cebada, lúpulo, levadura y agua. Su elaboración consiste en la hidratación de los granos de cebada para promover la germinación parcial de estos granos, para después secarlos mediante calor, este proceso es conocido como malteado, posteriormente, a la malta se le agrega agua a 70° C durante 20 minutos y se deja hervir por una hora (a esto se le conoce como mosto), se le agrega el lúpulo en cuanto empieza a hervir el mosto, a la media hora, faltando 10 minutos o en varios tiempos, según el amargor y aroma esperados (Figura 1) (Osorio-Paz *et al.*, 2019; Cerveceros de España, 2001). Los compuestos del lúpulo forman complejos insolubles con proteínas, que da el cuerpo a la cerveza, descontamina el mosto y evita el crecimiento bacteriano. Finalmente, se deja que mosto llegue a una temperatura de 25° C para agregar la levadura con el fin de iniciar la fermentación. Existen dos tipos de levadura: *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de fermentación alta es para cervezas tipo porter y stout; por otro lado, está la levadura *Saccharomyces uvarum*, levadura de fermentación baja la cual es para cerveza tipo lagers (Osorio-Paz *et al.*, 2019).

La **CERVEZA** de principio a fin



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

Se considera que el origen de la cerveza está relacionado al descubrimiento de la agricultura (alrededor del 12,000 a. C.). 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). Por otro lado, hay evidencia de fabricación de cerveza ligada a Mesopotamia, donde se encontraron fragmentos arqueológicos de cerámica que datan del año 6,000 a. C. 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). Finalmente, en Roma se conoció la cerveza a

través de Grecia; aquí fue donde la nombraron cerveza, ya que era llamada *Cerevisia*, derivado del nombre de su deidad de los cultivos (Ceres) (Cabras & Higgins, 2016; Carbajal-Martínez & Insuasti-Andrade, 2010). Fue hasta después del siglo V d. C., cuando los monjes mejoraron el proceso de fabricación de la cerveza al adicionarle lúpulo, lo cual contrarrestó el sabor dulce de la malta, le da un buen aroma y se añaden conservadores (Cabras & Higgins, 2016).

1.2. Fitoquímica de la cerveza

La cerveza se produce a partir de cebada, lúpulo, levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) y agua. Los extractos de cebada y lúpulo aportan el 70-80% y 20-30% de los componentes polifenólicos respectivamente, de los cuales los principales son: kaempferol, quercetina, tirosol, ácidos felúrico, xantohumulol, isoxantohumulol, 8-prenilarigenina, α ácidos (humulona) y β ácidos (lupulona), estos componentes tienen reportada actividad antioxidante (Iniguez AB & Zhu MJ., 2020; Chen *et al.*, 2014; Gerhäuser, C., 2005). Mediante espectrometría de masas de alta resolución se pudieron identificar una gran cantidad de polifenoles donde la mayoría fueron son hexósidos, dihexósidos, pentosidos y químicos conjugados, por ejemplo; ácido feruloilquínico, ácido cafeico-O-hexósido, ácido cumarico-O-15-hexósido, ácido sinapico-O-hexósido, catequina-O-dihexósido, kaempferol-O-hexósido y apigenina-C-hexósido-pentosido (Quifer-Rada *et al.*, 2014).

La humulona, la cual pertenece a los iso α ácidos se isomeriza espontáneamente cuando se somete a una temperatura alta (70-120° C). La lupulona la cual pertenece a los β ácidos, tiene una estructura similar, pero difiere 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. En menor proporción se encuentran los derivados del xantohumulol, las cuales son chalconas preniladas y finalmente los flavonoides los cuales son solubles en compuestos polares (Figura 2) (Iniguez AB & Zhu MJ., 2020; Steenackers *et al.*, 2015; Gerhäuser, C., 2005).

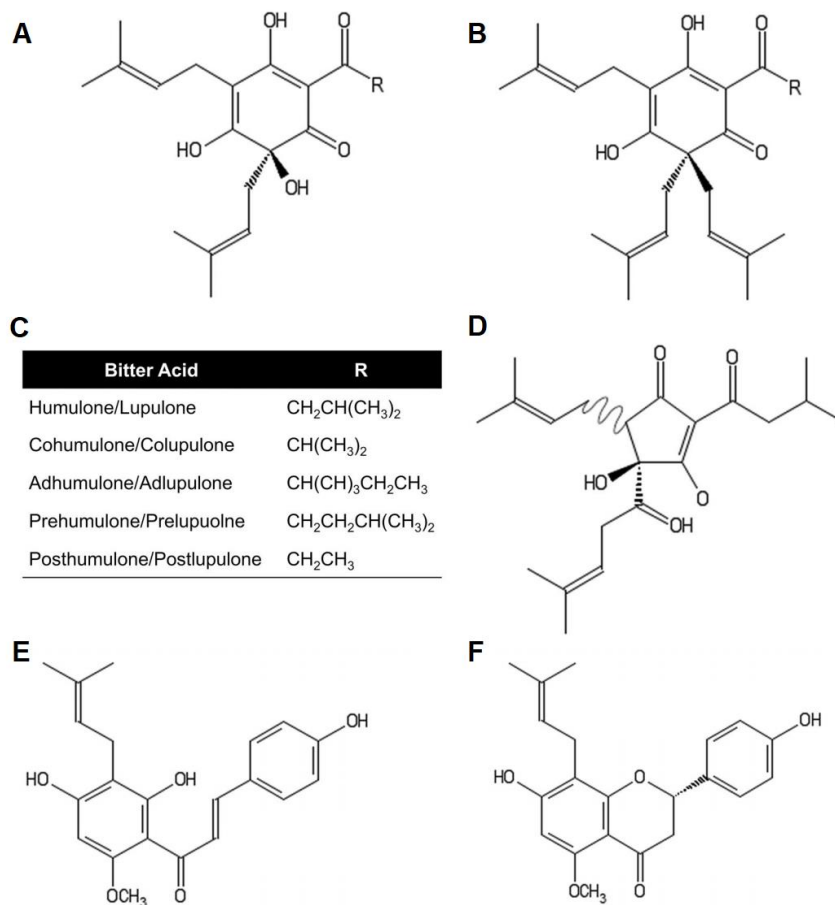


Figura 2. Estructura de los compuestos polifenólicos en la cerveza. (A) α ácidos (humulona), (B) β ácido (lupulona), (C) análogos de ácidos α y β , (D) Isohumolona, (E) Xantohumol, (F) Isoxantohumol (Iniguez AB & Zhu MJ., 2020).

1.3. Actividad biológica de los fitoquímicos de la cerveza

Los componentes polifenólicos contenidos en la cerveza tienen gran actividad antioxidante la cual brinda una protección contra el estrés oxidativo, teniendo un efecto positivo en enfermedades tales como; obesidad, diabetes y aterosclerosis (Quesada-Molina *et al.*, 2019). Se conoce que hay una 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 (Iniguez AB & Zhu MJ., 2020; Franco *et al.*, 2013; Nardini *et al.*, 2006). Por otro lado, el consumo de cerveza sin alcohol en la cena aumenta la capacidad antioxidante en la orina (Ghiselli *et al.*, 2000).

La cerveza contiene etanol y compuestos polifenólicos (p. Ej., Catequina), ácidos fenólicos (p. Ej., Ácido ferúlico), chalconas preniladas (p. Ej., Humulona) y flavonoides (p. Ej., Xantohumol). Estos compuestos tienen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes, y pueden tener un impacto en la diversidad de la microbiota intestinal (Quesada-Molina *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2014). Por otro lado, los fitoquímicos del lúpulo mitigan la inflamación y disminuyen la resistencia a la insulina (Iniguez AB & Zhu MJ., 2020).

Un polifenol característico de la cerveza es el xantohumol, el cual es un agente quimiopreventivo de amplio espectro que actúa inhibiendo la activación metabólica de procancerígenos, induce enzimas con actividad detoxificantes y puede inhibir el crecimiento de tumores en estadio temprano (Iniguez AB & Zhu MJ., 2020; Stevens & Page, 2004). También en otro estudio se usaron los fitoquímicos del lúpulo, mostraron que pueden inducir a p53 y p21 deteniendo el ciclo celular o la apoptosis a través la cascada de las caspasas (Iniguez AB & Zhu MJ., 2020). Finalmente, tanto el xantohumol como el isoxantohumol pueden inhibir la síntesis de DNA en células de cáncer de mama (MCF-7) (Gerhäuser, C., 2005).

Hay reportes que indican que el fitoestrógeno contenido en la cerveza, la 8-prenilnaringenina tiene actividad estrogénica. *In vitro* se mostró actividad estrogénica en levadura recombinante que expresa el receptor de estrógenos con una respuesta estrogénica en cultivos de células endometriales Ishikawa (Var-I) (Stevens & Page, 2004); sin embargo, estudios *in vivo* usando una dosis de 100 µg/ 100 mL en ratones incrementa la mitosis en vagina, sin mostrar ningún efecto perjudicial (Gerhäuser, C.,2005).

El xantohumol contenido en la cerveza puede convertirse a 8-prenylnaringenina (Aichinger *et al.*, 2018). Por los efectos estrogénicos y la capacidad anabólica que tiene la cerveza, se le puede considerar como una posible estrategia terapéutica para tratar la menopausia y prevenir la osteoporosis (Osorio-Paz *et al.*, 2019).

1.4. Composición de la microbiota intestinal y su relación con la salud

La microbiota intestinal humana representa aproximadamente 100 billones de células, o 10 veces el número total de células humanas (Mao & Franke, 2015), y tiene un impacto en la fisiología humana (Walsh *et al.*, 2015). El tracto gastrointestinal es un micro ecosistema dinámico, el cual contiene una alta diversidad microbiana, la cual vive en equilibrio con el hospedero, 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; de Almada *et al.*, 2015; Walsh *et al.*, 2015).

La secuenciación del DNA de muestras biológicas permitió para el año 2012 caracterizar los microorganismos asociados al ser humano (microbiota) y su correspondiente genoma, con lo que se llegó a determinar los principales Phyla: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria (Murugesan *et al.*, 2015) (Figura 3). De los cuales Bacteroidetes, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* están cercanamente relacionados y el phylum de los Firmicutes es el más distante (Mao & Franke, 2015; Zapata *et al.*, 2015; Bik *et al.*, 2006).

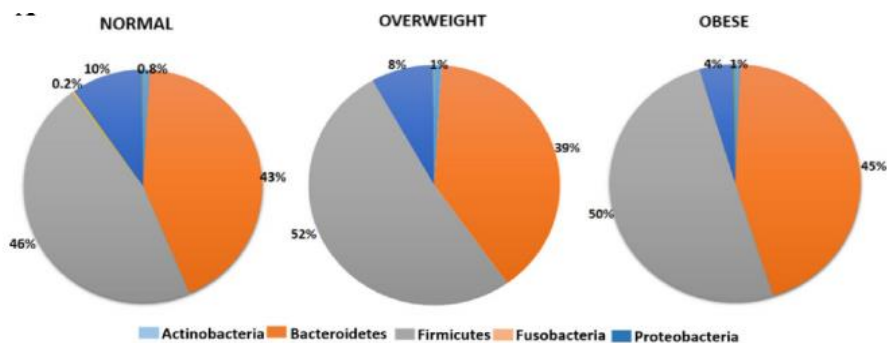


Figura 3. Representación esquemática de las Phyla de la microbiota intestinal del ser humano (Murugesan *et al.*, 2015).

1.5. Función de la microbiota intestinal en relación con la salud

La microbiota intestinal vive en equilibrio con el huésped, degradando los componentes no digeribles de los alimentos, sintetizando vitaminas y metabolizando los carbohidratos y las proteínas. La microbiota intestinal actúa como una barrera intestinal, protegiendo contra enfermedades y estimulando el sistema inmune (de Almada *et al.*, 2015). 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 y adolescentes en peso normal mostraron una mayor abundancia relativa de Bacteroidetes, mientras que los Firmicutes son más abundantes en niños y adolescentes con sobrepeso u obesidad (Nirmalkar *et al.*, 2018; Murugesan *et al.*, 2015) e inclusive adultos (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019; Devaraj *et al.*, 2013).

Un desequilibrio en la abundancia relativa de la microbiota intestinal se asocia con una disfunción que afecta la salud humana. En niños mexicanos con sobrepeso y obesidad, los miembros del Phylum Firmicutes, la familia Lachnospiraceae y los géneros *Faecalibacterium* y *Roseburia* mostraron mayores abundancias relativas (Murugesan *et al.*, 2015; Estrada-Velasco *et al.*, 2014). Estas bacterias son conocidas por producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, que regulan el equilibrio energético (Murugesan *et al.*, 2016; Murugesan *et al.*, 2017). Además, un desequilibrio en la microbiota intestinal afecta la salud de la mujer, produciendo enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019).

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 (Nirmalkar *et al.*, 2018), diabetes tipo 2 (Chávez-

Carbajal *et al.*, 2020), y síndrome del intestino irritable (Murugesan *et al.*, 2015; Walsh *et al.*, 2015; Gerber, G. K., 2014).

La microbiota que incrementa la capacidad de extraer energía en calorías de la dieta se le conoce como microbiota que fomenta la obesidad (Figura 4) y está compuesta principalmente por Firmicutes en personas que padecen de obesidad (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019; Nirmalkar *et al.*, 2018; Murugesan *et al.*, 2015). 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).

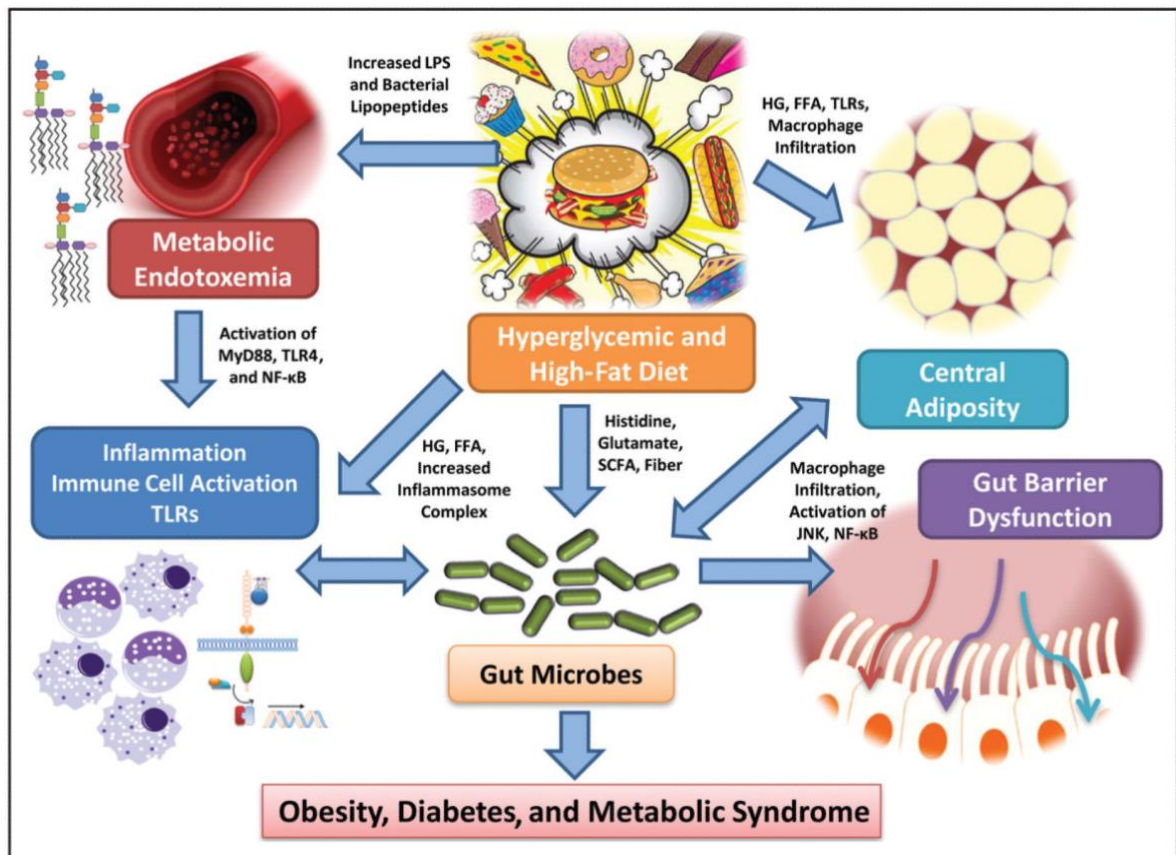


Figura 4. La participación de la microbiota puede contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas cuando se tiene una dieta con alto contenido energético (Devaraj *et al.*, 2013).

La microbiota intestinal mediante sus lipopolisacáridos (LPS) (Figura 5) 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 , los cuales

están asociados con la inflamación (Mao & Franke, 2015; Zapata *et al.*, 2015). Otra forma de interacción de la microbiota con el hospedero son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Figura 5), principalmente butirato, acetato y propionato, los cuales son generados por la fermentación bacteriana (Murugesan *et al.*, 2015). 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 (Dengler *et al.*, 2015; Devaraj *et al.*, 2013). Así, estos metabolitos estarían relacionados con enfermedades metabólicas como la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (Figura 5) (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2018; Chávez-Carbajal *et al.*, 2020).

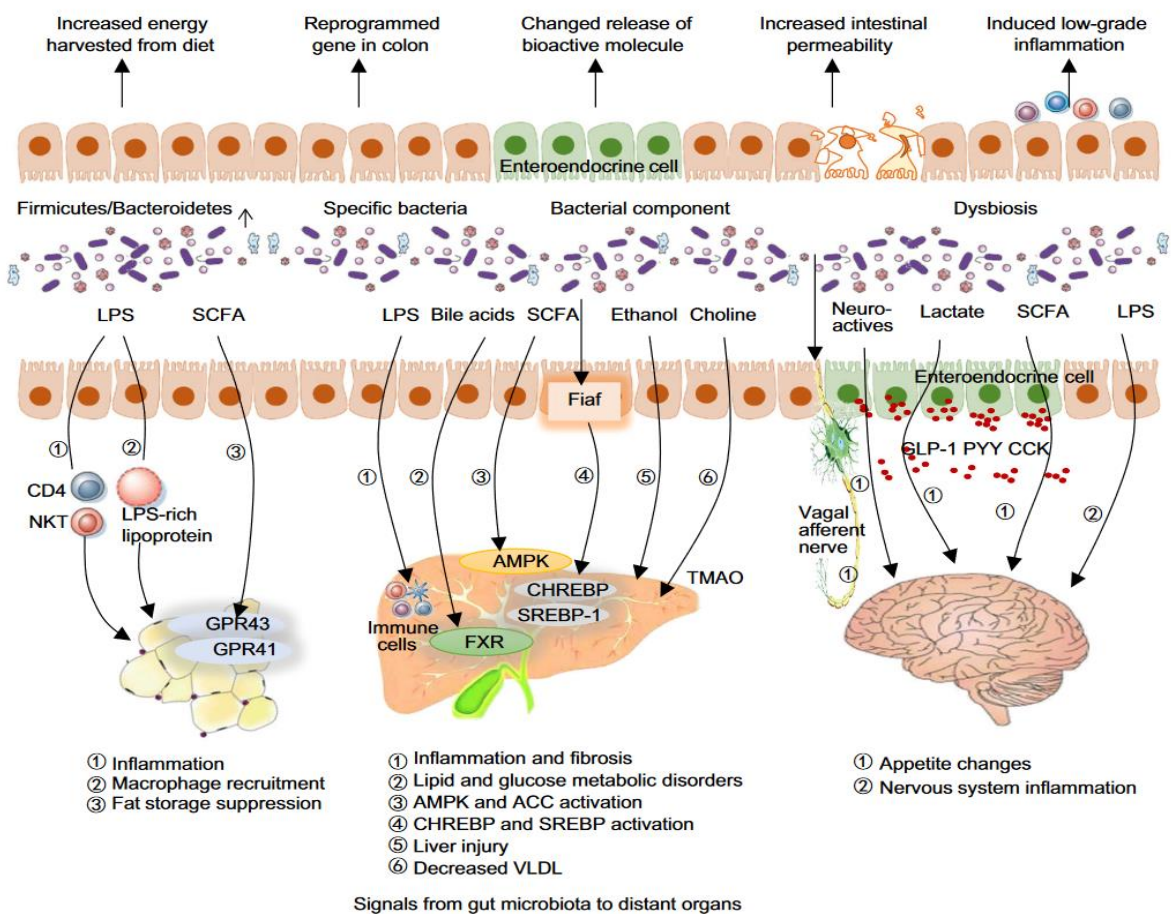


Figura 5. Impacto de la microbiota intestinal en órganos locales y distantes contribuyendo al desarrollo y progreso de la obesidad (Sun *et al.*, 2018).

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 puede interactuar con los TLR-2 y activa a las células T reguladoras promoviendo tolerancia inmunitaria (Zapata *et al.*, 2015; Round *et al.*, 2011).

1.6. Efectos de los polifenoles sobre la microbiota

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 (Cardona, *et al.* 2013). Los Bacteroidetes tienen un mayor número de enzimas que degradan glicanos que los Firmicutes (Cardona, *et al.* 2013), un análisis del genoma de los 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 perfringens*, *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 (Parkar *et al.*, 2013). En otro estudio, las bacterias aisladas de heces humanas se cultivaron junto con algunos compuestos polifenólicos de té, como rutina, quercetina, ácido clorogénico, ácido cafeico, donde proliferaron las bifidobacterias y en general disminuyendo los Firmicutes respecto a los Bacteroidetes (Lee *et al.* 2006).

Además, un estudio mostró que cuando la microbiota intestinal se cultiva in vitro en presencia de polifenoles como quercetina, ácido clorogénico y ácido cafeico, hubo una disminución en la abundancia relativa de Firmicutes con

respecto a Bacteroidetes (Parkar *et al.*, 2013). 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 antibacteriana *in vitro*, en especial contra gram positivas, particularmente *Lactobacillus* (Gerhäuser, C., 2005).

2. ANTECEDENTES

El consumo de polifenoles tiene un impacto en la salud. En un estudio que utilizó ratones hembra db/db alimentados con polifenoles de té verde durante 7 semanas, se observó una disminución en los niveles de glucosa en sangre en ayunas y grasa mesentérica, junto con un aumento en el nivel de insulina en suero, un aumento en la abundancia relativa de Bacteroidetes, y una disminución de Firmicutes (Chen *et al.*, 2019). 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).

Se ha informado que el consumo de cervezas claras u oscuras en los hámsteres inhibe significativamente la aterosclerosis, observándose una disminución de colesterol y triglicéridos especialmente en la cerveza clara (Gerhäuser C., 2005). También se han reportado que la cerveza previene el daño hepático agudo cuando se induce daño con tetracloruro de carbono en ratas. (Franco *et al.*, 2013).

En humanos, 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). En la población holandesa, el consumo diario de tres vasos de cerveza con o sin alcohol durante 3 semanas, bajo un control dieta, no produjo cambios en el peso, índice de masa corporal, hemoglobina, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, transaminasas y niveles de glucosa en ayunas; sin embargo, no se monitoreó la diversidad de microbiota intestinal

(Sierksma *et al.*, 2002). En otro estudio sobre el efecto del consumo de alcohol en la diversidad de la microbiota intestinal en humanos y ratones, 6 semanas de consumo de alcohol aumentaron la abundancia relativa de Proteobacterias y disminuyeron la abundancia de Bacteroidetes (Engen *et al.*, 2015).

Según la información disponible actual, los polifenoles del té pueden actuar como prebióticos, favoreciendo el desarrollo y el crecimiento de bacterias deseables como los Bacteroidetes. Actualmente, no hay artículos de investigación sobre el efecto de los polifenoles de la cerveza en la microbiota intestinal y su impacto en la salud humana. En este trabajo, estudiamos el efecto del consumo moderado de cerveza sin alcohol y con alcohol en la composición de la microbiota intestinal y la salud de la población adulta mexicana.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe poca investigación publicada que estudia los principales componentes de la cerveza tales como los polifenoles y sus efectos sobre la microbiota intestinal y las variables antropométricas y clínicas de los consumidores. Tampoco si la microbiota puede metabolizar componentes de la cerveza para sintetizar otras moléculas funcionales con un efecto benéfico para sí misma y el hospedero. Además, no se ha explorado suficientemente si el contenido alcohólico puede interferir con este efecto.

4. HIPÓTESIS

El consumo moderado de cerveza con o sin alcohol en la comida, favorece el desarrollo de una microbiota intestinal con efectos benéficos para la salud del consumidor, sin presentar efectos negativos en las variables antropométricas y clínicas.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del consumo moderado de la cerveza con y sin alcohol sobre la variables antropométricas, perfiles hepático, lipídico y la microbiota intestinal del consumidor.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1. Reclutar los 90 individuos sanos para realizar una valoración mediante parámetros antropométricos, datos clínicos y estudios bioquímicos.

Objetivo específico 2. Hacer una intervención con cerveza con y sin alcohol en la dieta de los participantes, colectando muestras sanguíneas y fecales los días 1, 15 y 30 del estudio.

Objetivo específico 3. Analizar los componentes de la cerveza con y sin alcohol, mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Objetivo específico 4. Cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta (propionato, butirato y acetato) en muestras fecales y determinar componentes fenólicos por medio de cromatografía líquida de alta resolución en sueros sanguíneos.

Objetivo específico 5. Generar genoteca de amplicones de la región V3 del gen 16S ribosomal usando DNA de las muestras fecales de los participantes.

Objetivo específico 6. Realizar secuenciación masiva de las genotecas de la región V3 del gen 16S ribosomal para caracterizar la microbiota.

Objetivo específico 7. Evaluar una asociación entre los cambios en la diversidad de la microbiota con el consumo moderado de cerveza con y sin alcohol.

Objetivo específico 8. Evaluar una asociación entre los cambios en la diversidad de la microbiota con las medidas antropométricas, los perfiles hepático, lipídico y el contenido ácidos grasos de cadena corta de las muestras fecales.

7. ALCANCE

Estudiar el efecto del consumo moderado de cerveza con y sin alcohol durante 30 días, sobre la microbiota intestinal, medidas antropométricas y variables bioquímicas de 90 participantes de vida libre.

8. METODOLOGÍA

Selección de sujetos de estudio

El estudio de la cerveza sin alcohol incluyó a 35 adultos (40% mujeres), de 21 a 53 años, con una media de 29 años (DE = 7,75), el de la cerveza con alcohol incluyó a 33 adultos (45% mujeres), 21 a 55 años, con una media de 30 (DE = 9.25). Los participantes fueron reclutados mediante una invitación abierta para participar en el proyecto, hecha a la comunidad en general en nuestra Institución (Cinvestav). Se obtuvieron los formatos de consentimiento informado y de conformidad de todos los participantes, respetando la Declaración de Helsinki (World Health Organization, 2000). El protocolo fue aprobado por la Junta del Comité de Ética e Investigación Institucional de Cinvestav (Comité de Bioética para la Investigación en Seres Humanos COBISH-Cinvestav) con el registro 037/2016. Los criterios de inclusión para participar fueron los siguientes; estar sanos, dispuestos a beber cerveza y proporcionar muestras sanguíneas y fecales. Los criterios de exclusión fueron tener enfermedades gastrointestinales, hígado disfuncional, enfermedades crónicas, embarazo, alergias, consumo de cualquier suplemento, antiinflamatorio oral, metformina o tratamiento hormonal y el consumo de antibióticos o probióticos durante 3 meses previos. Los criterios de eliminación fueron desarrollo de hígado disfuncional, consumo de antibióticos o probióticos, y no adherencia al consumo de cerveza.

Consumo de cerveza

El estudio inició una vez que los participantes firmaron el consentimiento, además de pasar las pruebas de perfil hepático y lipídico. Los participantes consumieron

una lata de cerveza tipo “Lager” de 355 ml durante la comida principal durante 30 días, durante la fase 1 del estudio que fue de noviembre a diciembre del 2016, los participantes consumieron cerveza con 0.5% de alcohol (sin alcohol); la fase 2 por otro lado, fue durante mayo del 2017, los participantes consumieron una lata de cerveza con alcohol (4.9% de alcohol). Cada participante proporcionó 3 muestras sanguíneas y fecales diferentes los días 1, 15 y 30.

Evaluación antropométrica

Se midieron la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica, el pulso, el peso, la altura, la circunferencia de la cintura y la cadera. El índice de masa corporal (IMC) se calculó utilizando la fórmula $IMC = Kg / m^2$ donde Kg es peso en kilogramos y m^2 es el cuadrado de la altura en metros (Nuttall FQ, 2015), también se calculó la relación cintura / cadera (ICC) (World Health Organization, 2000). También se midió el músculo (%), la grasa (%), la grasa visceral (%) y el gasto de energía basal (GEB) los cuales se calcularon utilizando una escala de control corporal OMRON (modelo HBF-514C).

Encuesta de perfil dietético

Un dietista certificado aplicó una encuesta de recuerdo de consumo de 24 horas, donde los participantes indicaron la frecuencia con la que consumieron los alimentos incluidos en el cuestionario; que es exclusivo para los mexicanos (Hernández-Ávila *et al.*, 1998).

Pruebas bioquímicas

Se recogieron muestras sanguíneas después de 12 horas en ayunas de cada participante en un Vacutainer® con tubo EDTA K2 (BD y 367856). Glucosa en suero, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), triglicéridos, lipoproteína de baja densidad (LDL), aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), fosfatasa alcalina, proteína C reactiva (CRP), total La bilirrubina, la bilirrubina directa, la insulina, la bilirrubina indirecta, la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y la hemoglobina A1c (hemoglobina glucosilada,

HbA1c) se midieron utilizando kits de química clínica Abbot y se analizaron con el analizador automático ARCHITECT cSystem (Abbott Park, Illinois, EE. UU.)). La velocidad de sedimentación globular (VSG) (mm / H) se midió según lo informado (Pincherle & Shanks, 1967). Evaluación del modelo homeostático de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó utilizando la fórmula: (insulina (mU/ml) × glucosa en ayunas mg/dL) ÷ 405, y FCβ (%) se calculó utilizando la fórmula ((insulina mU/ml) x 360) ÷ (x glucosa en ayunas mg / dL- 63)), (Aradillas-García *et al.*, 2012); El índice aterogénico del plasma (AIP) se calculó utilizando la fórmula (colesterol total mg/dL ÷ HDL mg/dL) (Castelli W. P., 1984).

Recolección de muestras fecales

Las muestras fecales de todos los participantes se recogieron asépticamente en un contenedor de heces estériles en casa por la mañana. Una vez recibidas, las muestras inmediatamente se dividieron en alícuotas usando tubos de polipropileno estéril de 2,0 ml y se almacenaron a -70°C.

Caracterización de polifenoles de cerveza por espectrometría de masas de alta resolución

Las muestras de cerveza se acondicionaron como se informó anteriormente (Dvořáková *et al.*, 2007) con algunas modificaciones de la siguiente manera. Se desgasificaron 100 ml de cerveza en un matraz Erlenmeyer de 250 ml en un baño de ultrasonido (Branson 2800, Connecticut, EE. UU.). Durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de desgasificar, se pasaron muestras de 5 ml a través de cartuchos Supelclean LC-18 SPE de 1 ml (100 mg) (Cat. # 57012, SUPELCO, Pennsylvania, EE. UU.) utilizando un colector Visiprep SPE (Cat. # 57250-U, SUPELCO, Pennsylvania, ESTADOS UNIDOS). Los compuestos fenólicos se eluyeron usando 2,4 ml de acetonitrilo de grado HPLC (Cat. # 9012, J. T. Baker, Estado de México, México). El acetonitrilo se eliminó utilizando flujo de nitrógeno de ultra alta pureza (Infra, CDMX, México); los compuestos fenólicos se recuperaron con 1 ml de ácido fórmico al 0.1% (Cat. # 0128, J. T. Baker, Estado de México, México) en agua grado HPLC (Cat. # 4218 J.T. Baker, Estado de

México, México). Las muestras se almacenaron a -20° C hasta el análisis. El análisis de los polifenoles se realizó según lo reportado (Quifer-Rada *et al.*, 2015), brevemente, se fraccionaron 20 μ L de cada muestra por cromatografía HPLC usando un gradiente de metanol al 10-50% en ácido fórmico al 1% y agua grado HPLC durante 68 minutos usando un Sistema LC Agilent 1260 Infinity II acoplado al sistema de espectrómetro de masas LC-MS de triple cuadrupolo Agilent 6420 (ESI-QqQ-MS) (Agilent, California, EE. UU.) en una columna de fenilo Ascentis® de 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m (Cat. # 581617-U, SUPELCO, Pennsylvania, EE. UU.). Las moléculas se ionizaron usando energía de fragmentación de 135 eV usando el modo de exploración de 100 a 1000 m/z.

Medición de los ácidos grasos de cadena corta

Los AGCC se midieron en muestras fecales deshidratadas de 100 mg utilizando un equipo de HPLC PerkinElmer-Flexar (Massachusetts, EE. UU.) Como se informó anteriormente (Maya-Lucas *et al.*, 2019). Brevemente, la fase móvil consistió en dos soluciones; 80% de (A) (NaH_2PO_4 20 mM (Cat. # S8282, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.) pH 2.2 ajustado con ácido fosfórico (Cat. # 0260-05, JT Baker, Estado de México, México)) y 20% de (B) (Acetonitrilo (Cat. # 9012-03, JT Baker, Estado de México, México)) usando una de flujo de 1.0 mL/min en una columna C-18 de 15 cm (Cat. # 9303558, PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU.), como se informó anteriormente (De Baere *et al.*, 2013). Todos los datos cromatográficos se procesaron utilizando Chromera (v4.1.2.6410) - Software HPLC Flexar (PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU.).

Extracción de DNA de muestras fecales

Se realizó la extracción de DNA de 100 mg de heces homogeneizadas (71.5% de contenido de agua \pm 7.26 SD) usando el kit de heces Favor prep (Cat. # FASTI001-1; Favorgen Biotech Corp., Ping-Tung, Taiwán) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenó a -70° C hasta la secuenciación (Nirmalkar *et al.*, 2018). La concentración de ADN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.), Y la calidad del ADN

se evaluó mediante electroforesis en gel 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 y TBE (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 la región V3 del gen 16S ribosomal

Para la secuenciación, se prepararon genotecas a partir del DNA obtenido de las muestras fecales (Anexo 4). A partir de un amplicón de ~ 281 pb que contenía la región variable V3 del gen de 16S usando el primer directo V3-341F (conjunto de barcodes 1-50) complementario a las posiciones 340-356 de la molécula de ADN ribosomal de *Escherichia coli* 16S *rnnB* GenBank J01859.1, y el cebador inverso V3-518R complementario a las posiciones 517-533 (Fierer *et al.*, 2008, Tabla S1, Anexo 2). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 50 ng de DNA molde en un volumen final de 50 µL como se informó anteriormente (Murugesan *et al.*, 2015) (Tabla 1), el programa termociclador se llevó a cabo como está descrito en la Tabla 2. La amplificación se llevó a cabo utilizando GeneAmp PCR System 2700 Thermocycler (Applied Biosystems); una vez terminada la PCR se comprobó la calidad del producto esperado (281 pb) mediante un fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa al 2 % teñido con 0.80 µl de colorante Midori Green, utilizando 5 µl de buffer de carga de azul de bromofenol con glicerol y TBE (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 (Anexo 5). Para generar las genotecas, se agruparon cantidades iguales de cada amplicón del barcode 1-50, la mezcla se purificó usando E-Gel iBase Power System (Invitrogen). El tamaño y la concentración de las genotecas se confirmaron con el sistema Bioanalizador Agilent 2100 y el kit de ADN de alta sensibilidad (Agilent, EE. UU.).

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

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 µM	1 µL
Primer antisentido	10 µM	0.2 µM	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 ribosomal con barcodes.

	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	

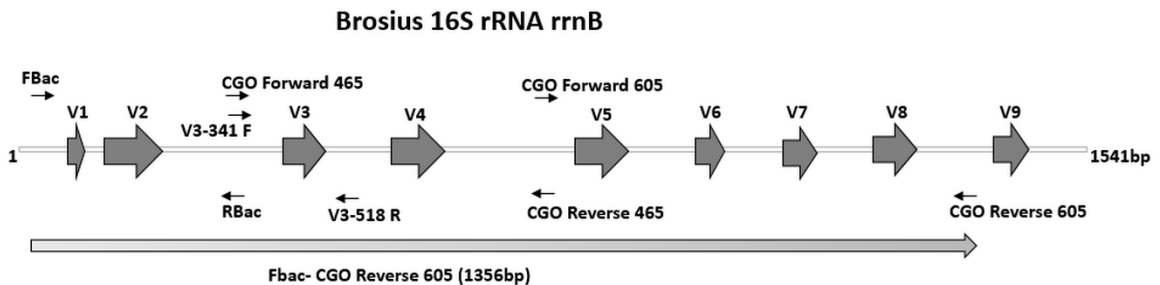


Figura 6. Esquema de la región V3 del gen 16S ribosomal amplificada (García-Mena *et al.*, 2016).

Secuenciación de las genotecas

La secuenciación de las genotecas se realizó con Ion OneTouch 2, Ion PGM Template OT2 200 Kit v2 DL (Life Technologies, California, EE. UU.), Ion 318 Chip Kit v2 y Ion Torrent PGM System como se describió anteriormente (Nirmalkar *et al.*, 2018). Después de la secuenciación, el software PGM filtró las lecturas para excluir secuencias policlonales y de baja calidad. Todas las lecturas se analizaron con el software FastQC v0.11.9 (Andrews S. 2010) y se recortaron a 200 nt con Trimmomatic v0.38. Los archivos FASTQ se convirtieron en archivos FASTA, se concatenaron en un solo archivo y luego se procesaron con el pipeline de QIIME

(Quantitative Insights into Microbial Ecology) v1.9.0 (Caporaso *et al.*, 2010). Las secuencias de ADN se clasificaron en Operational Taxonomic Units (OTUs) utilizando parámetros de selección con un nivel de similitud del 97% con respecto a la base de datos de Greengenes v13.8. La secuencia y los archivos de mapeo correspondientes a todas las muestras utilizadas en este estudio se depositaron en el repositorio BioSample de NCBI número de acceso: PRJNA487257, enlace: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP158634>.

Determinación de la microbiota: abundancia relativa, diversidad y enriquecimiento significativo.

Los datos se analizaron con el pipeline de QIIME para determinar la abundancia relativa de los taxones bacterianos. La diversidad alfa, se caracterizó por los índices de Shannon, Simpson, Chao1 y las especies observadas usando los paquetes phyloseq (v1.22.3) y ggplot2 (v3.1.0) en R (v3.4.4) (McMurdie & Holmes, 2013). El índice de disimilitud de la diversidad β se calculó mediante la métrica de distancia UniFrac como porcentaje de la variabilidad total en diferentes ejes de la gráfica y se visualizó mediante las coordenadas principales (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019). Se utilizó el programa Linear discriminant analysis effect size (LEfSe, v1.0) para determinar las diferencias en la abundancia relativa de taxones bacterianos entre los grupos. Los parámetros se establecen con el $p\text{-value} \leq 0.05$, y un LDA ≥ 2.0 , son considerados valores significativos y se representan gráficamente en las figuras generadas (Segata *et al.*, 2011).

Análisis de asociación de multivariantes

Para investigar las asociaciones entre la abundancia de taxones bacterianos y los metadatos, se realizó un análisis Multivariate Analysis by Linear Models (MaAsLin, v0.0.4) utilizando parámetros predeterminados en R (v3.4.4). Este análisis multivariado genera gráficos de asociación significativos que informan los valores p y q . Los valores de $p < 0.05$ y los valores de $q < 0.25$ se consideraron valores significativos (Morgan *et al.*, 2012).

Predicción de las rutas metabólicas de la microbiota intestinal

El análisis se realizó utilizando (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) PICRUSt (v1.1.2) (Langille *et al.*, 2013). Los OTU de referencia obtenidos con un 97% de similitudes con la base de datos Greengenes (v13.8) en el pipeline de QIIME (v1.9.0), que tiene el archivo closed_otu.biom, se analiza junto la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG), para tener como resultado una predicción de rutas metabólicas de las bacterias con un 80 - 85 % de precisión. Para visualizar y analizar los valores significativos, se utilizó el software de análisis estadístico de perfiles metagenómicos (STAMP, v2.1.3). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Welch (Parks *et al.*, 2014).

Análisis de Co-ocurrence

El análisis se hizo mediante los archivos otu_table.biom con plugin CoNet (Co-occurrence Network Inference) (Faust & Raes, 2016) en Cytoscape (v3.6.1). Las redes de co-ocurrencia se generaron utilizando el mismo programa. Los valores de p y q <0.05 se consideraron estadísticamente significativos, y p <0.05, R > 0.8 se consideraron para el análisis de correlaciones (Pearson / Spearman).

Análisis estadístico

Todas las variables, valores antropométricos, perfil hepático y lipídico, ácidos grasos de cadena corta y las abundancias relativas de la microbiota, se analizaron estadísticamente mediante la prueba de rango con signos de Wilcoxon y la prueba T de muestras pareadas. Los datos se expresaron en medias \pm desviación estándar, el *p-value* <0.05 se considera estadísticamente significativo y se expresa como * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 y **** ≤ 0.0001 . El análisis bioinformático se realizó en el entorno R (v3.4.4). Las imágenes se trazaron usando los paquetes ggplot2 (v3.1.0) y RcolorBrewer (v1.1-2). Para corregir los valores p, se realizaron múltiples pruebas (Benjamini & Hochberg, 1995) utilizando la función p.adjust() en R (v3.4.4) para evitar la inclusión de falsos positivos, incluida la abundancia relativa bacteriana, LEfSe (v1.0) , MaAsLin (v0.0.4), PICRUSt (v1.1.2) y análisis

de co-ocurrencia. La diversidad bacteriana intestinal (diversidad alfa) se evaluó con los paquetes phyloseq (v1.22.3) y ggplot2 (v3.1.0).

8.1 Plan de trabajo

Fase I: Selección de los voluntarios y toma de muestras

Para la cerveza sin alcohol, el estudio incluyó a 35 adultos (40% mujeres), de 21 a 53 años, con una media de 29 años (DE = 7,75), y para la cerveza con alcohol incluyó a 33 adultos (45% mujeres), 21 a 55 años, con una media de 30 (DE = 9.25), los cuales pasaron los criterios de inclusión, proporcionaron las muestras sanguíneas y fecales. Además, no fueron dados de baja por los criterios de eliminación, y mantuvieron la adherencia al consumo de la cerveza.

Fase II: Realizar la intervención con cerveza

Se proporcionó durante 30 días cerveza una cerveza con alcohol o sin alcohol de 355 mL a los participantes para que la consuman junto con la comida. Los participantes proporcionaron las muestras sanguíneas y fecales los días 1, 15 y 30, a las que se les realizaron los análisis bioquímicos, y de la microbiota intestinal. A todos se les pidió que mantuvieran el mismo estilo de vida durante todo el estudio.

Fase III: Analizar los componentes de la cerveza

Se desgasificó una muestra de cerveza para concentrar los componentes fenólicos y poder analizarlos mediante un Sistema LC Agilent 1260 Infinity II acoplado al sistema de espectrómetro de masas LC-MS de triple cuadrupolo Agilent 6420 en una columna de fenilo Ascentis® de 25 cm x 4,6 mm, 5 µm. Usando energía de fragmentación de 135 eV en las moléculas favoreciendo su ionización y posterior análisis usando el modo de exploración de 100 a 1000 m/z.

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

Se determinó una curva de calibración con los tiempos de retención de los estándares de AGCC usando un HPLC PerkinElmer™; para cuantificar la concentración de AGCC mediante la regresión lineal, con los tiempos de retención de los ácidos grasos de las muestras.

Fase V: Generar una genoteca de amplicones de la región V3 del gen 16S ribosomal

Se extrajo el DNA de 100 mg de heces usando el kit de heces Favor prep, para amplificar la región V3 usando los primers V3-341F y V3-518R, así obtener un amplicón de ~ 281 pb, con los que finalmente se generan las genotecas usando cantidades iguales de cada amplicón, del barcode 1 al 50.

Fase VI: Secuenciación masiva de genotecas región V3 del gen 16S ribosomal de la microbiota intestinal

La secuenciación de las genotecas fue mediante Ion OneTouch 2, Ion PGM Template OT2 200 Kit v2 DL, Ion 318 Chip Kit v2 y Ion Torrent PGM System, a los archivos de salida (FASTQ) se les analizó la calidad de la secuenciación para poder realizar el corte de bases a 200 nt, y poder concatenarlos a un solo archivo con el que se compara con la base de datos de Greengenes v13.8.

Fase VII: Análisis de datos

Se realizaron las pruebas estadísticas mediante la prueba de rango con signos de Wilcoxon o la prueba T de muestras pareadas, para todas las características clínicas, incluidos los parámetros antropométricos, la bioquímica de la sangre, el perfil de lípidos, el análisis de AGCC y la microbiota intestinal. Los archivos de secuenciación se analizaron usando el pipeline de QIIME (v1.9.0) OTUs picking (unidades taxonómicas operativas) contra la base de datos Greengenes (v13.8). El análisis bioinformático se realizó en el entorno R (v3.4.4). Las imágenes se trazaron usando los paquetes ggplot2 (v3.1.0) y RcolorBrewer (v1.1-2). Para corregir los valores p, se realizaron múltiples pruebas (Benjamini & Hochberg,

1995) utilizando la función `p.adjust()` en R (v3.4.4) para evitar la inclusión de falsos positivos, incluida la abundancia relativa bacteriana, LEfSe (v1.0) , MaAsLin (v0.0.4), PICRUST (v1.1.2) y análisis de co-ocurrencia. La diversidad bacteriana intestinal (diversidad alfa) se evaluó con los paquetes phyloseq (v1.22.3) y ggplot2 (v3.1.0).

8.2 Diseño experimental

El estudio se dividió en dos fases: Fase 1 (30 días, noviembre-diciembre de 2016), los 35 participantes consumieron, una lata de cerveza sin alcohol (CSA), 355 ml, tipo "Lager", hasta 0.5% de alcohol (NOM-199-SCFI-2017), durante la comida principal. Después de 5 meses, Fase 2 (30 días, mayo de 2017), 33 participantes consumieron el contenido de una lata de cerveza con alcohol (CCA), 355 ml, tipo "Lager", hasta 4.9% de alcohol durante la comida principal. En esta fase 14 participantes de la Fase 1, continuaron con el estudio de la Fase 2. En ambas fases, cada participante proporcionó 3 muestras diferentes sanguíneas y fecales, en el día 1, 15 y 30. A todos los participantes se les pidió que mantuvieran el mismo estilo de vida durante todo el estudio.

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) para la fase 1, y 33 individuos sanos (15 mujeres y 18 hombres) para la fase 2, de 21 a 55 años, a partir de una invitación abierta dentro del Cinvestav, unidad Zacatenco.

Criterios de selección del estudio

Los criterios de inclusión para participar fueron estar sanos, dispuestos a beber cerveza la cerveza correspondiente y proporcionar muestras sanguíneas y fecales. Los criterios de exclusión fueron enfermedad gastrointestinal, hígado disfuncional, enfermedades crónicas, embarazo, alergias, consumo de cualquier suplemento, antiinflamatorio oral, metformina o tratamiento hormonal, consumo de

antibióticos o probióticos en los 3 meses anteriores. Los criterios de eliminación fueron desarrollo de hígado disfuncional, consumo de antibióticos o probióticos, y no adherencia al consumo de cerveza. El protocolo de este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética (registro 037/2016).

Variables

Las variables para medirse fueron los parámetros antropométricos, perfil hepático y lipídico, ácidos grasos de cadena corta junto las abundancias relativas de la microbiota intestinal.

Análisis estadístico

Todas las variables obtenidas, valores antropométricos, perfil hepático y lipídico, ácidos grasos de cadena corta y las abundancias relativas de la microbiota, se analizaron estadísticamente mediante la prueba de rango con signos de Wilcoxon y la prueba T de muestras pareadas.

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 (registro 037/2016) y acuerdo a la declaración de Helsinki año 2000.

9. RESULTADOS

Resultados del objetivo específico 1. *Reclutar los 90 individuos sanos para realizar una valoración mediante parámetros antropométricos, datos clínicos y estudios bioquímicos.*

Para conseguir el número de participantes, se hizo abierta a la comunidad del Cinvestav a participar en el proyecto, después de aplicar los criterios de inclusión/exclusión, finalmente quedaron 35 participantes para consumir cerveza

sin alcohol (21 hombres y 14 mujeres), y 33 participantes en cerveza con alcohol (18 hombres y 15 mujeres). Todos los participantes 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 (registro 037/2016).

Los valores antropométricos medidos fueron: peso, altura, índice de masa corporal, cintura, cadera, índice cintura/cadera, presión cardiaca, mientras que las muestras sanguíneas se mandaron a analizar a un laboratorio clínico particular para realizar los análisis de glucosa, insulina, el índice HOMA/IR, células β funcionales, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad, índice aterogénico, bilirrubinas, transaminasas, fosfatasa alcalina, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular (Tablas 3 y 4). Valores antropométricos y clínicos medidos únicamente en los participantes del estudio de cerveza con alcohol; Porcentaje de musculo, porcentaje de grasa, grasa visceral, gasto energético basal, Hemoglobina A1c (Tabla 4).

La conclusión del objetivo 1 indica el número de individuos que participan en el proyecto, 35 participantes para consumir cerveza sin alcohol (21 hombres y 14 mujeres), y 33 participantes en cerveza con alcohol (18 hombres y 15 mujeres), los cuales son aptos para participar sin que les afecte en la salud.

Resultados del objetivo específico 2. *Hacer una intervención con cerveza con y sin alcohol en la dieta de los participantes, colectando muestras sanguíneas y fecales los días 1, 15 y 30 del estudio.*

Una vez pasados los criterios de inclusión/exclusión los participantes recibieron diariamente durante 30 días su cerveza correspondiente, y los días 1, 15 y 30 proporcionaron muestras sanguíneas y fecales. El consumo moderado de una lata (355 ml / día) de cerveza sin alcohol (CSA) o cerveza con alcohol (CCA), en este estudio no afectó negativamente a las variables antropométricas como el peso, la cintura y el tamaño de la cadera (Tablas 3 y 4). Las presiones sanguíneas sistólica

y diastólica se mantuvieron dentro del rango normal entre los participantes, sin embargo, aunque en límites normales, la presión arterial diastólica aumentó significativamente entre los participantes que bebían CCA (Tabla 4).

En cuanto a las variables clínicas, el consumo de cerveza si tiene un efecto moderado en algunas de ellas. En el caso de los parámetros de bioquímica sanguínea, la CSA disminuyó los niveles de glucosa en ayunas con significancia estadística, y hubo una tendencia a la reducción de la resistencia a la insulina; Además, hubo un aumento significativo en el porcentaje de células β funcionales en el páncreas (Tabla 3). En comparación, el consumo de CCA no trajo beneficios comparables para los parámetros bioquímicos de la sangre; la glucosa en ayunas aumentó significativamente, aunque en el rango normal, y el porcentaje de células β funcionales disminuyó significativamente (Tabla 4). Para el caso del perfil lipídico, la CSA no cambió estos parámetros (Tabla 3), sin embargo, la CCA disminuye significativamente el nivel de HDL en suero después de 30 días de consumo y aumenta el índice aterogénico del plasma, aunque dentro del rango normal (Tabla 4). Durante el consumo de CSA, después de 30 días, los participantes mostraron una disminución significativa en las transaminasas de alanina y aspartato, que no se observó con el consumo de CCA; sin embargo, esta cerveza aumentó significativamente los valores de bilirrubina directa. Los perfiles de inflamación no mostraron cambios para la proteína C reactiva en ambas cervezas (Tablas 3 y 4), y hubo una disminución significativa en la velocidad de sedimentación globular después de 30 días de consumo de CCA (Tabla 4).

La conclusión del objetivo 2 indica que una ingesta de una lata de 355 mL cerveza lager durante 30 días no favorece el aumento de peso ni alguna variable antropométrica, no altera los valores de perfil hepático y lipídico, sin embargo, se encontró que puede bajar los niveles de glucosa y aumentar el porcentaje de células β funcionales en el caso de CSA; mientras que el consumo de CCA aumentó los niveles de glucosa y disminuyó el porcentaje de células β funcionales; en ambos casos manteniéndose dentro de los valores normales.

Tabla 3. Variables cuantificadas durante la intervención de cerveza sin alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Día 1	Día 30	p-value ^a
Participantes (Masculino/Femenino)	35 (21/14)	35 (21/14)	ND
Edad (años)	28.77 ± 7.75	28.77 ± 7.75	ND
Peso (Kg)	69.60 ± 15.51	68.85 ± 15.50	0.68
Altura (m)	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	0.97
IMC (Kg/m ²)	24.85 ± 4.08	24.59 ± 4.10	0.79
Cintura	82.96 ± 12.03	81.96 ± 12.08	0.75
Cadera	89.61 ± 9.05	89.33 ± 10.04	0.80
ICC	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.05	0.60
Presión sistólica (mmHg)	113.20 ± 10.99	109.66 ± 11.15	0.20
Presión diastólica (mmHg)	72.74 ± 7.92	71.29 ± 7.77	0.48
Pulso	69.34 ± 11.14	72.51 ± 10.04	0.24 ^b
Bioquímica sanguínea			
Glucosa (70-99 mg/dL)	86.49 ± 5.95	78.51 ± 7.64	****<0.01 ^b
Insulina (2.7-10.4 µU/mL)	10.52 ± 9.42	9.70 ± 4.16	0.74
HOMA/ IR (< 3)	2.28 ± 2.10	1.90 ± 0.89	0.51
CβF (%)	161.40 ± 129.50	271.30 ± 268.40	**<0.01
Perfil lipídico			
Colesterol (<239 mg/dL)	197.63 ± 32.80	197.14 ± 35.11	0.79
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	133.90 ± 114.40	134.70 ± 89.60	0.68
HDL (> 40 mg/dL)	48.69 ± 9.07	49.20 ± 9.52	0.81 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	123.10 ± 31.42	123.61 ± 32.75	0.99
VLDL (10-40 mg/dL)	25.99 ± 21.77	24.46 ± 18.84	0.65
IAP (3-5)	4.24 ± 1.23	4.20 ± 1.24	0.79
Perfil hepático			
Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	0.84 ± 0.36	0.85 ± 0.42	0.43
Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	0.28 ± 0.09	0.27 ± 0.11	0.52
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.54 ± 0.27	0.58 ± 0.31	0.28
ALT (< 55 U/L)	24.94 ± 13.63	23.89 ± 15.13	*0.04
AST (5-34 U/L)	24.43 ± 8.11	22.71 ± 6.78	*0.03
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	78.14 ± 23.43	78.63 ± 19.93	0.32
Perfil de inflamación			
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	1.64 ± 1.65	3.32 ± 8.07	0.80
VSG (< 30 mm/H)	2.43 ± 1.31	3.29 ± 3.55	0.26

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon^a, excepto para la prueba T de muestras pareadas^b. Los valores p <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01 y **** indica p≤0.0001.

Tabla 4. Variables cuantificadas durante la intervención de cerveza con alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Día 1	Día 30	p-value ^a
Participantes (Masculino/Femenino)	33 (18/15)	33 (18/15)	ND
Edad (años)	29.70 ± 9.25	29.70 ± 9.25	ND
Peso (Kg)	67.68 ± 17.50	67.67 ± 15.94	0.67
Altura (m)	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	1.00
IMC (Kg/m ²)	23.67 ± 4.57	23.89 ± 4.15	0.47
Cintura	80.41 ± 12.11	81.20 ± 12.39	*0.02 ^b
Cadera	87.63 ± 10.52	87.36 ± 10.79	0.52
ICC	0.92 ± 0.05	0.93 ± 0.06	**0.01 ^b
Presión sistólica (mmHg)	113.32 ± 16.24	112.11 ± 10.96	0.58 ^b
Presión diastólica (mmHg)	68.41 ± 9.48	71.84 ± 11.19	**<0.01
Pulso	72.11 ± 12.47	72.07 ± 7.60	0.99 ^b
Porcentaje de músculo (%)	31.16 ± 6.07	31.86 ± 5.85	0.39
Porcentaje de grasa (%)	28.37 ± 7.09	27.62 ± 6.70	0.16 ^b
Grasa visceral (%)	6.46 ± 4.29	6.48 ± 3.95	0.41
GEB (cal)	1476 ± 267	1503 ± 281	0.14
Bioquímica sanguínea			
Glucosa (70-99 mg/dL)	77.57 ± 4.44	84.55 ± 4.87	****<0.01 ^b
Insulina (2.7-10.4 µU/mL)	7.07 ± 2.97	7.16 ± 4.18	0.75
HOMA/ IR (< 3)	1.34 ± 0.52	1.49 ± 0.83	0.20
CβF (%)	224.19 ± 262.37	116.17 ± 93.74	****<0.01
Hemoglobina A1c (4-6 %)	4.98 ± 0.23	4.97 ± 0.24	0.59
Perfil lipídico			
Colesterol (<239 mg/dL)	186.85 ± 35.42	182.79 ± 36.58	0.19
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	121.12 ± 57.09	124.36 ± 53.88	0.61
HDL (> 40 mg/dL)	52.82 ± 12.07	49.90 ± 11.20	**<0.01 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	116.64 ± 31.36	119.06 ± 34.29	0.44
VLDL (10-40 mg/dL)	24.22 ± 11.42	24.87 ± 10.78	0.61
IAP (3-5)	3.71 ± 1.06	3.86 ± 1.20	*0.03
Perfil hepático			
Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	2.55 ± 9.79	0.92 ± 0.49	0.14
Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	0.27 ± 0.11	0.33 ± 0.15	**<0.01
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.57 ± 0.46	0.59 ± 0.34	0.11
ALT (< 55 U/L)	21.94 ± 12.39	21.97 ± 14.04	0.39
AST (5-34 U/L)	23.76 ± 5.53	24.21 ± 10.13	0.18
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	69.36 ± 17.25	68.94 ± 17.57	0.34
Perfil de inflamación			
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	1.17 ± 2.23	2.40 ± 3.10	0.54
VSG (< 30 mm/H)	4.33 ± 3.24	2.64 ± 1.39	**<0.01

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; GEB, Gasto energético basal; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon³, excepto para la prueba T de muestras pareadas⁵. Los valores p <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01 y **** indica p≤0.0001.

Resultados del objetivo específico 3. *Analizar los componentes de la cerveza con y sin alcohol, mediante espectrometría de masas de alta resolución.*

La cerveza contiene diversos compuestos polifenólicos, los cuales fueron identificados mediante un análisis de espectrometría de masas de alta resolución usando el equipo ESI-QqQ-MS, en la cerveza sin alcohol (CSA) y cerveza con alcohol (CCA) usadas en este estudio. Los cromatogramas de HPLC de iones totales obtenidos en el proceso (Figura 7) proporcionaron al menos nueve picos para la CSA y diez picos para la CCA, estos picos se fragmentaron aún más en diversas moléculas (Figuras S1 y S2, Anexo 3). La identificación de los picos en los fragmentogramas reveló una gran diversidad de ácidos fenólicos (Tablas S3 y S4, Anexo 2). Los compuestos más importantes identificados en ambas cervezas fueron: Catequina, 8-prenilnaringenina, Isoxantohumol, Catequina-O-hexosido I y II, n-Humulona, Ácido Hydroxyfenil acético I y II, Apigenina-C-hexosido y Pentunidin-3-glucósido (Figura 8).



Figura 7. Cromatograma de iones totales de la cerveza sin alcohol y cerveza con alcohol. Las figuras muestran 9 picos para cerveza sin alcohol (A) y 10 picos para cerveza con alcohol (B). Eje Y, iones totales en cada pico y eje X, muestra el tiempo de adquisición (min).

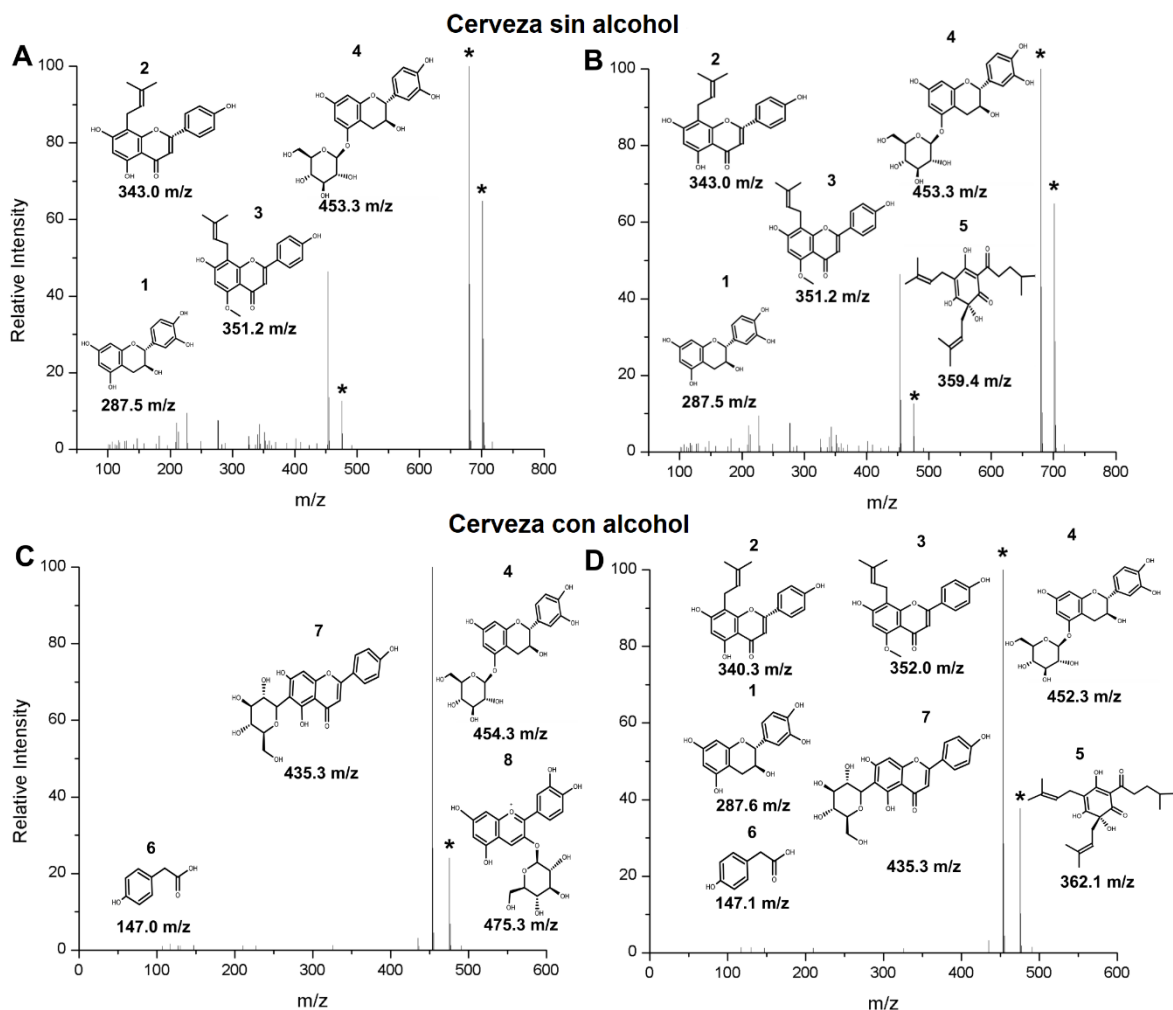


Figura 8. Análisis de espectrometría de masas de alta resolución de cerveza sin alcohol y cerveza con alcohol. La figura muestra fragmentogramas seleccionados (m/z) para los picos 8 y 9 de cerveza sin alcohol 8 (A) y 9 (B) y los picos 9 y 10 de cerveza alcohólica 9 (C) y 10 (D). El eje Y muestra el porcentaje de abundancia relativa de los compuestos fragmentados en el pico correspondiente y el eje X muestra la relación masa-carga (m/z). Las moléculas de compuestos representativos se muestran junto a los valores m/z correspondientes. Los compuestos se identifican por número: [1] Catequina; [2] 8-prenilnaringenina; [3] isoxantohumul; [4] Catequina-O-hexósido I, II; [5] n-humulona; [6] Ácido hidroxifenil acético I, II; [7] Apigenina-C-hexósido, y [8] Pentunidina-3-glucósido. *, fragmento no identificado. Las imágenes completas de fragmentogramas y las listas completas de compuestos se muestran en los Anexo 2 (Tablas S4 y S5) y Anexo 3 (Figuras S1, S2).

La conclusión del objetivo 3 indica que ambas cervezas tienen una composición de polifenoles muy similar.

Resultados del objetivo específico 4. *Cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta (propionato, butirato y acetato) en muestras fecales y determinar*

componentes fenólicos por medio de cromatografía líquida de alta resolución en sueros sanguíneos.

De las muestras fecales se usó una alícuota de cada participante del día 1, 15 y 30 para desecarse hasta llevarse a peso constante (15 días aproximadamente), posteriormente se concentraron los AGCC resuspendiendo las muestras en agua grado HPLC, y posteriores centrifugaciones para finalmente concentrar muestras con columnas de c18 que retienen los AGCC y finalmente se eluyeron con etanol al 96% grado HPLC, los AGCC de interés fueron acetato, propionato y butirato (Figuras 9 y 10; y Anexo 6).

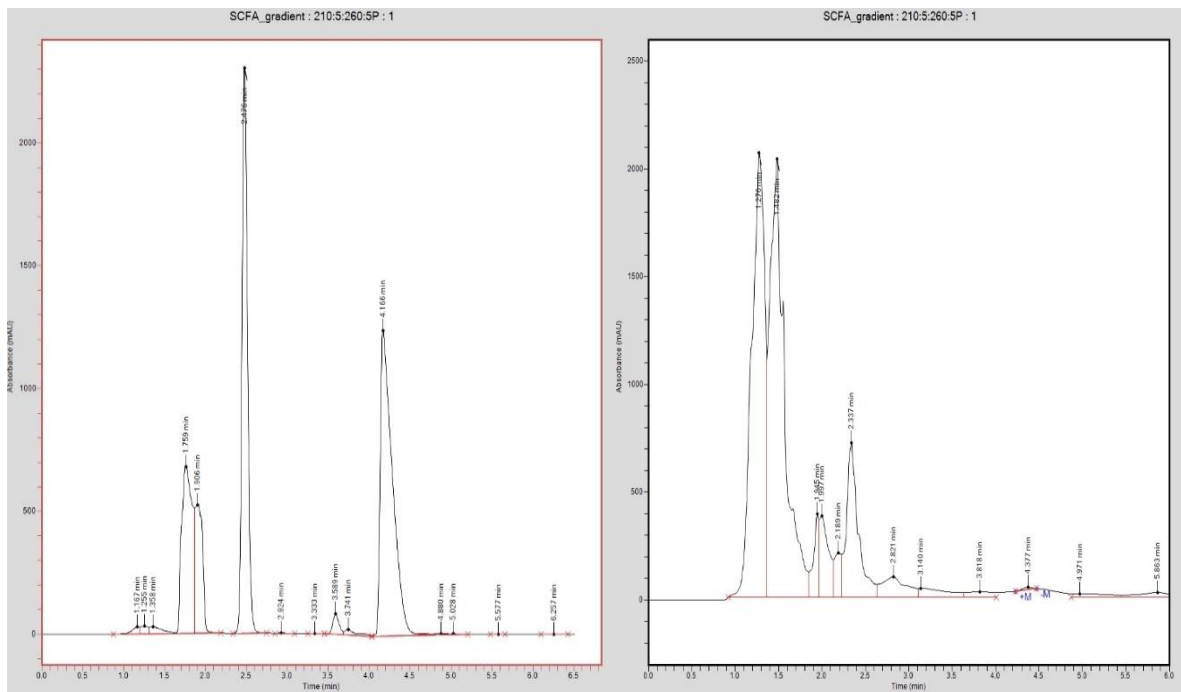


Figura 9. Cromatograma de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante el consumo de cerveza sin alcohol. Estándares de AGCC a 500 mM (izquierda) y en muestra de heces (derecha). Tiempo de retención de los AGCC, ácido acético (1.75 min), ácido propiónico (2.42 min) y ácido butírico (4.3).

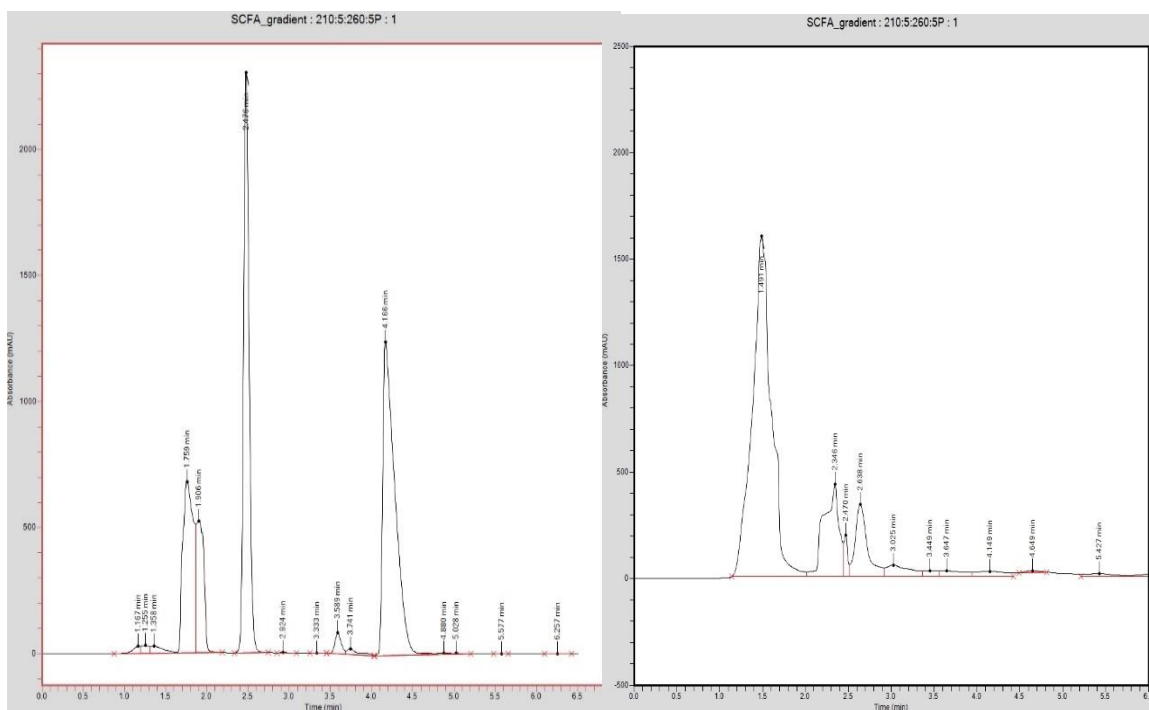


Figura 10. Cromatograma de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante el consumo de cerveza con alcohol. Estándares de AGCC a 500 mM (izquierda) y en muestra de heces (derecha). Tiempo de retención de los AGCC, ácido acético (1.75 min), ácido propiónico (2.42 min) y ácido butírico (4.3 min).

La cuantificación de los ácidos acético, propiónico y butírico en las muestras del día 1 y el día 30 durante la intervención de las cervezas con alcohol y sin alcohol no mostraron ninguna diferencia significativa (Tabla 5)

Tabla 5. Ácidos grasos de cadena corta durante la intervención de cerveza.

Cerveza sin alcohol	Día 1	Día 30	<i>p</i> -value
Ácido acético (mM/100mg)	191.30 ± 93.53	219.90 ± 110.02	0.26
Ácido propiónico (mM/100mg)	25.65 ± 27.26	22.80 ± 19.16	0.59
Ácido butírico (mM/100mg)	12.31 ± 5.55	11.36 ± 5.97	0.35
Cerveza con alcohol	Día 1	Día 30	<i>p</i> -value
Ácido acético (mM/100mg)	414.64 ± 177.64	432.73 ± 155.43	0.48
Ácido propiónico (mM/100mg)	48.57 ± 30.70	54.27 ± 28.79	0.39
Ácido butírico (mM/100mg)	11.87 ± 10.73	10.91 ± 5.46	0.75

Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de *p* se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon. Los valores *p* <0.05 se consideran estadísticamente significativos.

Para tener evidencia del apego de los participantes al consumo de la cerveza se realizó una extracción de los componentes de la cerveza tanto de las muestras de cerveza y de los sueros de los participantes, se resuspendieron en metanol y se analizaron mediante el HPLC (Figuras 11 y 12; y Anexo 7).

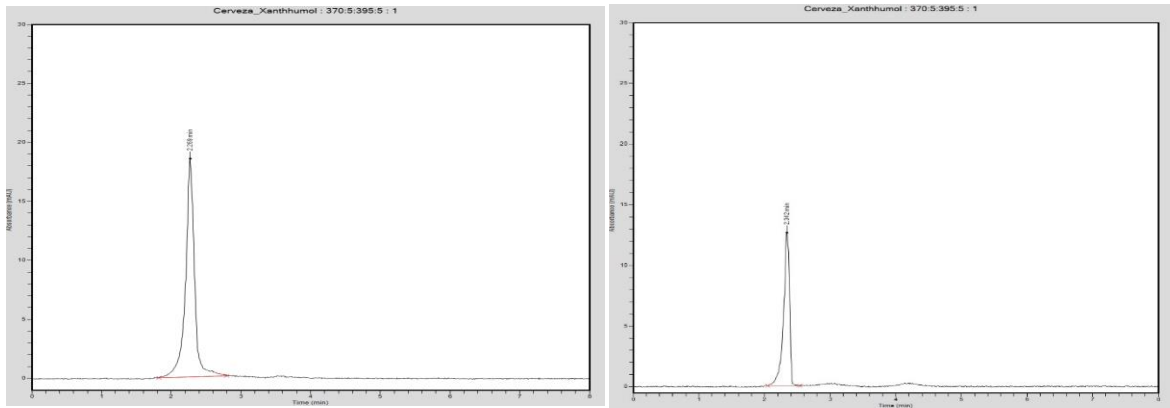


Figura 11. Cromatograma de los componentes de la cerveza durante el consumo de cerveza sin alcohol. Cerveza sin alcohol (izquierda) y en muestra de suero (derecha).

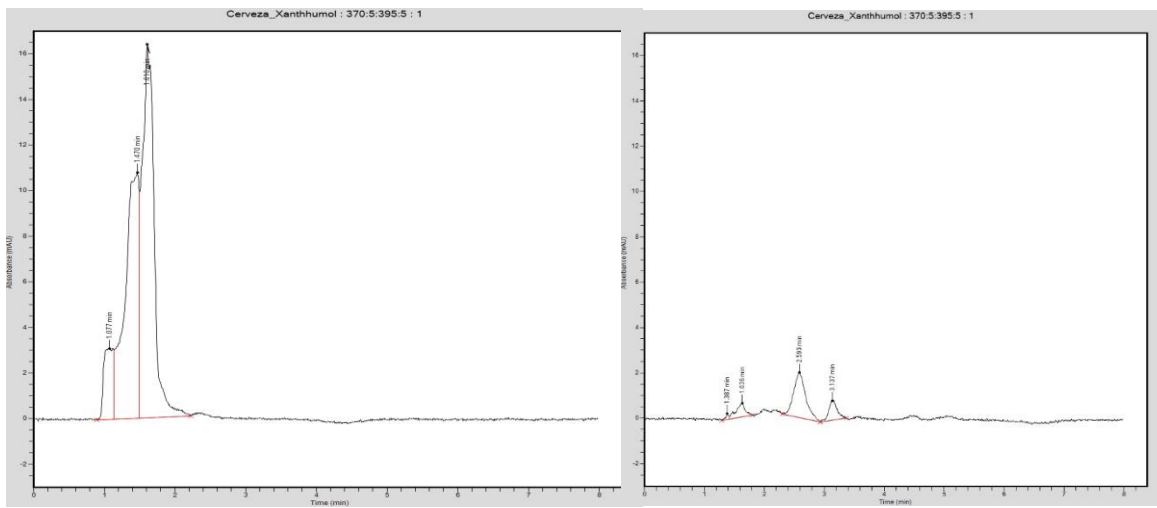


Figura 12. Cromatograma de los componentes de la cerveza durante el consumo de cerveza con alcohol. Cerveza con alcohol (izquierda) y en muestra de suero (derecha).

La conclusión del objetivo 4 indica que la concentración de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) no presentan ningún cambio en ninguna cerveza (Tabla 5), además, los participantes tuvieron apego al consumo de la cerveza.

Resultados del objetivo específico 5. *Generar genoteca de amplicones de la región V3 del gen 16S ribosomal usando DNA de las muestras fecales de los participantes.*

A partir del DNA genómico obtenido de las muestras fecales se amplificó la región V3 del gen 16 S ribosomal (Figura 13), se tomaron volúmenes para agregar de forma equitativa cada producto de amplicón midiendo la intensidad de las bandas de cada amplicón mediante el sistema de foto-documentación Molecular Imager® Gel Doc™ XR Bio-Rad (Anexos 4 y 5).

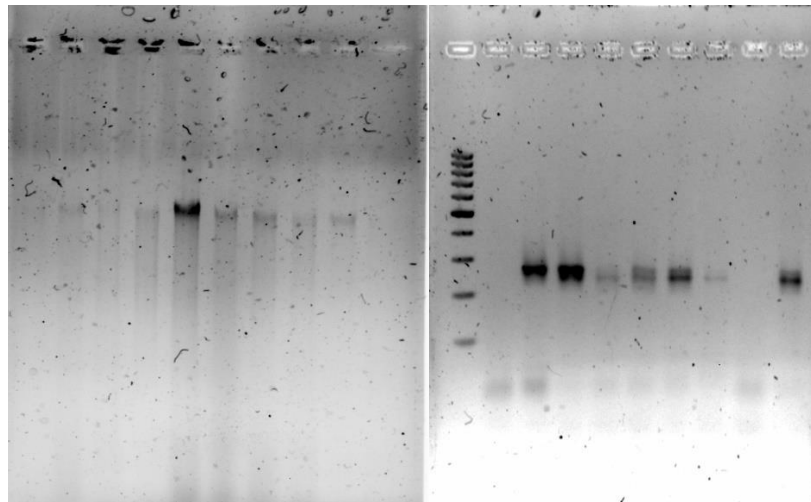


Figura 13. Geles de agarosa con DNA genómico y producto de PCR. Gel de agarosa al 0.5 % para DNA genómico (Izquierda) y gel de agarosa al 2 % para productos de PCR de la región V3 del gen 16S ribosomal con barcodes (Derecha).

La conclusión del objetivo 5 indica que se tienen los amplicones necesarios y en concentración suficiente para poder preparar las genotecas.

Resultados del objetivo específico 6. *Realizar secuenciación masiva de las genotecas de la región V3 del gen 16S ribosomal para caracterizar la microbiota.*

Una vez preparadas las genotecas a partir de todos los amplicones de la región V3 del gen 16 S ribosomal se procesaron mediante la secuenciación masiva

semiconductora de iones con ayuda de un Ion Torrent, donde se obtuvieron los archivos FASTQ de los cuales se obtuvieron alrededor de 6 millones de lecturas, para amplicones de al menos 175 pb con más de 10,000 lecturas, y alrededor de 10,000 OTUs con más de 5 millones de counts (Tabla 6).

Todos los archivos FASTQ están disponibles en (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP158634>).

La conclusión del objetivo 6 indica que se tienen los archivos de secuenciación tienen la suficiente calidad para realizar los análisis bioinformáticos.

Tabla 6. Resumen de la secuenciación después del corte[#]

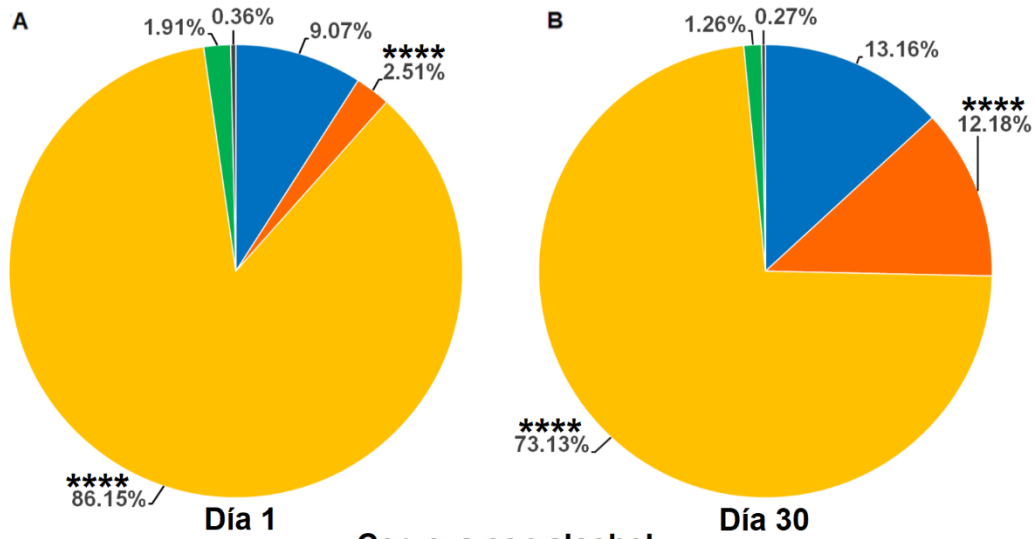
Parámetro	Cerveza sin alcohol (n= 70)	Cerveza con alcohol (n = 66)
Número de lecturas	6'038,423	5'640,575
Longitud promedio ^a	175 bp (3.20) ^b	178 bp (3.97) ^b
Lecturas promedio ^a	88,800	85,463
Lecturas min–max ^a	11,411-369,880	1,056- 249,675
OTUs identificados	10,800	9,772
Total de counts de OTUs	5'930,034	5'241,492
Muestras <10,000	0	1

[#]Las lecturas se analizaron con el software FastQC v0.11.9 y se recortaron a 200 nt con Trimmomatic v0.38. ^a Longitud expresada como bases, ^b Desviación estándar, para todas las muestras.

Resultados del objetivo específico 7. *Evaluar una asociación entre los cambios en la diversidad de la microbiota con el consumo moderado de cerveza con y sin alcohol.*

El consumo de cerveza cambia la abundancia relativa de las Phyla bacterianas intestinales el consumo de cerveza sin alcohol mostró un aumento estadísticamente significativo del phylum de los bacteroidetes de ($p < 0.0001$, $q < 0.0001$), y una disminución de los Firmicutes ($p < 0.0001$, $q < 0.0001$) (Figura 14A-B, Tabla 7). Se obtuvieron resultados similares para el estudio cerveza con alcohol realizado después de 5 meses. En este caso, también se observó un aumento en Bacteroidetes ($p < 0.01$, $q = 0.03$) y una disminución en Firmicutes ($p < 0.01$, $q = 0.04$) (Figura 14C-D, Tabla 7) No se observaron cambios significativos en la abundancia relativa de Proteobacteria ni de Actinobacteria en ninguna cerveza.

Cerveza sin alcohol



Cerveza con alcohol

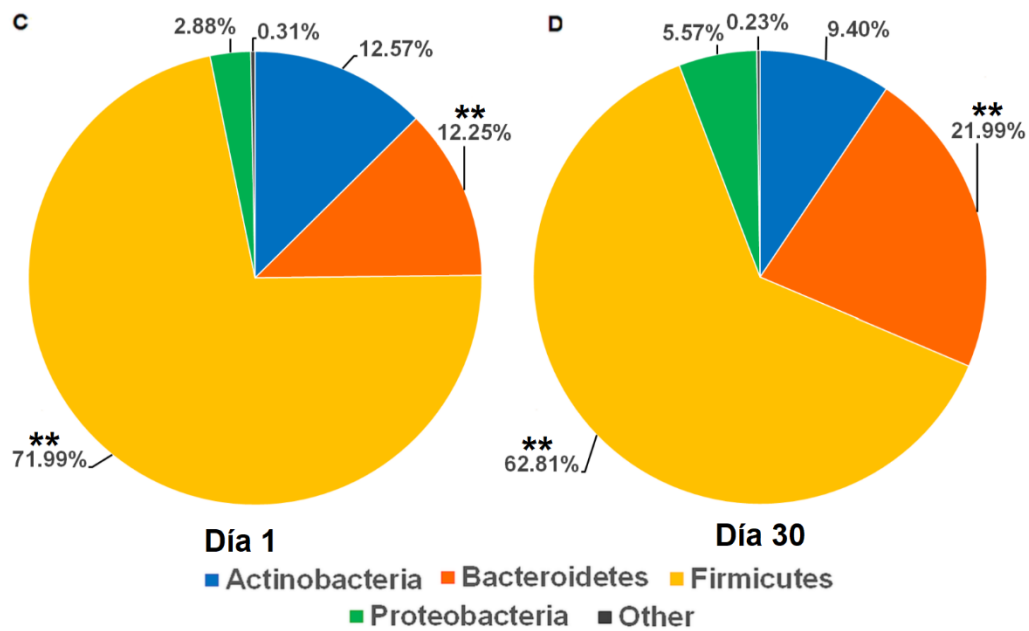


Figura. 14. Phyla bacterianas fecales durante el consumo moderado de CSA y CCA. Las abundancias relativas de cada phylum se muestran como porcentaje (%) al lado de los gráficos circulares. Los colores de la etiqueta para Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria phyla se muestran en la parte inferior de la figura. "Other" indica un grupo de phyla con abundancias relativas de menos del 0,72% cada uno (Acidobacterias, Cianobacterias, Fusobacterias, Tenericutes y Verrucomicrobia). Las abundancias relativas se muestran para el día 1 (**A**) y el día 30 (**B**) para CCA, y el día 1 (**C**) y el día 30 (**D**) para CCA. * indica $p \leq 0.05$, ** indica $p \leq 0.01$ y **** indica $p < 0.0001$ (Tabla 7).

Tabla 7. Abundancia relativa de Phyla bacterianos intestinal durante el consumo moderado de cerveza.

Bacteria	Day 1	Day 30	p-value	q-value
Cerveza sin alcohol				
Actinobacteria	9.07 ± 9.63	13.16 ± 13.20	*0.04	0.32
Bacteroidetes	2.51 ± 2.78	12.28 ± 11.50	****<0.01	****<0.01
Firmicutes	86.15 ± 8.70	73.13 ± 14.88	****<0.01	****<0.01
Proteobacteria	1.91 ± 2.91	1.26 ± 1.54	0.72	1.00
Cerveza con alcohol				
Actinobacteria	12.57 ± 10.41	9.40 ± 8.74	0.20	1.00
Bacteroidetes	12.25 ± 12.75	21.99 ± 17.62	**<0.01	0.03
Firmicutes	71.99 ± 14.65	62.81 ± 16.99	**<0.01	0.04
Proteobacteria	2.88 ± 3.96	5.57 ± 13.54	0.35	1.00

Los datos muestran el % de abundancia relativa de cada Phylum bacteriano (± DE), en los días 1 y 30 de consumo moderado de cerveza como se indica (ver Figura 14). Los valores de p se calcularon usando la prueba de rango con signo de Wilcoxon; False Discovery Rate (FDR) (q-value) se calcularon utilizando el método Benjamini-Hochberg. Los valores de p y q <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p ≤ 0.05 ** indica p ≤ 0.01 y **** indica p ≤ 0.0001.

El consumo moderado de cerveza sin alcohol aumenta significativamente la diversidad alfa de la microbiota intestinal, según lo definido por los índices Chao1 y Shannon (Figura 15A, Tabla 8); sin embargo, no se obtuvo el mismo resultado para la cerveza con alcohol (Figura 15B); En cuanto a la diversidad beta, el consumo de cerveza sin alcohol durante 30 días cambió significativamente la agrupación de la diversidad beta para los individuos en el día 1 y el día 30 (Figura 15C); este efecto no se observó para el caso del consumo de cerveza con alcohol (Figura 15D).

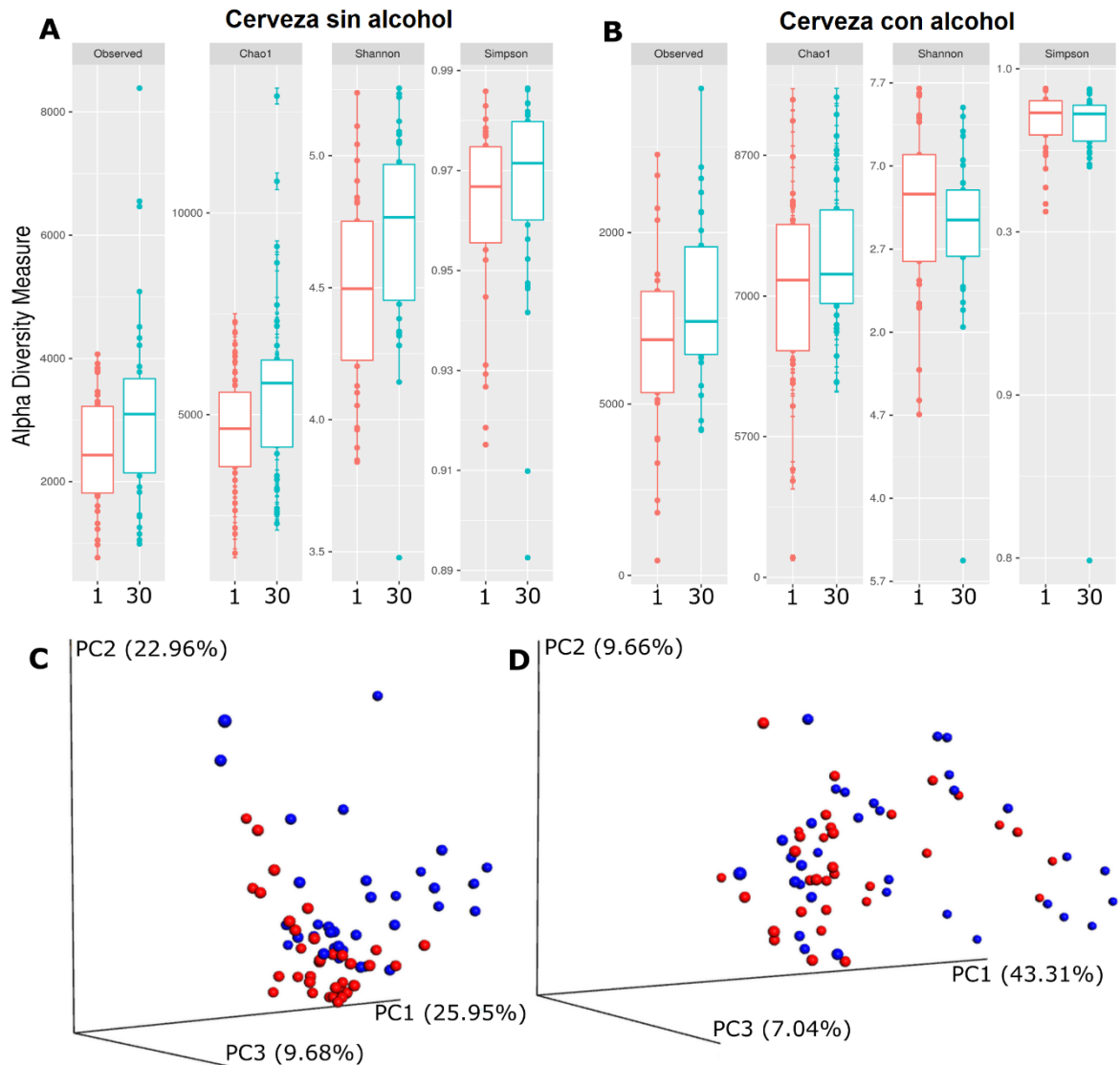


Figura. 15. Diversidad de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza. La parte superior de la figura muestra análisis de diversidad alfa para CSA (**A**) y CCA (**B**). Los gráficos muestran datos para la riqueza bacteriana observada y esperada (Chao1) y los índices de diversidad de Shannon y Simpson. Los números debajo de los ejes X indican el día 1 y el día 30, (Tabla 8). La parte inferior de la figura muestra análisis de diversidad beta para CSA (**C**) y CCA (**D**) calculados mediante métricas de disimilitud utilizando la tabla de OTUs y análisis unweighted UniFrac. Los análisis muestran la diferencia entre el día 1 (color rojo) y el día 30 (color azul). Se generaron gráficos de dispersión tridimensionales utilizando el análisis de coordenadas principales (PCoA) en tres ejes diferentes que muestran el porcentaje de las diferencias totales. Los valores p y r se calcularon usando el método ANOSIM para comparar las diversidades beta usando una matriz de distancia como el archivo de entrada y el archivo con la información de las muestras (mapping file). CSA (día 1 vs día 30) presentan diferencias significativas ($p = 0.001$) (**C**); y CSA (día 1 vs día 30) no presentan diferencias significativas ($p = 0.054$) (**D**).

Tabla 8. Índices de diversidad de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza.

Índice	Día 1	Día 30	p- value
Cerveza sin alcohol			
Observed	2505.29 ± 915.67	3197.03 ± 1618.44	*0.04
Chao1	4639.56 ± 1459.98	5726.03 ± 2319.74	*0.04
Shannon	4.49 ± 0.37	4.70 ± 0.38	**<0.01
Simpson	0.96 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.11
Cerveza con alcohol			
Observed	2695.81 ± 1071.01	3217.76 ± 935.94	0.11
Chao1	5118.86 ± 1786.77	5725.86 ± 1326.97	0.33
Shannon	4.72 ± 0.53	4.63 ± 0.49	0.17
Simpson	0.97 ± 0.02	0.96 ± 0.05	0.36

Los datos muestran la media ± desviación estándar como se indica (Figura 15A-B). Los p- value se calcularon usando la prueba de Wilcoxon de rango con signo. Los p- value <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica $p \leq 0.05$ y ** indica $p \leq 0.01$.

Para determinar si los cambios observados se deben a la diferencia de edades de los participantes, se tomaron los índices de la alfa diversidad (Chao1 y Shannon) del día 30 y se restaron a los índices correspondientes al día 1, para obtener el valor de cambio de ambos índices (Δ Chao1 y Δ Shannon); estos valores se graficaron contra las edades de los participantes en orden ascendente para poder observar si hay una tendencia de aumento o decremento con base en la edad de los participantes. Los resultados mostraron que la diversidad de la microbiota intestinal no tiene una tendencia de cambio en relación con la edad como se muestra en los valores de Δ Chao1 y Δ Shannon (Figura 16).

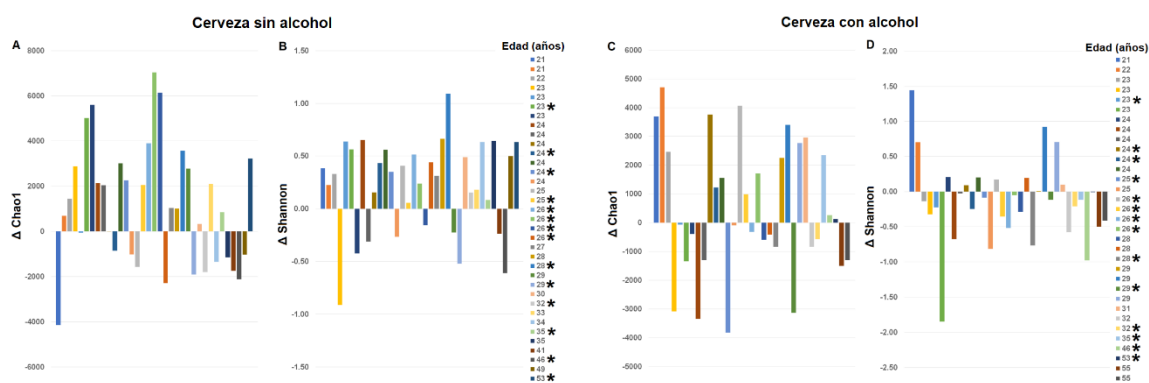


Figura 16. Cambio en la diversidad bacteriana intestinal por participante después de 30 días de consumo moderado de cerveza. Cambio en la diversidad basado en los índices Chao1 (A) y Shannon (B) para CSA; e índices Chao (C) y Shannon (D) para CCA. El cambio en la diversidad se calculó como Δ Chao = (Chao_{día30} – Chao_{día1}) y Δ Shannon = (Shannon_{día30} – Shannon_{día1}). El eje Y muestra Δ Chao o Δ Shannon, y el eje X muestra la edad de los participantes. * Identifica al mismo participante en ambos estudios.

El consumo moderado de cerveza influye en la abundancia relativa de bacterias intestinales específicas, para identificar las bacterias intestinales con cambios estadísticamente significativos en su abundancia relativa después del consumo de cerveza de 30 días, hicimos un análisis LEfSe. Los resultados mostraron 24 bacterias con cambios significativos para el caso de la cerveza sin alcohol, 19 bacterias aumentaron su abundancia en el día 30 ($p \leq 0.01$, $q \leq 0.02$). Entre estas bacterias encontramos la clase Actinobacteria, tres familias Erysipelotrichaceae, Rikenellaceae, Enterobacterias, y quince géneros *Dialister*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Parabacteroides*, *Veillonellas*, *Haemophilus*, *Lactococcus*, *Bacteroides*, *Weissella*, *Phascolarctobacterium*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Sutterella*, *Turicibacter*, y *Lactobacillus* donde el enriquecimiento pasó de ≥ 2 veces a ≤ 4 veces (Figura 17A, Tabla S7, Anexo 2). Por otro lado, identificamos 5 bacterias que eran más abundantes en el día 1 ($p \leq 0.01$, $q \leq 0.02$). Entre estas bacterias encontramos dos órdenes Rhizobiales, Streptophyta, una familia Sphingomonadaceae, dos géneros *Agrobacterium* y *Bulleidia* donde el enriquecimiento pasó de ≥ 2 veces a ≤ 4 veces (Figura 17A, Tabla S7, Anexo 2).

Para el caso de la cerveza con alcohol, los resultados mostraron 15 bacterias con cambios significativos, donde 7 aumentaron su abundancia en el día 30 ($p \leq 0.001$, $q \leq 0.04$). Entre estas bacterias encontramos dos órdenes Bacillales, Aeromonadales, una familia Bacillaceae y cuatro géneros *Bacillus*, *Dysgonomonas*, *Pseudomonas* y *Succinivibrio* donde el enriquecimiento pasó de ≥ 2 veces a ≤ 3 veces (Figura 17B, Tabla S8, Anexo 2). Identificamos 8 bacterias que fueron más abundantes en el día 1 ($p \leq 0.001$, $q \leq 0.04$). Entre estas bacterias encontramos dos clases de Cytophagia, Saprospirae, un Cytophagales de orden, tres familias Sphingomonadaceae, Cytophagaceae, Chitinophagaceae y dos géneros *Lentzea* y *Sphingomonas* donde el enriquecimiento pasó de ≥ 2 veces a ≤ 3 veces (Figura 17B, Tabla S8, Anexo 2).

Exploramos si el cambio en la abundancia relativa de bacterias se reflejó en cambios en las rutas metabólicas predichas usando PICRUSt. Para el caso de

la cerveza sin alcohol, las rutas metabólicas predichas que aumentaron después de 30 días de consumo moderado de cerveza ($p \leq 0.001$, $q \leq 0.04$) fueron metabolismo de galactosa, biosíntesis de lipopolisacárido, proteínas de biosíntesis de lipopolisacárido y biosíntesis de fenilpropanoide. Por otro lado, la abundancia relativa de la ruta de la glicosiltransferasa disminuyó en el mismo período ($p < 0,0001$, $q < 0,001$) (Figura 17C, Tabla 9). No hubo cambios significativos en la abundancia de vías metabólicas después de las correcciones de Benjamini-Hochberg para el caso de la cerveza con alcohol.

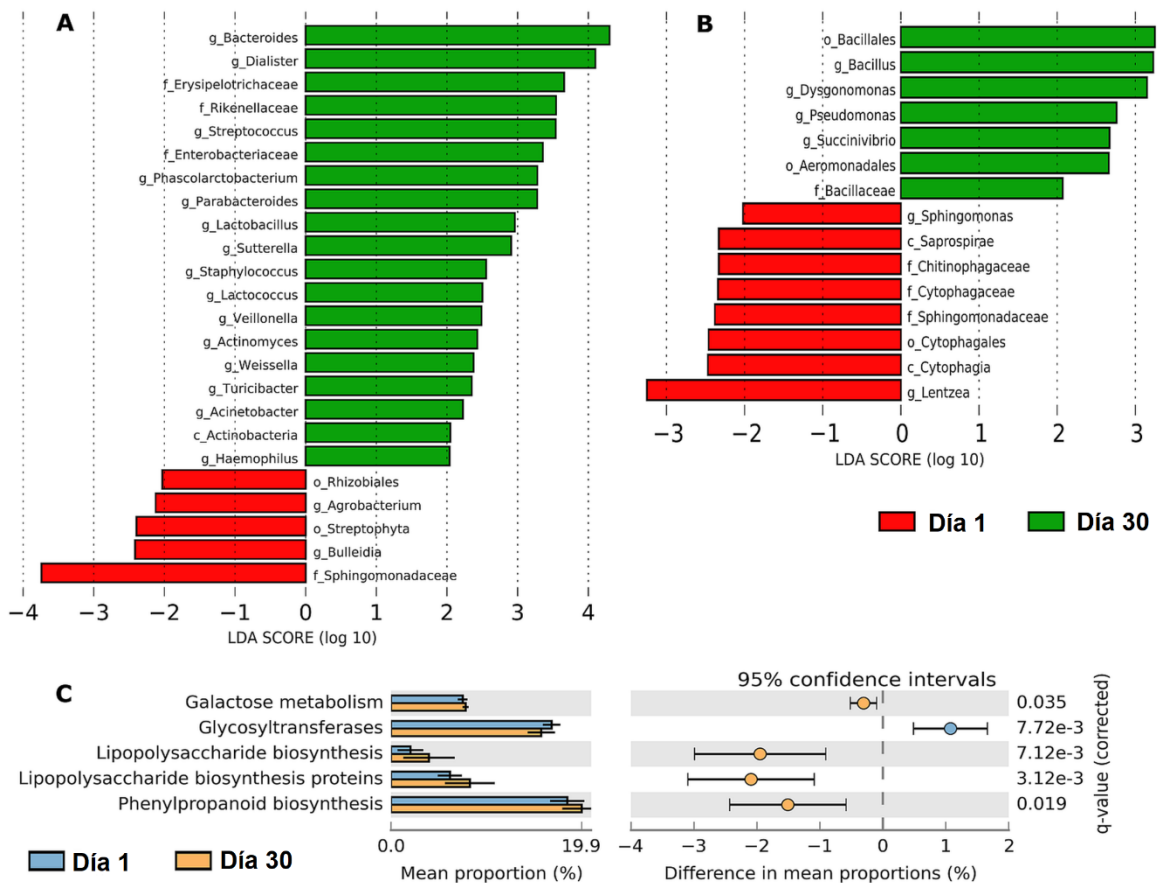


Figura 17. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) de la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza. **(A)** CSA y **(B)** CCA para el día 1 (color rojo) y el día 30 (color verde). Las barras horizontales representan el tamaño del efecto para cada taxón. La longitud de la barra representa la puntuación LDA transformada \log_{10} , indicada por líneas de puntos verticales. El valor mínimo aceptado de LDA se estableció en 2.0. El taxón de bacterias con un cambio estadísticamente significativo en la abundancia relativa se escribe junto a las líneas horizontales. El nombre del nivel de taxón se abrevia como "c", clase; "o", orden; "f", familia, y "g", género. (Tablas S7 y S8, Anexo 2). **(C)** muestra la predicción de las vías metabólicas de la microbiota intestinal utilizando (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) análisis PICRUSt (v1.1.2) durante el consumo de CSA para el día 1 (color azul) y el día 30 (color naranja). Las rutas metabólicas previstas son: metabolismo de galactosa; glicosiltransferasa;

biosíntesis de lipopolisacáridos; proteínas de biosíntesis de lipopolisacáridos; biosíntesis de fenilpropanoide con correcciones de Benjamini-Hochberg ($q < 0.05$), (Tabla 9).

Tabla 9. Predicción de rutas metabólicas de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol.

Ruta metabólica	<i>p</i> - value	<i>q</i> - value
Proteínas de biosíntesis de lipopolisacáridos	****<0.01	***<0.01
Biosíntesis de lipopolisacáridos	****<0.01	***<0.01
Glicosiltransferasas	****<0.01	***<0.01
Biosíntesis de fenilpropanoide	***<0.01	***<0.01
Metabolismo de galactosa	***<0.01	*0.04

Los valores de *p* se calcularon mediante la prueba de Welch; los False Discovery Rate (FDR) (valores *q*) se calcularon utilizando el método Benjamini-Hochberg como se indica (Figura 17C). Los valores de *p* y *q* <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica $p \leq 0.05$ *** indica $p \leq 0.001$ y **** indica $p \leq 0.0001$.

Una vez analizadas las bacterias que se modifican con el consumo moderado de cerveza, se analizaron las interacciones de copresencia y exclusión mutua de la diversidad de la microbiota intestinal. Se analizaron los cambios en las interacciones entre los miembros de la microbiota intestinal debido al consumo moderado de cerveza mediante análisis de co-ocurrencia, utilizando el plug-in CoNet en Cytoscape y las 250 principales OTU abundantes del archivo BIOM. Para la cerveza sin alcohol tenemos al menos veinticuatro redes de interacción bacteriana (Figuras S3 y S4; Tablas S9, y S10, Anexos 2 y 3). Identificamos dos redes interesantes, una en el Día 1 con 10 interacciones de copresencia bacteriana estadísticamente significativas (positivas) que incluyen los géneros *Coprococcus*, *Blautia* y orden Clostridiales (Figura 18A, Tabla 10.A), y una en el Día 30 con 55 interacciones de copresencia bacteriana estadísticamente significativas, que incluyen familias Coriobacteriaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Christensenellaceae, orden Clostridiales, RF39 y géneros *Ruminococcus* y *Collinsella* (Figura 18B, Tabla 10.B).

En el consumo de cerveza con alcohol, tenemos al menos veintinueve redes de interacción bacteriana (Figuras S5 y S6; Tablas S11, y S12, Anexos 2 y 3). Identificamos también dos redes interesantes, una en el Día 1 con una sola interacción de copresencia bacteriana, incluida la familia Ruminococcaceae, y 15 interacciones de exclusión mutua, incluidas las familias Coriobacteriaceae,

Ruminococcaeae, géneros *Bacteroides*, *Collinsella*, *Prevotella* *Phascolarctobacterium*, *Eggerthella* y *Ruminococcus* (Figura 18B, Tabla 10.C), y una en el Día 30 con 13 interacciones de exclusión mutua que incluyen orden Clostridiales, familias Ruminococcaeae, Mogibacteriaceae, Coriobacteriaceae, Desulfovibrionaceae y géneros *Bacteroides*, *Dialister* y *Desulfovibrio* (Figura 18B, Tabla 10.D).

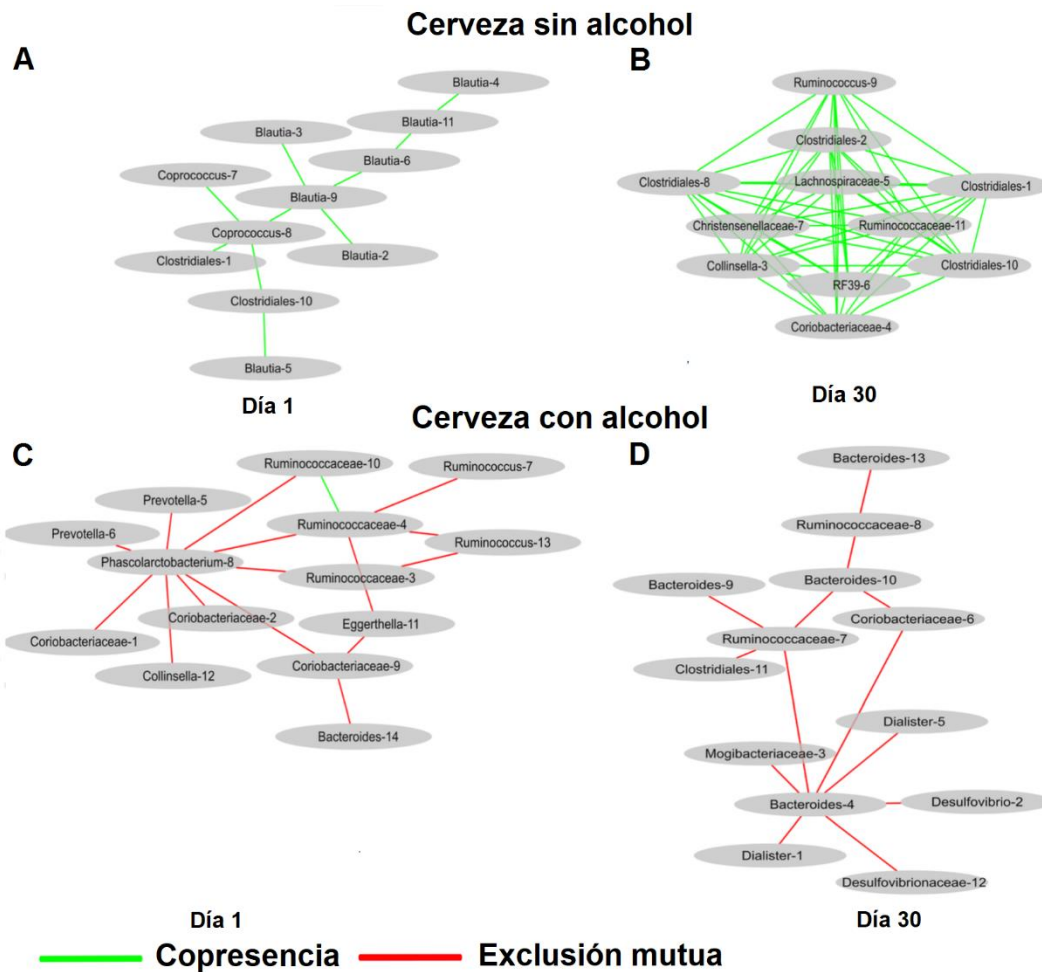


Figura 18. Análisis de co-ocurrencia significativa durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol (CSA) y cerveza con alcohol (CCA). Día 1 (A) y Día 30 (B) para CSA, y Día 1 (C) y Día 30 (D) para CCA. Este gráfico muestra interacciones seleccionadas entre diferentes comunidades bacterianas; copresencia (positivo, líneas verdes) y exclusión mutua (negativo, líneas rojas). El análisis se realizó utilizando el archivo otu_table.biom en la herramienta de complemento CoNet y el software Cytoscape (v3.6.1) visualizó las redes de coincidencia generadas. Cada nodo indica un clado microbiano (taxón bacteriano) que pertenece a un número de OTU único. Los bordes (líneas) que conectan dos nodos representan correlaciones significativas ($p < 0.05$; $q < 0.05$; $R > 0.8$). En estos gráficos, algunos nombres de bacterias se muestran más de una vez, p. Ej. *Blautia*, *Coprococcus*, etc..., aunque representan distintas OTUs. Los nombres de las bacterias y el número

de OTU correspondiente se muestran en la Tabla 10, mientras que el conjunto completo de redes se muestra en las Anexo 2 (Tablas S9-S12) y Anexo 3 (Figuras S3-S6).

Tabla 10. Lista de Taxones bacterianos con sus OTUs ID de la Figura 18.

Cerveza sin alcohol día 1 (A)			Cerveza sin alcohol día 30 (B)		
No.	OTUs ID	Bacteria	No.	OTUs ID	Bacteria
1	9037	Clostridiales	1	2177	Clostridiales
2	180462	<i>Blautia</i>	2	2445	Clostridiales
3	194353	<i>Blautia</i>	3	4777	<i>Collinsella</i>
4	199456	<i>Blautia</i>	4	5341	Coriobacteriaceae
5	302939	<i>Blautia</i>	5	195938	Lachnospiraceae
6	821722	<i>Blautia</i>	6	230132	RF39
7	3609545	<i>Coprococcus</i>	7	295100	Christensenellaceae
8	4382678	<i>Coprococcus</i>	8	333360	Clostridiales
9	4465907	<i>Blautia</i>	9	362991	<i>Ruminococcus</i>
10	4474380	Clostridiales	10	4296496	Clostridiales
11	4476330	<i>Blautia</i>	11	4377144	Ruminococcaceae
Cerveza con alcohol día 1 (C)			Cerveza con alcohol día 30 (D)		
1	483	Coriobacteriaceae	1	476	<i>Dialister</i>
2	6276	Coriobacteriaceae	2	478	<i>Desulfovibrio</i>
3	182044	Ruminococcaceae	3	187517	Mogibacteriaceae
4	311446	Ruminococcaceae	4	3562626	<i>Bacteroides</i>
5	329693	<i>Prevotella copri</i>	5	4326870	<i>Dialister</i>
6	345899	<i>Prevotella copri</i>	6	4335376	Coriobacteriaceae
7	798581	<i>Ruminococcus</i>	7	4356697	Ruminococcaceae
8	4328241	<i>Phascolarctobacterium</i>	8	4377144	Ruminococcaceae
9	4335376	Coriobacteriaceae	9	4416614	<i>Bacteroides</i>
10	4393499	Ruminococcaceae	10	4435784	<i>Bacteroides</i>
11	4393532	<i>Eggerthella</i>	11	4445078	Clostridiales
12	4441081	<i>Collinsella</i>	12	4453773	Desulfovibrionaceae
13	4476751	<i>Ruminococcus cross4 gnavus</i>	13	4468234	<i>Bacteroides</i>
14	4484034	<i>Bacteroides</i>			

La conclusión del objetivo 7 indica que ambas cervezas aumentan los Bacteroidetes y disminuyen los Firmicutes, la cerveza sin alcohol aumenta la alfa diversidad y presenta un cambio significativo en la beta diversidad; además estos cambios no están asociados con la edad. La cerveza sin alcohol favorece el aumento de las abundancias relativas de bacterias que son benéficas para la salud en comparación con la cerveza con alcohol. Las interacciones de las comunidades bacterianas con el consumo de cerveza sin alcohol son mayoritariamente positivas en comparación con la cerveza con alcohol.

Resultados del objetivo específico 8. *Evaluar una asociación entre los cambios en la diversidad de la microbiota con las medidas antropométricas, los perfiles*

hepático, lipídico y el contenido ácidos grasos de cadena corta de las muestras fecales.

Se exploró la correlación estadísticamente significativa de los miembros de la microbiota intestinal con los metadatos clínicos. Primero se realizó la prueba de Spearman para determinar si hay alguna bacteria del archivo otu_table que tenga alguna correlación con los metadatos obtenidos (medidas antropométricas, perfiles hepático y lipídico, ácidos grasos de cadena), como resultado, encontramos solo una correlación negativa para seis bacterias para el caso de la cerveza sin alcohol, tres familias, Clostridiaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae y tres géneros *Anaerostipes*, *Ruminococcus*, *Streptococcus* con metadatos como factores metabólicos, AGCC y biomarcadores (valores p <0.0001, valores p FDR <0.01, valores p Bonferroni ≤0.03) (Tabla 11). Para el caso de la cerveza con alcohol, encontramos una correlación negativa para la familia Ruminococcaceae y *Prevotella stercorea* con AGCC y factores metabólicos, y una correlación positiva para el género *Blautia* con AGCC (valores p <0.0001, valores p FDR <0.02, valores p Bonferroni ≤0.03) (Tabla 11).

Tabla 11. Correlación de metadatos con la microbiota intestinal usando la correlación Spearman.

Bacteria	Metadata	Correlación	p-value	p-value FDR	p-value Bonferroni
Cerveza sin alcohol					
g_ <i>Ruminococcus</i>	AST	Negativa	****<0.01	***<0.01	**<0.01
f_ Clostridiaceae	CβF	Negativa	****<0.01	**<0.01	**<0.01
g_ <i>Streptococcus</i>	Glucosa	Negativa	****<0.01	**<0.01	**<0.01
f_ Lachnospiraceae	Homa/IR	Negativa	****<0.01	**<0.01	**<0.01
f_ Lachnospiraceae	Insulina	Negativa	****<0.01	**<0.01	**<0.01
g_ <i>Anaerostipes</i>	LDL	Negativa	****<0.01	**<0.01	**<0.01
g_ <i>Ruminococcus</i>	Propiónico	Negativa	****<0.01	**<0.01	*0.03
f_ Ruminococcaceae	Propiónico	Negativa	****<0.01	**<0.01	*0.03
Cerveza con alcohol					
f_ Ruminococcaceae	CβF	Negativa	****<0.01	***<0.01	***<0.01
g_ <i>Prevotella stercorea</i>	GEB	Negativa	****<0.01	**<0.01	**<0.01
g_ <i>Blautia</i>	Acético	Positiva	****<0.01	*0.02	*0.03
f_ Ruminococcaceae	Acético	Negativa	****<0.01	*0.02	*0.03

AST, Aspartato transaminasa; CβF, Células β funcionales o células β pancreáticas secretoras de insulina; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; LDL; Low Density Lipoprotein; Glucosa, Glucosa en ayunas; Propiónico, ácido propiónico; Acético, ácido acético; GEB, gasto energético basal, FDR. false discovery rate. El p-value <0.05 se considera estadísticamente significativo. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01, *** indica p≤0.001 y **** indica p≤0.0001. p-value FDR, p-value corregido por el

procedimiento Benjamini-Hochberg FDR para comparaciones múltiples. *p*-value Bonferroni, *p*-value corregido por el procedimiento de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Por otro lado, también determinamos una asociación estadísticamente significativa de los miembros de la microbiota intestinal del archivo L6.txt con los metadatos mediante el análisis MaAsLin. Los resultados mostraron una asociación positiva con el tiempo de consumo de cerveza sin alcohol con nueve bacterias, incluidas dos familias Gemellaceae, Erysipelotrichaceae y siete géneros *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Holdemania*, *Granulicatella*, *Dehalobacterium*, *Dialister* y *Staphylococcus* (valores *p* <0.001, valores *q* ≤ 0.21) (Tabla 12). Para la cerveza con alcohol, encontramos asociación positiva con nueve bacterias, tres familias Paraprevotellaceae, Chitinophagaceae, Cytophagaceae y seis géneros *Catenibacterium*, *Roseburia*, *Megasphaera*, *Megamonas*, *Rhodococcus* y *Lentzea* con factores metabólicos, biomarcadores, AGCC y tiempo. Por otro lado, se determinó una asociación negativa para cinco bacterias, la familia Erysipelotrichaceae y cuatro géneros *Parabacteroides*, *Coprococcus*, *Megasphaera* y *Lentzea* con biomarcadores, factores metabólicos y AGCC (valores *p* <0.01, valores *q* ≤0.25) (Tabla 12).

Tabla 12. Metadatos asociados con la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza usando el análisis MaAsLin.

Bacteria	Metadata	Association	<i>p</i> -value	<i>q</i> -value
Cerveza sin alcohol				
<i>g_Actinomyces</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	***<0.01
<i>g_Streptococcus</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	*0.05
<i>g_Holdemania</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	*0.05
<i>f_Erysipelotrichaceae</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	*0.05
<i>g_Granulicatella</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	*0.05
<i>g_Dehalobacterium</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	*0.05
<i>g_Dialister</i>	Tiempo	Positiva	***<0.01	0.09
<i>f_Gemellaceae</i>	Tiempo	Positiva	***<0.01	0.10
<i>g_Staphylococcus</i>	Tiempo	Positiva	***<0.01	0.21
Cerveza con alcohol				
<i>g_Catenibacterium</i>	AST	Positiva	***<0.01	0.07
<i>g_Parabacteroides</i>	AST	Negativa	***<0.01	0.24
<i>f_Paraprevotellaceae</i>	AST	Positiva	**<0.01	0.25
<i>g_Roseburia</i>	Butírico	Positiva	***<0.01	0.07
<i>g_Megasphaera</i>	Colesterol	Positiva	***<0.01	0.15
<i>g_Coprococcus</i>	Glucosa	Negativa	**<0.01	0.25
<i>g_Megasphaera</i>	HDL	Negativa	****<0.01	0.07
<i>f_Erysipelotrichaceae</i>	ICC	Negativa	**<0.01	0.25
<i>g_Megamonas</i>	IAP	Positiva	**<0.01	0.25

g_ <i>Lentzea</i>	Propiónico	Negativa	***<0.01	0.25
f_ <i>Cytophagaceae</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	0.06
g_ <i>Lentzea</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	0.07
f_ <i>Chitinophagaceae</i>	Tiempo	Positiva	****<0.01	0.07
g_ <i>Rhodococcus</i>	Tiempo	Positiva	***<0.01	0.10

MaAsLin, Multivariate Association with Linear Models; Tiempo, período de 30 días de consumo de cerveza.; AST, Aspartato transaminasa; Butírico, ácido butírico; Glucosa, glucosa en ayunas; HDL, High Density Lipoprotein; ICC, Índice cintura / cadera; IAP, Índice aterogénico del plasma; Propiónico, ácido propiónico. El *p-value* <0,05 y el valor *q* ≤ 0,25 se consideran estadísticamente significativos. * indica *p* ≤ 0.05, ** indica *p* ≤ 0.01, *** indica *p* ≤ 0.001 y **** indica *p* ≤ 0.0001.

La conclusión del objetivo 8 indica que hay correlaciones o asociaciones de las bacterias de la microbiota intestinal con los metadatos en ambas cervezas.

Resumen de resultados

Ninguna cerveza:

Favorece el aumento de peso ni alguna variable antropométrica, no alteran los valores de perfil hepático y lipídico, ni lo ácidos grasos de cadena corta.

Ambas cervezas:

Tienen una composición de polifenoles muy similar.

Aumentaron significativamente la abundancia relativa de los bacteroidetes, y disminuyen los Firmicutes.

Hay correlaciones o asociaciones de las bacterias de la microbiota intestinal con los metadatos en ambas cervezas.

Específicamente la cerveza sin alcohol:

Disminuyó los niveles de glucosa y le cerveza con alcohol los aumentó (en ambos casos manteniéndose en los límites normales).

Aumenta la alfa diversidad y presenta un cambio significativo en la beta diversidad.

Las interacciones de las comunidades bacterianas son mayoritariamente positivas.

10. DISCUSIÓN

La cerveza es una bebida hecha de extractos de malta y lúpulo que contiene muchos compuestos bioactivos además de etanol. Está reportado que el consumo moderado de cerveza tiene beneficios para la salud (Chen *et al.*, 2014), y se propone que los beneficios de la cerveza podrían estar mediados por la microbiota intestinal, sin embargo, aún se necesitan más pruebas experimentales (Moreno-Indias, 2017). Cerveza a partir de arroz en una población de la India mostró un aumento en las bacterias *Pediococcus*, *Leptotrichia*, *Fusibacter*, *Streptococcus* y *Fusobacterium* en los individuos que consumieron la cerveza comparados con los que no consumieron la cerveza (Deb *et al.*, 2020). En este trabajo abordamos la atractiva propuesta de que los beneficios de la cerveza podrían estar mediados en parte por la microbiota intestinal, estudiamos el efecto del consumo moderado de cerveza sin alcohol y con alcohol en la salud de una muestra de adultos mexicanos, caracterizando la diversidad de la microbiota intestinal; además de los datos clínicos.

En general, se observa en este proyecto que el consumo de cerveza tiene un efecto moderado en las variables clínicas. Los participantes bebieron un promedio de ~ 5.1 mL / Kg / día cerveza sin alcohol (CSA), tipo "Lager", 0.5% ABV, ó ~ 5.3 mL / Kg / día AB, tipo "Lager", 4.9% cerveza con alcohol (CCA) por 30 días. Para el caso de CSA, la glucosa en sangre en ayunas disminuyó, aunque dentro de los valores normales; lo mismo fue para ALT y AST. También hubo un aumento en las células β funcionales en el mismo período. El consumo de CSA no tuvo un efecto adverso sobre los parámetros clínicos monitorizados en los participantes, por ejemplo, el IMC, el nivel de insulina en sangre, así como los perfiles lipídicos, inflamatorios y hepáticos (Tabla 3). En contraste, no se observaron los mismos beneficios para el consumo de CCA, encontrando que, aunque todavía dentro del rango normal, los niveles de glucosa en sangre en ayunas, bilirrubina directa, presión diastólica y el índice cintura-cadera aumentaron, mientras que las células β funcionales, velocidad de sedimentación globular y lipoproteínas de alta densidad disminuyeron (Tabla 4) Hay pocos informes sobre el efecto del consumo de CSA y CCA. En un informe que usa ratas hembra Long-Evans durante el

embarazo; las ratas consumieron cerveza con alcohol (5%) y sin alcohol en dosis de 250 ml / kg / día a 685 ml / kg / día durante 52 días. Se observó que CCA aumentaba de peso con respecto a CSA y la descendencia tenía hipoglucemia; sin embargo, la microbiota intestinal no fue monitoreada (Lancaster & Spiegel, 1991). Hay un informe sobre el efecto del alcohol en la población coreana de 40 a 69 años, donde los participantes masculinos informaron que consumían <5.0, <30.0 o \geq 30.0 g de alcohol/día. El consumo de alcohol se asoció positivamente con HDL, AST y triglicéridos, y se asoció negativamente con la sensibilidad a la insulina y la función de las células β con respecto a los abstemios (Yoo *et al.*, 2016). En nuestro estudio, los participantes consumieron 1,4 g de alcohol/día en la CSA y 13,7 g de alcohol / día en la CCA; con estas dosis, la concentración sérica de las transaminasas ALT y AST disminuyeron en CSA y no cambiaron con CCA; aunque la función de las células β disminuyó significativamente con CCA. Hay informes de aumento de ALT y AST debido al alcoholismo en la población finlandesa de 47-55 años (Peterson K., 2004).

Con respecto a la comunidad bacteriana intestinal, la CSA aumentó la abundancia del Phylum de los bacteroidetes mientras disminuyó la abundancia de los Firmicutes; la CCA produjo resultados similares. Debemos señalar que no se observaron cambios significativos en la abundancia relativa de las Phyla de Proteobacterias y Actinobacterias debido al consumo de cerveza (Figura 14, Tabla 7).

Cuando evaluamos los cambios en la diversidad bacteriana, observamos que el consumo de CSA aumentó significativamente la diversidad alfa de la microbiana intestinal; sin embargo, no se obtuvo el mismo resultado durante el consumo de CCA (Figura 15A, Tabla 8). Los individuos en la muestra del estudio tenían un rango de edad de 21-53 años en el caso de CSA y 21-55 años para el caso de CCA, con una moda de 24 años para ambas cervezas (Tablas 4 y 5). La edad podría aparecer como una variable confusora en el estudio, sin embargo, para los individuos de la muestra de estudio, la diversidad alfa de microbiota intestinal no muestra una tendencia definida de cambio en relación con la edad como se muestra en los valores de Δ Chao1 y Δ Shannon (Figura 16).

La diversidad beta cambió después de 30 días de consumo de CSA, agrupando a los individuos en el día 1 y el día 30 por separado (Figura 15C); la CCA, por otro lado, no agrupaba a los individuos (Figura 15D). Hay un estudio que reporta una influencia del género en la diversidad de microbiota intestinal para la población española (Haro *et al.*, 2016), sin embargo, en nuestra muestra, la diversidad de la microbiota intestinal no estuvo influenciada por el género, la gráfica del análisis de diversidad beta para las muestras estudiadas en el día 1 para cualquiera de las cervezas, no mostró ningún agrupamiento (Figura S7, Anexo 3), esta discrepancia podría deberse a diferencias en la ascendencia entre los individuos españoles y mexicanos. Cuando graficamos los valores de diversidad beta para mujeres y hombres por separado, para el caso de CSA, la diversidad de microbiota intestinal cambió igualmente debido al consumo de cerveza (p value= 0.001) (Figura S8, Anexo 3). Adicionalmente, los cambios observados en las variables clínicas como la glucosa y el porcentaje de células beta funcionales, al separarse por género mostraron significancia estadística (Tablas S13 a S16; Anexo 2); además de comprobar si la edad y el género eran variables confusoras, se hizo una prueba cálculo de tamaño de muestra a partir de las medias y desviaciones estándar de los índices de alfa diversidad, lo cual dio como resultado que se necesitan alrededor de una 50 muestras, para CSA se tienen 70 y CCA 66 (Tabla S2; Anexo 2). Considerando lo anterior se concluye que en este proyecto la tiene muestras suficientes para detectar cambios significativos, además de que la edad y el género de los participantes no son variables confusoras.

Descubrimos que el consumo moderado de CSA o CCA influye en la abundancia relativa de bacterias intestinales específicas y sus vías metabólicas. La información de las Tablas 13 y 14 contextualizan nuestros hallazgos sobre los cambios en la abundancia relativa de bacterias seleccionadas con otros proyectos. Para el caso de la CSA (Tabla 13 y Figura 17A), la abundancia relativa de varios Firmicutes aumentó con significancia estadística después de 30 días. Por ejemplo, para el género *Lactobacillus*, una cepa de la misma bacteria atenúa la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina en ratones. Se reportes que el

género, *Turicibacter*, reduce su abundancia en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. También se informa que los géneros *Streptococcus* y *Veillonella* que aumentaron su abundancia en este trabajo tienen propiedades inmunomoduladoras beneficiosas. Por otro lado, bacterias como *Phascolarctobacterium*, que según se informa produce pérdida de peso en humanos, aumentan después de 30 días en nuestro estudio. Lo mismo para las bacterias que tienen efectos antiinflamatorios (*Lactococcus*) y antiobesidad (*Weisella*) en ratones, que aumentan en nuestro estudio debido al consumo de la CSA. Los miembros de la familia Erysipelotrichaceae aumentaron en el día 30 de consumir CSA; está reportado que la abundancia de esta familia es mayor en mujeres sanas que en mujeres afectadas por obesidad y síndrome metabólico. Finalmente, se informa que la abundancia del género *Dialister invisus* aumentada en nuestro trabajo disminuye en los pacientes con enfermedad de Crohn. Para el caso de los Bacteroidetes, encontramos en nuestro trabajo que se informa que dos géneros *Parabacteroides* y *Bacteroides*, que aumentaron en el día 30, son más abundantes en mujeres sanas que las que padecen de obesidad o las mujeres afectadas por el síndrome metabólico. Los miembros de las proteobacterias como *Haemophilus*, aumentaron su abundancia con la CSA, hay informes de que las bacterias de este género se correlacionaron negativamente con el porcentaje de grasa corporal las mujeres. El consumo de CSA aumentó la abundancia de la clase Actinobacteria, que según se informa modula positivamente la permeabilidad intestinal, el sistema inmune, el metabolismo y el eje intestino-cerebro, de la misma manera, las mismas bacterias son más abundantes en el intestino de las mujeres sanas con respecto a las mujeres afectadas por obesidad o síndrome metabólico (Tabla 13 y Figura 17A). Para el caso de la CCA, la mayoría de los cambios fueron para bacterias con disminución en su abundancia relativa, sin informes relacionados con enfermedades humanas en el momento de la consulta de PubMed; solo el género *Bacillus* mostró un aumento en la abundancia en el día 30, hay informes que tiene actividad antimicrobiana e inmunomoduladora beneficiosa en humanos y animales (Tabla 14 y Figura 17B).

La cerveza es una fuente importante de polifenoles (por ejemplo, catequina) y ácidos fenólicos (por ejemplo, ácido p-cumarico); compuestos como estos fueron detectados por espectrometría de masas en las cervezas utilizadas en este trabajo (Figura 8). Los polifenoles regulan los niveles de glucosa al mejorar la translocación de GLUT4 para promover la absorción de glucosa en el músculo esquelético mitigando la resistencia a la insulina, la diabetes y la hipertensión (Li *et al.*, 2020). Además, se ha informado que los polifenoles del té pueden modificar la microbiota intestinal en un modelo de ratones, reduciendo los niveles de glucosa en sangre en ayunas (Chen *et al.*, 2019) de acuerdo con nuestros resultados. Los ácidos fenólicos, por otro lado, generalmente se consideran fitoquímicos en la dieta, como los ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y flavonoides que tienen actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas; sin embargo, se ha informado que estos metabolitos pueden ser producidos por la microbiota intestinal mediante la fermentación de aminoácidos aromáticos (Russell *et al.*, 2013).

El análisis de nuestros datos mostró que, junto con la modificación de la diversidad bacteriana desencadenada por la CSA, las vías metabólicas predichas de la comunidad de bacterias intestinales cambiaron significativamente aumentando el metabolismo del azúcar y la síntesis de lipopolisacáridos y fenilpropanoides en el intestino (Figura 17C, Tabla 9). El aumento en la ruta de síntesis de fenilpropanoides debido al consumo de CSA en nuestro estudio es de interés porque, aunque se informa que esta ruta conduce a la producción de estilbenos (por ejemplo, resveratrol) solo en plantas (Vogt T., 2010), existe la posibilidad de que algunos miembros desconocidos de la microbiota intestinal podrían sintetizarlos; De hecho, se informa que algunas bacterias son capaces de sintetizar el resveratrol después de algunas modificaciones genéticas (Braga *et al.*, 2018). El resveratrol es un fenol natural con propiedades frente al cáncer, trastornos neurológicos, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedad del hígado graso no alcohólico (Berman *et al.*, 2017). Se ha informado que los ácidos fenólicos como los fenilpropanoides son sintetizados por Bacteroidetes (por ejemplo, *Bacteroides* y *Parabacteroides*) en el intestino (Russell *et al.*, 2013).

Descubrimos que estos dos géneros aumentaron al menos 3 veces después de 30 días de consumo de CSA en nuestro trabajo. Por otro lado, no hubo cambios significativos en la abundancia de las rutas metabólicas después del consumo de CCA durante 30 días. Un estudio piloto donde personas con DT2 y obesidad o sobrepeso tomaron cerveza sin alcohol mostró un aumento de *Parabacteroides*, una disminución significativa de la glucosa y HOMA-IR, y PICRUST mostro las rutas biosíntesis de terpenoides-quinonas, lipopolisacáridos y N-glicanos (Mateo-Gallego *et al.*, 2021).

Cuando realizamos los análisis de correlación o asociación de metadatos clínicos con bacterias intestinales para el caso de CSA, encontramos bacterias con mayor abundancia relativa en el día 30 de consumo de cerveza (por ejemplo, *Streptococcus*, *Parabacteroides*) que se correlacionan negativamente o se asocian con datos clínicos como glucosa, insulina, LDL, HDL, ICC, C β F y AGCC en nuestro trabajo, que están relacionados con la obesidad, la diabetes tipo 2 o el síndrome metabólico. Para el caso de CCA encontramos correlación negativa o asociación de la familia Ruminococcaceae, *Prevotella stercorea* y *Megasphaera* con AGCC y factores metabólicos; y correlación positiva o asociación de *Blautia* con AGCC y *Megasphaera*, con colesterol (Tablas 11 y 12).

Analizamos las interacciones bacterianas entre los miembros residentes de microbiota en ambos estudios. Estos análisis indicaron interacciones notables de copresencia y exclusión mutua. Observamos que, para la CSA, las relaciones estaban dominados por interacciones positivas de copresencia como se muestra en el día 30, esto coincide con el aumento de la diversidad bacteriana observado al mismo tiempo (Figura 18B). El consumo de cerveza alcohólica mostró un efecto diferente, donde las interacciones estuvieron dominadas por la exclusión mutua negativa como se muestra en el día 30 del consumo de CCA, en este caso se observa una disminución en la diversidad bacteriana al mismo tiempo (Figura 18D).

Tabla 13. Bacterias intestinales con cambios de abundancia significativos durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol y otros reportes.

Taxa	Este estudio*	Otros reportes	Referencia
Phylum Firmicutes			
g_ <i>Lactobacillus</i>	3-fold > d30	Una cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> atenúa la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina en ratones.	Lee <i>et al.</i> , 2018
		Efectos beneficios de <i>Lactobacillus reuteri</i> en la diabetes mellitus tipo 2.	Hsieh <i>et al.</i> , 2018.
		Efecto positivo de <i>Lactobacillus reuteri</i> sobre biomarcadores de inflamación, riesgo cardiovascular y esteatosis hepática en adultos obesos con síndrome metabólico.	Tenorio-Jiménez <i>et al.</i> , 2018
g_ <i>Staphylococcus</i>	2-fold > d30	El predominio de <i>Staphylococcus</i> es parte de una microbiota saludable en los bebés noruegos.	Korpela <i>et al.</i> , 2018
g_ <i>Turicibacter</i>	2-fold > d30	<i>Turicibacter</i> se asoció negativamente con el IMC en mujeres españolas premenopáusicas de 18 a 40 años.	Bressa <i>et al.</i> , 2017
		La abundancia de <i>Turicibacter</i> se reduce en ratones C57BL / 6 alimentados con una dieta alta en grasas.	Guo <i>et al.</i> , 2017
g_ <i>Streptococcus</i>	3-fold > d30	<i>Streptococcus</i> aislados de la microbiota del intestino delgado humano tienen propiedades inmunomoduladoras.	Van Den Bogert <i>et al.</i> , 2014
g_ <i>Veillonella</i>	2-fold > d30	<i>Veillonella</i> aislada de la microbiota del intestino delgado humano tienen propiedades inmunomoduladoras.	Van Den Bogert <i>et al.</i> , 2014
g_ <i>Phascolarctobacterium</i>	3-fold > d30	La dieta baja en energía aumenta la abundancia de <i>Phascolarctobacterium</i> y produce pérdida de peso en la población estadounidense.	Muñiz-Pedrogo <i>et al.</i> , 2018
		<i>Phascolarctobacterium faecium</i> es abundante en el intestino de los chinos sanos.	Wu <i>et al.</i> , 2017
		Las ratas macho Sprague Dawley alimentadas con una dieta alta en grasas mostraron un aumento en la abundancia de <i>Phascolarctobacterium</i> .	Lecomte <i>et al.</i> , 2015
g_ <i>Lactococcus</i>	2-fold > d30	<i>Lactococcus</i> ha mostrado efectos antiinflamatorios contra la colitis en ratones C57BL / 6.	Luerce <i>et al.</i> , 2014
g_ <i>Weissella</i>	2-fold > d30	La cepa de <i>Weissella koreensis</i> mostró un efecto anti-obesidad en ratones C57BL / 6J obesos inducidos por una dieta alta en grasas.	Park <i>et al.</i> , 2012
g_ <i>Dialister</i>	4-fold > d30	<i>Dialister invisus</i> disminuye en paciente finlandés con enfermedad de Crohn.	Joossens <i>et al.</i> , 2011
		Los sujetos sanos mediterráneos de Cerdeña mostraron una abundancia significativa de <i>Dialister</i> en su microbiota.	Tanca <i>et al.</i> , 2017

		Una dieta rica en cebada mostró una abundancia significativamente mayor de <i>Dialister</i> en un estudio de Kansas.	Martínez <i>et al.</i> , 2013b
f_Erysipelotrichaceae	3-fold > d30	Erysipelotrichaceae se encontró significativamente más abundante en mujeres adultas mexicanas sanas que en obesas y obesas con síndrome metabólico.	Chávez-Carbajal <i>et al.</i> , 2019
		La dieta de ésteres de esteroides vegetales aumenta la excreción de colesterol y disminuye la abundancia de Erysipelotrichaceae en los hámsteres sirios.	Martínez <i>et al.</i> , 2013a
g_Bulleidia	2-fold > d30	<i>Bulleidia</i> demostró ser un marcador humano en un estudio con humanos (italianos, franceses, japoneses, estadounidenses) y chimpancés.	Moeller <i>et al.</i> , 2012
		<i>Bulleidia</i> encontró más abundante en las poblaciones del Himalaya con estilo de vida de foráneo en comparación con los de alimentos estadounidenses industrializados.	Jha <i>et al.</i> , 2018
Phylum Bacteroidetes			
g_Parabacteroides	3-fold > d30	<i>Parabacteroides</i> se encontró significativamente más abundante en mujeres adultas mexicanas sanas que obesas y obesas con síndrome metabólico.	Chávez-Carbajal <i>et al.</i> , 2019
		Los <i>Parabacteroides</i> son parte del microbioma intestinal sano del bebé.	Lloyd-Price <i>et al.</i> , 2016
g_Bacteroides	4-fold > d30	El vino tinto o el vino tinto desalcoholizado disminuyó significativamente el número de <i>Bacteroides</i> en hombres adultos españoles de raza blanca.	Moreno-Indias <i>et al.</i> , 2016
		Significativamente más abundante en mujeres adultas mexicanas sanas que obesas y obesas con síndrome metabólico.	Chávez-Carbajal <i>et al.</i> , 2019
		El consumo de vino tinto mostró un aumento de <i>Bacteroides</i> y una disminución de la presión arterial sistólica y diastólica, los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol HDL y la proteína C reactiva en hombres adultos sanos españoles.	Queipo-Ortuño <i>et al.</i> , 2012
f_Rikenellaceae	3-fold > d30	La abundancia de Rikenellaceae disminuyó en la enfermedad del hígado graso no alcohólico en la población china.	Jiang <i>et al.</i> , 2015
		Residente normal de la microbiota intestinal humana del tracto gastrointestinal inferior.	Eid <i>et al.</i> , 2017
Phylum Proteobacteria			

g_ <i>Haemophilus</i>	2-fold > d30	<i>Haemophilus</i> es más abundante en pacientes con hepatitis alcohólica grave en la población francesa.	Ciocan <i>et al.</i> , 2018
		<i>Haemophilus</i> se correlacionó negativamente con el porcentaje de grasa corporal en mujeres españolas premenopáusicas de 18 a 40 años.	Bressa <i>et al.</i> , 2017
g_ <i>Acinetobacter</i>	2-fold > d30	<i>Acinetobacter</i> spp. tiene su abundancia aumentada en pacientes con inmunodeficiencia.	Cénit <i>et al.</i> , 2014
f_Enterobacteriaceae	3-fold > d30	Enterobacteriaceae fue más abundante en niños mexicanos con sobrepeso y obesidad que el peso normal.	Murugesan <i>et al.</i> , 2015
g_ <i>Sutterella</i>	2-fold > d30	<i>Sutterella</i> es comensal ampliamente prevalente, que no contribuye significativamente a la alteración de la homeostasis epitelial en el intestino humano.	Hiiippala <i>et al.</i> , 2016
		<i>Sutterella</i> se encontró elevada en las heces de niños con autismo en comparación con los controles.	Wang <i>et al.</i> , 2013
o_Rhizobiales	2-fold > d1	*NRP	NA
f_Sphingomonadaceae	3-fold > d1	Sphingomonadaceae es parte de la microbiota de la población española.	D'Auria <i>et al.</i> , 2013
		Sphingomonadaceae fue más abundante en el líquido aspirado del pezón de controles sanos que en pacientes con cáncer de mama en mujeres estadounidenses.	Chan <i>et al.</i> , 2016
		Sphingomonadaceae es parte de la microbiota en adultos sanos alemanes.	Zakharkina <i>et al.</i> , 2013
g_ <i>Agrobacterium</i>	2-fold > d1	*NRP	NA
Phylum Actinobacteria			
c_Actinobacteria	2-fold > d30	<i>Actinobacteria</i> participa positivamente en la modulación de la permeabilidad intestinal, el sistema inmunológico, el metabolismo y el eje intestino-cerebro.	Binda <i>et al.</i> , 2018
		Significativamente más abundante en mujeres adultas mexicanas sanas que obesas y obesas con síndrome metabólico.	Chávez-Carbajal <i>et al.</i> , 2019
g_ <i>Actinomyces</i>	2-fold > d30	<i>Actinomyces polynesiensis</i> cepa MS2 aislada de heces de individuos sanos en la isla de Raiatea.	Cimmino <i>et al.</i> , 2016
Phylum Cyanobacteria			
o_Streptophyta	2-fold > d1	Las ratas Fischer 344 alimentadas con nuez mostraron una mayor abundancia de Streptophyta.	Byerley <i>et al.</i> , 2017
		Streptophyta se encontró más abundante en ratones BALB / cJ, lo que sugiere ADN residual de origen vegetal de la dieta.	Ericsson & Franklin, 2015

*p.ej. 3 fold > d30 indica 3 veces más abundante el día 30; f, familia; o, orden; g, género; NA, no aplica; NRP, no hay reportes publicados relacionados con la obesidad, la diabetes tipo 2 o el síndrome metabólico; *. Consulte la Tabla S7, Anexo 2 y los resultados de LEfSe en la Figura 17A.

Tabla 14. Bacterias intestinales con cambios de abundancia significativos durante el consumo moderado de cerveza con alcohol y otros reportes.

Taxa	Este estudio*	Otros reportes	Referencia
Phylum Firmicutes			
f_Bacillaceae	2-fold > d30	Los miembros de las Bacillaceae sintetizan péptidos cortos de ~ 30 residuos con actividad contra varios patógenos.	Zhao <i>et al.</i> , 2018
o_Bacillales	3-fold > d30	Varios miembros de la orden Bacillales pueden ser componentes de bajo nivel de la microbiota gastrointestinal humana.	Rajilić - Stojanovic & M. de Vos, 2014
g_Bacillus	3-fold > d30	<i>B. thuringiensis</i> produce aminoácido con actividad insulínica y antiobesidad.	Ogawa <i>et al.</i> , 2011
		<i>B. subtilis</i> tiene potencial para producir un candidato a fármaco para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y el síndrome de ovario poliquístico	Yoshida <i>et al.</i> , 2006
		<i>B. indicus</i> productor de carotenoides tiene efectos beneficiosos en un modelo de rata con síndrome metabólico inducido por la dieta.	Crescenzo <i>et al.</i> , 2017
		Se ha informado que diferentes cepas de <i>Bacillus</i> muestran actividad antimicrobiana e inmunomoduladora en el hospedador.	Elshagabee <i>et al.</i> , 2017
		<i>Bacillus</i> tiene la capacidad de producir péptidos antimicrobianos.	Khochamit <i>et al.</i> , 2015
Phylum Bacteroidetes			
g_Dysgonomonas	3-fold > d30	<i>D. gadei</i> se encontró en el intestino humano con actividad de descomposición de la paja de arroz.	Tamura <i>et al.</i> , 2017
f_Chitinophagaceae	2-fold > d1	NRP*	NA
f_Cytophagaceae	2-fold > d1	NRP*	NA
c_Cytophagia	2-fold > d1	NRP*	NA
c_Saprospirae	2-fold > d1	NRP*	NA
o_Cytophagales	2-fold > d1	NRP*	NA
Phylum Proteobacteria			
g_Pseudomonas	2-fold > d30	NRP*	NA
g_Succinivibrio	2-fold > d30	<i>Succinivibrio</i> es una bacteria intestinal fermentadora de polisacáridos de plantas en los africanos nativos.	Nakayama <i>et al.</i> , 2017
o_Aeromonadales	2-fold > d30	NRP*	NA
g_Sphingomonas	2-fold > d1	<i>Sphingomonas</i> es importante en el mantenimiento de la respuesta inmune en la población española.	D'Auria <i>et al.</i> , 2013
f_Sphingomonadaceae	2-fold > d1	NRP*	NA
Phylum Actinobacteria			

<i>g_Lentzea</i>	3-fold > d1	NPR*	NA
------------------	-------------	------	----

*p.ej. 3 fold> d30 indica 3 veces más abundante el día 30; f, familia; c, clase; o, orden; g, género; NA, no aplica; NRP, no hay reportes publicados relacionados con la obesidad, la diabetes tipo 2 o el síndrome metabólico; *. Consulte la Tabla S8, Anexo 2 y los resultados de LEfSe en la Figura 17B.

11. CONCLUSIÓN

El consumo moderado de cerveza sin alcohol tiene un efecto positivo en la salud humana mediante la suplementación de polifenoles y ácidos fenólicos activos, y mediante el enriquecimiento de la diversidad de la microbiota intestinal con bacterias beneficiosas; mientras que la presencia de alcohol en la cerveza con alcohol interfiere con este efecto en nuestro estudio. Nuestras conclusiones se resumen en el modelo de la Figura 19. Se debe trabajar más sobre este tema antes de sacar conclusiones generales.

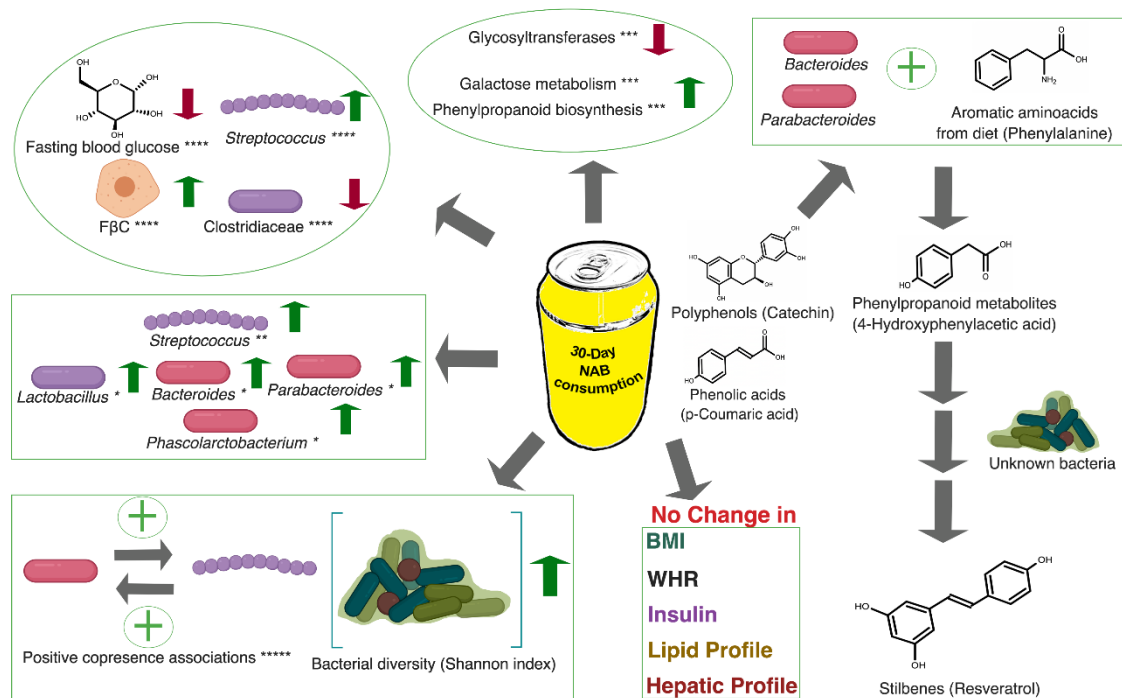


Figura 19. Modelo para el efecto del consumo de cerveza sin alcohol (CSA). La figura muestra un modelo para el efecto del consumo de CSA durante 30 días. En este modelo, los polifenoles provenientes de la cerveza (por ejemplo, la catequina) regulan los niveles de glucosa en sangre mejorando la absorción de glucosa en el cuerpo y, al mismo tiempo, cambian la diversidad de la microbiota intestinal. El efecto en la diversidad de la microbiota, reveló cambios estadísticamente significativos en la abundancia de bacterias como el género *Streptococcus* y la familia Clostridiaceae junto con disminución de los niveles de glucosa en sangre y activación de la función de las células β respectivamente. El aumento en la diversidad bacteriana se ve reforzado por las asociaciones positivas de copresencia y el aumento en la abundancia de rutas metabólicas para la biosíntesis de fenilpropanoides. Además de los ácidos fenólicos suministrados por la cerveza (por ejemplo, ácido p-cumarico), los miembros de la microbiota intestinal alimentados con CSA pueden producir metabolitos similares; por ejemplo, los géneros *Bacteroides* y *Parabacteroides*,

mediante la fermentación de aminoácidos aromáticos pueden sintetizar fenilpropanoides. Algunos miembros aún desconocidos de esta microbiota intestinal alimentada con CSA podrían sintetizar estilbenos como el resveratrol. En este modelo, la microbiota intestinal alimentada con CSA produce metabolitos que tienen actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas que mejoran la salud. Los datos para esta figura son significativos según * LEfSe, ** LefSe y MaAsLin, *** PICRUST, **** correlación de Spearman o ***** análisis de co-ocurrencia.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aichinger, G., Beisl, J., & Marko, D. (2018). The Hop Polyphenols Xanthohumol and 8-Prenyl-Naringenin Antagonize the Estrogenic Effects of *Fusarium* Mycotoxins in Human Endometrial Cancer Cells. *Frontiers in nutrition*, 5, 85. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00085>
- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Aradillas-García, C., Rodríguez-Morán, M., Garay-Sevilla, M. E., Malacara, J. M., Rascon-Pacheco, R. A., & Guerrero-Romero, F. (2012). Distribution of the homeostasis model assessment of insulin resistance in Mexican children and adolescents. *European journal of endocrinology*, 166(2), 301–306. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0844>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. Retrieved August 10, 2020, from www.jstor.org/stable/2346101
- Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., & Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ precision oncology*, 1, 35. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6>
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M. J., & Relman, D. A. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 732–737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506655103>
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut

- homeostasis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 50(5), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>
- Braga, A., Ferreira, P., Oliveira, J., Rocha, I., & Faria, N. (2018). Heterologous production of resveratrol in bacterial hosts: current status and perspectives. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(8), 122. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2506-8>
- Bressa, C., Bailén-Andrino, M., Pérez-Santiago, J., González-Soltero, R., Pérez, M., Montalvo-Lominchar, M. G., Maté-Muñoz, J. L., Domínguez, R., Moreno, D., & Larrosa, M. (2017). Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PloS one*, 12(2), e0171352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171352>
- Byerley, L. O., Samuelson, D., Blanchard, E., 4th, Luo, M., Lorenzen, B. N., Banks, S., Ponder, M. A., Welsh, D. A., & Taylor, C. M. (2017). Changes in the gut microbial communities following addition of walnuts to the diet. *The Journal of nutritional biochemistry*, 48, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.001>
- Cabras, I., & Higgins, D. M. (2016) Beer, brewing, and business history. *Business History*, 58:5, 609-624, DOI: 10.1080/00076791.2015.1122713
- Carbajal-Martínez, L. D., & 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., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(8), 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Castelli W. P. (1984). Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *The American journal of medicine*, 76(2A), 4–12. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(84\)90952-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90952-5)

- Cénit, M. C., Matzaraki, V., Tigchelaar, E. F., & Zhernakova, A. (2014). Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(10), 1981–1992. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.023>
- Cerveceros de España, Libro blanco de la cerveza (2001), páginas (8-10; 14; 16-18) <<http://www.bilbobeer.com/wp-content/uploads/2013/11/el-libro-blanco-de-la-cerveza.pdf>> [Consulta: 2020-08-08].
- Cerveceros de España. Elaboración de la cerveza. Cerveceros de España (Infografía) (Figura 1). Recuperado: <http://www.infografikacomunicacion.es/infografias-empresa/empresas/116-cervecera> <12-08-2020>.
- Chan, A. A., Bashir, M., Rivas, M. N., Duvall, K., Sieling, P. A., Pieber, T. R., Vaishampayan, P. A., Love, S. M., & Lee, D. J. (2016). Characterization of the microbiome of nipple aspirate fluid of breast cancer survivors. *Scientific reports*, 6, 28061. <https://doi.org/10.1038/srep28061>
- Chávez-Carbajal, A., Nirmalkar, K., Pérez-Lizaur, A., Hernández-Quiroz, F., Ramírez-Del-Alto, S., García-Mena, J., & Hernández-Guerrero, C. (2019). Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 438. <https://doi.org/10.3390/ijms20020438>
- Chávez-Carbajal, A., Pizano-Zárate, M. L., Hernández-Quiroz, F., Ortiz-Luna, G. F., Morales-Hernández, R. M., De Sales-Millán, A., Hernández-Trejo, M., García-Vite, A., Beltrán-Lagunes, L., Hoyo-Vadillo, C., & García-Mena, J. (2020). Characterization of the Gut Microbiota of Individuals at Different T2D Stages Reveals a Complex Relationship with the Host. *Microorganisms*, 8(1), 94. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010094>
- Chen, T., Liu, A. B., Sun, S., Ajami, N. J., Ross, M. C., Wang, H., Zhang, L., Reuhl, K., Kobayashi, K., Onishi, J. C., Zhao, L., & Yang, C. S. (2019). Green Tea Polyphenols Modify the Gut Microbiome in db/db Mice as Co-Abundance Groups Correlating with the Blood Glucose Lowering Effect. *Molecular*

nutrition & food research, 63(8), e1801064.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201801064>

- Chen, W., Becker, T., Qian, F., & Ring, J. (2014). Beer and beer compounds: physiological effects on skin health. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 28(2), 142–150. <https://doi.org/10.1111/jdv.12204>
- Cimmino, T., Metidji, S., Labas, N., Le Page, S., Musso, D., Raoult, D., & Rolain, J. M. (2016). Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut. *New microbes and new infections*, 12, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.02.014>
- Ciocan, D., Rebours, V., Voican, C. S., Wrzosek, L., Puchois, V., Cassard, A. M., & Perlemuter, G. (2018). Characterization of intestinal microbiota in alcoholic patients with and without alcoholic hepatitis or chronic alcoholic pancreatitis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23146-3>.
- Crescenzo, R., Mazzoli, A., Cancelliere, R., Bucci, A., Naclerio, G., Baccigalupi, L., Cutting, S. M., Ricca, E., & Iossa, S. (2017). Beneficial effects of carotenoid-producing cells of *Bacillus indicus* HU16 in a rat model of diet-induced metabolic syndrome. *Beneficial microbes*, 8(5), 823–831. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0025>
- D'Auria, G., Peris-Bondia, F., Džunková, M., Mira, A., Collado, M. C., Latorre, A., & Moya, A. (2013). Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core. *Scientific reports*, 3, 3515. <https://doi.org/10.1038/srep03515>
- de Almada, C. N., Nunes de Almada, C., Martinez, R. C., & Sant'Ana, A. (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(10), 4175–4199. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6582-5>
- De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2013). 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. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 80, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.032>
- Deb, D., Das, S., Adak, A., & Khan, M. R. (2020). Traditional rice beer depletes butyric acid-producing gut bacteria *Faecalibacterium* and *Roseburia* along with fecal butyrate levels in the ethnic groups of Northeast India. *3 Biotech*, 10(6), 283. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02280-8>
- Dengler, F., Rackwitz, R., Benesch, F., Pfannkuche, H., & Gäbel, G. (2015). Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 99(2), 379–390. <https://doi.org/10.1111/jpn.12201>
- Devaraj, S., Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes. *Clinical chemistry*, 59(4), 617–628. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.187617>
- Dvořáková, M., Hulín, P., Karabín, & M., Dostálek, P. (2007). Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(4), 182–188.
- Eid, H. M., Wright, M. L., Anil Kumar, N. V., Qawasmeh, A., Hassan, S., Mocan, A., Nabavi, S. M., Rastrelli, L., Atanasov, A. G., & Haddad, P. S. (2017). Significance of Microbiota in Obesity and Metabolic Diseases and the Modulatory Potential by Medicinal Plant and Food Ingredients. *Frontiers in pharmacology*, 8, 387. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00387>
- Elshaghabee, F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Engen, P. A., Green, S. J., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2015). The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol research : current reviews*, 37(2), 223–236.

- Ericsson, A. C., & Franklin, C. L. (2015). Manipulating the Gut Microbiota: Methods and Challenges. *ILAR journal*, 56(2), 205–217. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv021>
- Estrada-Velasco, B. I., Cruz, M., Garcia-Mena, J., Valladares Salgado, A., Peralta Romero, J., Guna Serrano, M., Madrid-Marina, V., Orbe Orihuela, C., López Islas, C., & Burguete-García, A. I. (2014). La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético [Childhood obesity is associated to the interaction between firmicutes and high energy food consumption]. *Nutricion hospitalaria*, 31(3), 1074–1081. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8302>
- Faust, K., & Raes, J. (2016). CoNet app: Inference of biological association networks using Cytoscape. *F1000 Research*, 5, 1519. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9050.2>
- Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C. L., & Knight, R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17994–17999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807920105>
- Franco, L., Bravo, R., Galán, C., Sánchez, C., Rodríguez, A.B., Barrigs, C., & Cubero, J. (2013). Effects of beer, Hops (*Humulus lupulus*) on total antioxidant capacity in plasma of stressed subjects. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 5(1), 232–235.
- García-Mena, J., Murugesan, S., Pérez-Muñoz, A. A., 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, M. T. (2016). Airborne Bacterial Diversity from the Low Atmosphere of Greater Mexico City. *Microbial ecology*, 72(1), 70–84. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0747-3>
- Gerber G. K. (2014). The dynamic microbiome. *FEBS letters*, 588(22), 4131–4139. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.037>

- Gerhäuser C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 41(13), 1941–1954. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.012>
- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P., & Scaccini, C. (2000). Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(2), 76–80. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(99\)00077-7](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(99)00077-7)
- Guo, X., Li, J., Tang, R., Zhang, G., Zeng, H., Wood, R. J., & Liu, Z. (2017). High Fat Diet Alters Gut Microbiota and the Expression of Paneth Cell-Antimicrobial Peptides Preceding Changes of Circulating Inflammatory Cytokines. *Mediators of inflammation*, 2017, 9474896. <https://doi.org/10.1155/2017/9474896>
- Haro, C., Rangel-Zúñiga, O. A., Alcalá-Díaz, J. F., Gómez-Delgado, F., Pérez-Martínez, P., Delgado-Lista, J., Quintana-Navarro, G. M., Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Tena-Sempere, M., Clemente, J. C., López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., & Camargo, A. (2016). Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PloS one*, 11(5), e0154090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154090>
- Hernández-Avila, M., Romieu, I., Parra, S., Hernández-Avila, J., Madrigal, H., & Willett, W. (1998). Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico City. *Salud publica de Mexico*, 40(2), 133–140. <https://doi.org/10.1590/s0036-36341998000200005>
- Hiippala, K., Kainulainen, V., Kalliomäki, M., Arkkila, P., & Satokari, R. (2016). Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp. *Frontiers in microbiology*, 7, 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01706>
- Hsieh, M. C., Tsai, W. H., Jheng, Y. P., Su, S. L., Wang, S. Y., Lin, C. C., Chen, Y. H., & Chang, W. W. (2018). The beneficial effects of *Lactobacillus reuteri* ADR-1 or ADR-3 consumption on type 2 diabetes mellitus: a randomized,

- double-blinded, placebo-controlled trial. *Scientific reports*, 8(1), 16791. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35014-1>
- Iniguez, A. B., & Zhu, M. J. (2020). Hop bioactive compounds in prevention of nutrition-related noncommunicable diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1–14. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1767537>
- Jha, A. R., Davenport, E. R., Gautam, Y., Bhandari, D., Tandukar, S., Ng, K. M., Fragiadakis, G. K., Holmes, S., Gautam, G. P., Leach, J., Sherchand, J. B., Bustamante, C. D., & Sonnenburg, J. L. (2018). Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. *PLoS biology*, 16(11), e2005396. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005396>
- Jiang, W., Wu, N., Wang, X., Chi, Y., Zhang, Y., Qiu, X., Hu, Y., Li, J., & Liu, Y. (2015). Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific reports*, 5, 8096. <https://doi.org/10.1038/srep08096>
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., & Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60(5), 631–637. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263>
- Khochamit, N., Siripornadulsil, S., Sukon, P., & Siripornadulsil, W. (2015). Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. *Microbiological research*, 170, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.004>
- Korpela, K., Blakstad, E. W., Moltu, S. J., Strømme, K., Nakstad, B., Rønnestad, A. E., Brække, K., Iversen, P. O., Drevon, C. A., & de Vos, W. (2018). Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Scientific reports*, 8(1), 2453. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20827-x>
- Lancaster, F. E., & Spiegel, K. S. (1992). Alcoholic and nonalcoholic beer drinking during gestation: offspring growth and glucose metabolism. *Alcohol*

- (Fayetteville, N. Y.), 9(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(92\)90003-S](https://doi.org/10.1016/0741-8329(92)90003-S)
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Lecomte, V., Kaakoush, N. O., Maloney, C. A., Raipuria, M., Huinao, K. D., Mitchell, H. M., & Morris, M. J. (2015). Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS one*, 10(5), e0126931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126931>
- Lee, E., Jung, S. R., Lee, S. Y., Lee, N. K., Paik, H. D., & Lim, S. I. (2018). *Lactobacillus plantarum* Strain Ln4 Attenuates Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Changes in Hepatic mRNA Levels Associated with Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients*, 10(5), 643. <https://doi.org/10.3390/nu10050643>
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in microbiology*, 157(9), 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.07.004>
- Legette, L. L., Luna, A. Y., Reed, R. L., Miranda, C. L., Bobe, G., Proteau, R. R., & Stevens, J. F. (2013). Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. *Phytochemistry*, 91, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.018>
- Li, P., Liu, A., Xiong, W., Lin, H., Xiao, W., Huang, J., Zhang, S., & Liu, Z. (2020). Catechins enhance skeletal muscle performance. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(3), 515–528. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1549534>
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome medicine*, 8(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>

- Luerce, T. D., Gomes-Santos, A. C., Rocha, C. S., Moreira, T. G., Cruz, D. N., Lemos, L., Sousa, A. L., Pereira, V. B., de Azevedo, M., Moraes, K., Cara, D. C., LeBlanc, J. G., Azevedo, V., Faria, A., & Miyoshi, A. (2014). Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut pathogens*, 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-33>
- Mao, L., & Franke, J. (2015). Symbiosis, dysbiosis, and rebiosis—the value of metaproteomics in human microbiome monitoring. *Proteomics*, 15(5-6), 1142–1151. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400329>
- Martínez, I., Lattimer, J. M., Hubach, K. L., Case, J. A., Yang, J., Weber, C. G., Louk, J. A., Rose, D. J., Kyureghian, G., Peterson, D. A., Haub, M. D., & Walter, J. (2013b). Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *The ISME journal*, 7(2), 269–280. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.104>
- Martínez, I., Perdicaro, D. J., Brown, A. W., Hammons, S., Carden, T. J., Carr, T. P., Eskridge, K. M., & Walter, J. (2013a). Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters. *Applied and environmental microbiology*, 79(2), 516–524. <https://doi.org/10.1128/AEM.03046-12>
- Mateo-Gallego, R., , Moreno-Indias, I., , Bea, A. M., , Sánchez-Alcoholado, L., , Fumanal, A. J., , Quesada-Molina, M., , Prieto-Martín, A., , Gutiérrez-Repiso, C., , Civeira, F., , & Tinahones, F. J., (2021). An alcohol-free beer enriched with isomaltulose and a resistant dextrin modulates gut microbiome in subjects with type 2 diabetes mellitus and overweight or obesity: a pilot study. *Food & function*, 12(8), 3635–3646. <https://doi.org/10.1039/d0fo03160g>
- Maya-Lucas, O., Murugesan, S., Nirmalkar, K., Alcaraz, L. D., Hoyo-Vadillo, C., Pizano-Zárate, M. L., & García-Mena, J. (2019). The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe*, 55, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.009>

- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Moeller, A. H., Degnan, P. H., Pusey, A. E., Wilson, M. L., Hahn, B. H., & Ochman, H. (2012). Chimpanzees and humans harbour compositionally similar gut enterotypes. *Nature communications*, *3*, 1179. <https://doi.org/10.1038/ncomms2159>
- Moreno-Indias, I. (2017). Beneficios de los polifenoles contenidos en la cerveza sobre la microbiota intestinal [Benefits of the beer polyphenols on the gut microbiota]. *Nutricion hospitalaria*, *34*(Suppl 4), 41–44. <https://doi.org/10.20960/nh.1570>
- Moreno-Indias, I., Sánchez-Alcoholado, L., Pérez-Martínez, P., Andrés-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2016). Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & function*, *7*(4), 1775–1787. <https://doi.org/10.1039/c5fo00886g>
- Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shah, S. A., LeLeiko, N., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome biology*, *13*(9), R79. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
- Mukamal, K. J., Conigrave, K. M., Mittleman, M. A., Camargo, C. A., Jr, Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Rimm, E. B. (2003). Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *The New England journal of medicine*, *348*(2), 109–118. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022095>
- Muñiz Pedrego, D. A., Jensen, M. D., Van Dyke, C. T., Murray, J. A., Woods, J. A., Chen, J., Kashyap, P. C., & Nehra, V. (2018). Gut Microbial Carbohydrate Metabolism Hinders Weight Loss in Overweight Adults Undergoing Lifestyle

- Intervention With a Volumetric Diet. *Mayo Clinic proceedings*, 93(8), 1104–1110. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.02.019>
- Murugesan, S., Nirmalkar, K., García-Espitia, M., Pizano-Zárate, M. L., Hoyo-Vadillo, C., & Garcia-Mena, J. (2017). Current Insight into the Role of Gut Microbiota in Mexican Childhood Obesity. *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-Zárate, M. L., Hoyo-Vadillo, C., & García-Mena, J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 34(7), 1337–1346. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2355-4>
- Murugesan, S., Ulloa-Martinez, M., Maya, O., Pizano-Zárate, M. L., Galván-Rodríguez, F. M. Miranda-Brito, C., Romano, M., Piña-Escobedo, A., Hoyo-Vadillo, C. & García-Mena, J. (2016). The role of the colon microbiota in the Mexican children obesity. *Journal of the International Society of Microbiota*, 3(3). DOI 10.18143/JISM_v3i1_1625.
- Nakayama, J., Yamamoto, A., Palermo-Conde, L. A., Higashi, K., Sonomoto, K., Tan, J., & Lee, Y. K. (2017). Impact of Westernized Diet on Gut Microbiota in Children on Leyte Island. *Frontiers in microbiology*, 8, 197. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00197>
- Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C., & Ghiselli, A. (2006). Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *The Journal of nutritional biochemistry*, 17(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.026>
- Nirmalkar, K., Murugesan, S., Pizano-Zárate, M. L., Villalobos-Flores, L. E., García-González, C., Morales-Hernández, R. M., Nuñez-Hernández, J. A., Hernández-Quiroz, F., Romero-Figueroa, M., Hernández-Guerrero, C., Hoyo-Vadillo, C., & García-Mena, J. (2018). Gut Microbiota and Endothelial

- Dysfunction Markers in Obese Mexican Children and Adolescents. *Nutrients*, 10(12), 2009. <https://doi.org/10.3390/nu10122009>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federación*, http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5502882&fecha=30/10/2017
- Nuttall F. Q. (2015). Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutrition today*, 50(3), 117–128. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000092>
- Ogawa, J., Kodera, T., Smirnov, S. V., Hibi, M., Samsonova, N. N., Koyama, R., Yamanaka, H., Mano, J., Kawashima, T., Yokozeki, K., & Shimizu, S. (2011). A novel L-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(6), 1929–1938. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2983-7>
- Osorio-Paz, I., Brunauer, R., & Alavez, S. (2019). Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-14. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1696278>
- Park, J. A., Tirupathi Pichiah, P. B., Yu, J. J., Oh, S. H., Daily, J. W., 3rd, & Cha, Y. S. (2012). Anti-obesity effect of kimchi fermented with *Weissella koreensis* OK1-6 as starter in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Journal of applied microbiology*, 113(6), 1507–1516. <https://doi.org/10.1111/jam.12017>
- Parkar, S. G., Trower, T. M., & Stevenson, D. E. (2013). Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, 23, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.07.009>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>

- Peterson K. (2004). Biomarkers for alcohol use and abuse--a summary. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 28(1), 30–37.
- Pincherle, G., & Shanks, J. (1967). Value of the erythrocyte sedimentation rate as a screening test. *British journal of preventive & social medicine*, 21(3), 133–136. <https://doi.org/10.1136/jech.21.3.133>
- Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., Cardona Diaz, F., Andrés-Lacueva, C., & Tinahones, F. J. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American journal of clinical nutrition*, 95(6), 1323–1334. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.027847>
- Quesada-Molina, M., Muñoz-Garach, A., Tinahones, F. J., & Moreno-Indias, I. (2019). A New Perspective on the Health Benefits of Moderate Beer Consumption: Involvement of the Gut Microbiota. *Metabolites*, 9(11), 272. <https://doi.org/10.3390/metabo9110272>
- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food chemistry*, 169, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154>
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Rastmanesh R. (2011). High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chemico-biological interactions*, 189(1-2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.10.002>
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., & Mazmanian, S. K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6032), 974–977. <https://doi.org/10.1126/science.1206095>

- Russell, W. R., Duncan, S. H., Scobbie, L., Duncan, G., Cantlay, L., Calder, A. G., Anderson, S. E., & Flint, H. J. (2013). Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Molecular nutrition & food research*, *57*(3), 523–535. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200594>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, *12*(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Sierksma, A., van der Gaag, M. S., Kluff, C., & Hendriks, H. F. (2002). Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *European journal of clinical nutrition*, *56*(11), 1130–1136. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601459>
- Steenackers, B., De Cooman, L., & De Vos, D. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. *Food chemistry*, *172*, 742–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Stevens, J. F., & Page, J. E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochemistry*, *65*(10), 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
- Sun, L., Ma, L., Ma, Y., Zhang, F., Zhao, C., & Nie, Y. (2018). Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. *Protein & cell*, *9*(5), 397–403. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0546-3>
- Tamura, K., Hemsworth, G. R., Déjean, G., Rogers, T. E., Pudlo, N. A., Urs, K., Jain, N., Davies, G. J., Martens, E. C., & Brumer, H. (2017). Molecular Mechanism by which Prominent Human Gut Bacteroidetes Utilize Mixed-Linkage Beta-Glucans, Major Health-Promoting Cereal Polysaccharides. *Cell reports*, *21*(2), 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.049>
- Tanca, A., Abbondio, M., Palomba, A., Fraumene, C., Manghina, V., Cucca, F., Fiorillo, E., & Uzzau, S. (2017). Potential and active functions in the gut

- microbiota of a healthy human cohort. *Microbiome*, 5(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0293-3>
- Tenorio-Jiménez, C., Martínez-Ramírez, M. J., Tercero-Lozano, M., Arraiza-Irigoyen, C., Del Castillo-Codes, I., Olza, J., Plaza-Díaz, J., Fontana, L., Migueles, J. H., Olivares, M., Gil, Á., & Gomez-Llorente, C. (2018). Evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* V3401 on biomarkers of inflammation, cardiovascular risk and liver steatosis in obese adults with metabolic syndrome: a randomized clinical trial (PROSIR). *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2371-x>
- Van den Bogert, B., Meijerink, M., Zoetendal, E. G., Wells, J. M., & Kleerebezem, M. (2014). Immunomodulatory properties of *Streptococcus* and *Veillonella* isolates from the human small intestine microbiota. *PloS one*, 9(12), e114277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114277>
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Knight, R., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5975), 228–231. <https://doi.org/10.1126/science.1179721>
- Vogt T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Walsh, C. J., Guinane, C. M., Hill, C., Ross, R. P., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2015). In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. *BMC microbiology*, 15, 183. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0515-4>
- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2013). Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Molecular autism*, 4(1), 42. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-42>

- World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organization - Technical Report Series, 1-268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15268-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15268-3).
- Wu, F., Guo, X., Zhang, J., Zhang, M., Ou, Z., & Peng, Y. (2017). *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(4), 3122–3126. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4878>
- Yoo, M. G., Kim, H. J., Jang, H. B., Lee, H. J., & Park, S. I. (2016). The Association between Alcohol Consumption and β -Cell Function and Insulin Sensitivity in Korean Population. *International journal of environmental research and public health*, 13(11), 1133. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111133>
- Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Ikeuchi, M., Kinehara, M., & Ashida, H. (2006). Genetic modification of *Bacillus subtilis* for production of D-chiro-inositol, an investigational drug candidate for treatment of type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1310–1315. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1310-1315.2006>
- Zakharkina, T., Heinzl, E., Koczulla, R. A., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J. K., Baumbach, J., Herrmann, M., Grünewald, C., Dienemann, H., von Müller, L., & Bals, R. (2013). Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PloS one*, 8(7), e68302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068302>
- Zapata, H. J., & Quagliarello, V. J. (2015). The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. *Journal of the American Geriatrics Society*, 63(4), 776–781. <https://doi.org/10.1111/jgs.13310>
- Zhao, P., Xue, Y., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D., Feng, S., Bai, X., Zuo, Y., & Li, P. (2018). Actinobacteria-Derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides*, 103, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.03.011>

13. Anexos

Anexo 1: Lista de métodos

13.1 Instrucciones para toma de muestras de heces	80
13.2 Análisis de los componentes de la cerveza	80
13.3 Extracción de ácidos grasos de cadena corta de muestras de heces	81
13.4 Medición de ácidos grasos de cadena corta	82
13.5 Extracción de componentes fenólicos en cerveza	82
13.6 Extracción de componentes fenólicos en suero	83
13.7 Análisis de los componentes polifenólicos de cerveza y suero con HPLC	83
13.8 Extracción de DNA de muestras fecales	84
13.9 Preparación de genotecas con la región V3 del gen 16S ribosomal	85
13.10 Secuenciación masiva de genotecas con la región V3 del gen 16S ribosomal	86

13.1. Instrucciones para toma de muestra de heces

Debe proveérsele un recipiente limpio para colectar 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 colectar 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 manténganlo en refrigeración hasta el momento en el que entregue la muestra.

13.2 Análisis de los componentes de la cerveza

- a) Tomar 100 de cerveza en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- b) Sonicar las durante 2 horas al mismo tiempo que se les inyecta Nitrógeno gaseoso para eliminar el gas y el alcohol.
- c) Una vez terminado el proceso, acidificar usando ácido clorhídrico al 37%.

- d) En un colector Visiprep SPE activar cartuchos de C18 pasándoles 1 mL de metanol absoluto grado HPLC y enseguida 2 mL de agua desionizada, usando una bomba de vacío.
- e) Pasar de la misma forma 5 mL de cerveza.
- f) Cambiar los tubos de vidrio de 10 mL del colector y pasar 2.4 mL de acetonitrilo absoluto grado HPLC para recuperar los polifenoles.
- g) Una vez recuperados los polifenoles se elimina el acetonitrilo mediante nitrógeno gaseoso, para conservar los polifenoles.
- h) Resuspender los polifenoles con ácido fórmico al 0.1% (en agua grado HPLC).
- i) Almacenar a -20 °C, hasta su análisis.
- j) En una columna de fenilo de 25 cm x 4.6 mm, 5 µm, fraccionar las muestras mediante un Agilent 6420 Triple Quadrupole LC-MS Mass Spectrometer System (ESI-QqQ-MS).
- k) Usar de fase móvil metanol y agua ácida (ácido fórmico al 1%) en una proporción gradiente de 10-50%.
- l) Ionizar las moléculas de la muestra usando 135 eV de energía del fragmentador con el modo de exploración m/z de 100 a 1000.

13.3 Extracción de ácidos grasos de cadena corta de muestras de heces

- a) Tomar una alícuota de heces en un tubo de polipropileno de 1.5 mL, y tomar su peso inicial.
- b) Dejar los tubos abiertos dentro de un recipiente cerrado herméticamente con sales de cloruro de calcio.
- c) Revisar su peso cada 3 días hasta llegar a peso constante.
- d) Tomar 100 mg de heces deshidratadas para hidratarlas con 1mL de agua desionizada.
- e) Vortexear durante 2 minutos a máxima velocidad, y centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos.
- f) Recuperar el sobrenadante.

- g) En un colector Visiprep SPE activar cartuchos de C18 pasándoles 1 mL de etanol absoluto grado HPLC y enseguida 1 mL de agua desionizada, usando una bomba de vacío.
- h) Agregar los sobrenadantes de la muestras y activar el vacío.
- i) Cambiar los tubos de vidrio de 10 mL del colector y agregar 1 mL de etanol absoluto grado HPLC para recuperar los ácidos grasos de cadena corta.
- j) Pasar el contenido de los tubos de vidrio de 10 mL a tubos de polipropileno de 1.5 mL.
- k) Almacenar en refrigeración las muestras hasta su análisis, en caso de ver sedimento, centrifugar las muestras a 10,000 rpm durante 10 y recuperar el sobrenadante.

13.4 Medición de ácidos grasos de cadena corta

- a) Acondicionar el equipo HPLC PerkinElmer, usando 1 mL de flujo con fosfato monobásico de sodio y acetonitrilo (80:20), y columna de C18 de 15 cm x 4.6 mm, 5 µm.
- 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) Realizar una curva de calibración con el tiempo de retención y altura de los picos 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) Con la curva de calibración, calcular la concentración de AGCC de las muestras.

13.5 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.

13.6 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.

13.7 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) y columna de C18 de 15 cm x 4.6 mm, 5 μ m.

- 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) Realizar una curva de calibración con el tiempo de retención y altura del pico 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 usando la curva de curva de calibración.

13.8 Extracción de DNA de muestras fecales

- 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 porta columna.
- k) Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto y descartar el contenido del porta columna.

- l) Añadir 750 µl de buffer de lavado y centrifugar a máxima velocidad 1 minuto y descartar el contenido del porta columna.
- m) Repetir el paso anterior.
- n) Cambiar el porta columna 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.

13.9 Preparación de genotecas con la región V3 del gen 16S ribosomal

- a) Al producto de amplificación de la región V3 del gen 16S ribosomal 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 semiconductora de iones (Figura 10).
- b) Realizar una PCR con las condiciones descritas en las Tablas 1 y 2.
- 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 16S ribosomal 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 obtiene 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.

13.10 Secuenciación masiva de genotecas con la región V3 del gen 16S ribosomal

Las genotecas de muestras fecales se analizarán y se acondicionará 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 fluorometro 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 con 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.

- i) La asignación taxonómica se realizará mediante el alineamiento de las secuencias contra la base de datos Green Genes.

Anexo 2: Tablas suplementarias

Tabla S1.	Lista de barcodes.	88
Tabla S2.	Cálculo de tamaño de muestra y poder estadístico de los datos obtenidos.	89
Tabla S3.	Ácidos fenólicos identificados mediante cromatograma de iones totales en cerveza sin alcohol.	89
Tabla S4.	Ácidos fenólicos identificados mediante cromatograma de iones totales en cerveza con alcohol.	93
Tabla S5.	Todas las variables cuantificadas durante la intervención con cerveza sin alcohol.	99
Tabla S6.	Todas las variables cuantificadas durante la intervención con cerveza con alcohol.	100
Tabla S7.	Análisis LEfSe de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol.	101
Tabla S8.	Análisis LEfSe de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza con alcohol.	101
Tabla S9.	Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza sin alcohol en el día 1.	102
Tabla S10.	Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza sin alcohol en el día 30.	103
Tabla S11.	Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza con alcohol en el día 1.	103
Tabla S12.	Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza con alcohol en el día 30.	104
Tabla S13.	Comparaciones estadísticas para el género masculino durante el consumo de cerveza sin alcohol.	104
Tabla S14.	Comparaciones estadísticas para el género femenino durante el consumo de cerveza sin alcohol.	105
Tabla S15.	Comparaciones estadísticas para el género masculino durante el consumo de cerveza con alcohol.	106
Tabla S16.	Comparaciones estadísticas para el género femenino durante el consumo de cerveza con alcohol.	107

Tabla S1. Lista de barcodes.

Nombre del primer	ION TORRENT LINKER	GOLAY BARCODE	Espaciador	16S rRNA Primer (5'-3')
V3-341 F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GATCTGCGATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGCTCATCAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAACAACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCAACACCATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCGATATATCGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGCAATCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCGTGCACAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GTATCTGCGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGGGAAAGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAATTCGGGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATTGACCAAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTTACGAGCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCATATGCACTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAACTCCCCTGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGCGTTAGCAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGAGCCCTAA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CACTACGCTAGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGCAGTCTCGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCATAGCTCCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGGACATCTCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAACACTTTGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAGCCATCTGTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGGGTACACGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGGCCTCCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAATACGGATCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGGAATTAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGTGAATTCGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CATTCGTGGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACGCACGCTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACTGTTCATG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGACGATGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCTCATGGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCACGGTATG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACCGTCAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCACGAGCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGACCACTCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGCGACTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGATCGTCAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCTTGACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACTGTGCGTAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCGCAGAGTCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGTGAGTGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGATTGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACTGCGTACT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCAGTCGCGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGACGCACTGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F47	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGAGATGTCGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F48	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGCAGTGGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F49	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTACTCAGTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F50	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGACAGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-518 R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	NOT APPLICABLE	CC	ATTACCGCGGTGCTGG

Tabla S2. Cálculo de tamaño de muestra y poder estadístico de los datos obtenidos.

Índices	Día 1	Día 30	N calculada	TE	PE
Cerveza sin alcohol (70)					
Observed	2505.29 ± 915.67	3197.03 ± 1618.44	47	0.49	0.95
Chao1 index	4639.56 ± 1459.98	5726.03 ± 2319.74	40	0.53	0.95
Shannon index	4.49 ± 0.37	4.70 ± 0.38	36	0.56	0.95
Simpson index	0.96 ± 0.02	0.97 ± 0.02	45	0.50	0.95
Cerveza con alcohol (66)					
Observed	2695.81 ± 1071.01	3217.76 ± 935.94	42	0.52	0.95
Chao1 index	5118.86 ± 1786.77	5725.86 ± 1326.97	78	0.37	0.95
Shannon index	4.72 ± 0.53	4.63 ± 0.49	351	0.18	0.95
Simpson index	0.97 ± 0.02	0.96 ± 0.05	207	0.23	0.95

Los datos muestran la media ± desviación estándar como se indica (ver Tabla 8). TE; Tamaño del efecto, PE; El poder estadístico se calculó utilizando *A priori*, valores TE ≥ 0,50 se consideran efectos moderados; El poder estadístico indica la probabilidad de error 1-β.

Tabla S3. Ácidos fenólicos identificados mediante cromatograma de iones totales en cerveza sin alcohol.

Pico 1			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	2.12
Catechin-O-hexoside II	451.1	453.3	2.12
Sinapic acid-O-hexoside I	385.1	383.0	1.81
		382.0	2.20
		381.1	14.86
Sinapic acid-O-hexoside II	385.1	383.0	1.81
		382.0	2.20
		381.1	14.86
Feruloylquinic acid	367.1	367.0	3.58
		366.1	13.06
		365.1	100.00
3,7-Dimethylquercetin	329.1	325.1	1.50
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	325.1	1.50
Vanillic acid	167.0	163.0	1.80
p-Coumaric acid	163.0	163.0	1.80
Pico 2			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	325.0	1.39
Feruloylquinic acid	367.1	367.1	3.60
Sinapic acid-O-hexoside I	385.1	383.0	1.81
Sinapic acid-O-hexoside II	385.1	383.0	1.81
Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	2.04
Catechin-O-hexoside II	451.1	453.3	2.04
Sinapic acid	223.1	221.0	2.17
p-Coumaric acid	163.0	163.0	1.29
Petudinin-3-glucoside	479.4	476.3	1.95
Pico 3			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Catechin-O-dihexoside	613.2	615.5	3.00
Quercetin-3-O-glucoside	463.1	461.3	8.39
Catechin-O-hexoside II	451.1	453.3	100.00

Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	100.00
Kaempferol-3-O-glucoside	447.1	446.1	5.68
		444.2	3.05
Feruloylquinic acid	367.1	369.2	3.11
		365.1	5.94
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	326.3	2.98
3,7-Dimethylquercetin	329.1	326.3	2.98
Pico 4			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Gallic acid	169.0	166.2	4.45
4-Vinylguaicol	149.1	148.9	2.70
Caffeic acid-O-hexoside I	341.1	340.4	3.11
Caffeic acid-O-hexoside II	341.1	340.4	3.11
Protocatechuic acid	153.0	153.1	13.41
Catechin	289.1	291.3	5.73
Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	100.00
Neochlorogenic acid 3-caffeoylquinic acid	353.1	352.2	2.07
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	153.1	13.14
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	326.1	3.98
4-Hydroxybenzoic acid	137.0	136.9	2.24
Epicatechin	289.1	291.3	5.73
1-Caffeoylquinic acid	353.1	352.2	2.07
Vanillic acid	167.0	166.2	4.45
Chlorogenic acid 5-caffeoylquinic acid	353.1	352.2	2.07
Caffeic acid	179.0	180.9	2.88
Feruloylquinic acid	367.1	369.0	3.09
Cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)	353.1	352.2	2.07
p-Coumaric acid	163.0	163.1	3.90
Sinapic acid-O-hexoside I	385.1	387.1	4.69
Ferulic acid-O-hexoside	355.1	352.2	2.07
Indole-3-carboxylic acid	174.1	175.0	6.30
Ferulic acid	193.1	195.0	2.68
Sinapic acid	223.1	223.0	4.00
3,7-Dimethylquercetin	329.1	326.1	3.78
Isoxanthohumol	353.1	352.2	2.07
8-Prenylnaringenin	339.1	340.4	3.11
Pico 5			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Gallic acid	169.0	172.8	3.44
4-Vinylguaicol	149.1	149.0	2.44
Caffeic acid-O-hexoside I	341.1	341.0	2.31
Caffeic acid-O-hexoside II	341.1	341.0	2.31
Protocatechuic acid-O-hexoside	315.1	314.0	2.74
Protocatechuic acid	153.0	153.1	3.59
Catechin	289.1	291.2	74.64
Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	100.00
Catechin-O-hexoside II	451.1	453.3	100.00
Neochlorogenic acid 3-caffeoylquinic acid	353.1	351.2	4.72
1-Caffeoylquinic acid	353.1	351.2	4.72
Chlorogenic acid 5-caffeoylquinic acid	353.1	351.2	4.72
Cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)	353.1	351.2	4.72
Isoxanthohumol	353.1	351.2	4.72
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	150.9	2.40

Hydroxyphenyl acetic acid II	151.0	150.9	2.40
Hydroxyphenyl acetic acid III	151.0	150.9	2.40
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	326.0	3.06
4-Hydroxybenzoic acid	137.0	136.9	2.46
Epicatechin	289.1	291.2	74.64
Vanillic acid	167.0	168.1	0.86
Caffeic acid	179.0	177.2	3.84
Feruloylquinic acid	367.1	369.2	2.90
p-Coumaric acid	163.0	164.0	0.37
Sinapic acid-O-hexoside I	385.1	387.1	3.29
Sinapic acid-O-hexoside II	385.1	387.1	3.29
Indole-3-carboxylic acid	174.1	175.0	5.31
Ferulic acid	193.1	194.9	5.10
Sinapic acid	223.1	222.8	2.32
3,7-Dimethylquercetin	329.1	326.0	3.06
8-Prenylnaringenin	339.1	340.4	3.27
6-Prenylnaringenin	339.1	340.4	3.27
Pico 6			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Catechin-O-dihexoside	613.2	615.0	3.30
Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	100.00
Catechin-O-hexoside II	451.1	453.3	100.00
Feruloylquinic acid	367.1	369.1	3.37
Chlorogenic acid 5-caffeoylquinic acid	353.1	351.1	3.41
1-Caffeoylquinic acid	353.1	351.1	3.41
6-Prenylnaringenin	339.1	340.4	2.42
8-Prenylnaringenin	339.1	340.4	2.42
3,7-Dimethylquercetin	329.1	327.1	2.10
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	325.0	2.74
Epicatechin	289.1	291.0	20.27
Catechin	289.1	291.0	20.27
Ferulic acid	193.1	194.9	3.15
Caffeic acid	179.0	176.9	3.16
Indole-3-carboxylic acid	174.1	175.1	2.43
Gallic acid	169.0	170.8	1.78
Protocatechuic acid	153.0	153.7	2.81
4-Vinylguaicol	149.1	147.0	5.04
4-Hydroxybenzoic acid	137.0	139.0	1.81
Pico 7			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
4-Vinylguaicol	149.1	146.9	1.06
Caffeic acid-O-hexoside I	341.1	343.2	1.05
Caffeic acid-O-hexoside II			
Protocatechuic acid	153.0	154.0	1.11
Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	100.00
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	154.0	1.49
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	326.2	1.11
Hydroxyphenyl acetic acid II	151.0	154.0	100.00
Catechin-O-hexoside II	451.2	453.3	1.12
Caffeic acid	179.0	182.1	1.11
Hydroxyphenyl acetic acid III	151.0	154.0	1.87
Sinapic acid	223.1	227.1	3.34
Apigenin-C-hexoside	431.1	435.3	1.44

3,7-Dimethylquercetin	329.1	326.2	1.05
8-Prenylnaringenin	339.1	343.2	1.05
6-Prenylnaringenin			
Cohumulone II	347.2	343.2	1.05
Iso- α -cohumulone	347.2	343.2	1.05
Pico 8			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
4-Vinylguaiacol	149.1	146.9	1.71
Caffeic acid-O-hexoside I	341.1	340.3	2.52
Caffeic acid-O-hexoside II	341.1	340.3	2.52
8-Prenylnaringenin	339.1	343.0	5.31
6-Prenylnaringenin	339.1	343.0	5.31
Caffeic acid-O-hexoside I	341.1	343.0	5.31
Caffeic acid-O-hexoside II	341.1	343.0	5.31
Caffeic acid-O-hexoside I	341.1	344.2	1.14
Caffeic acid-O-hexoside II	341.1	344.2	1.14
Catechin	289.1	287.5	1.04
Epicatechin	289.1	287.5	1.04
Neochlorogenic acid 3-caffeoylquinic acid	353.1	351.2	3.27
Cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)	353.1	351.2	3.27
Isoxanthohumol	353.2	351.2	3.27
1-Caffeoylquinic acid	353.1	351.2	3.27
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	326.3	3.93
Ferulic acid-O-hexoside	355.1	352.2	2.18
Catechin-O-hexoside I	451.1	453.3	100.00
Catechin-O-hexoside II	451.1	453.3	100.00
Catechin-O-hexoside I	451.1	454.3	27.68
Catechin-O-hexoside II	451.1	454.3	27.68
Coumaric acid-O-hexoside	325.1	326.3	3.93
Caffeic acid	179.0	182.1	3.09
3,7-Dimethylquercetin	329.1	326.3	3.93
Cohumulone I	347.2	344.2	1.14
Cohumulone II	347.2	344.2	1.14
Iso- α -cohumulone	347.2	344.2	1.14
Ad-humulone	361.2	359.4	2.63
n-Humulone	361.2	359.4	2.63
Iso- α -ad/n-humulone	361.2	359.4	2.63
Iso- α -ad/n-humulone	361.2	359.4	2.63
Pico 9			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
4-Vinylguaiacol	149.0	147.0	2.74
Caffeic acid-O-hexoside I	341.1	340.3	3.77
Caffeic acid-O-hexoside II	341.1	340.3	3.77
Catechin	289.1	287.6	1.55
Epicatechin	289.1	287.6	1.55
Catechin-O-hexoside I	451.1	452.5	1.13
Catechin-O-hexoside II	451.1	453.3	46.41
		454.3	13.58
Neochlorogenic acid 3-caffeoylquinic acid	353.1	352.3	4.36
1-Caffeoylquinic acid	353.1	352.3	4.36
Chlorogenic acid 5-caffeoylquinic acid	353.1	352.3	4.36
Cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)	353.1	352.3	4.36
Isoxanthohumol	353.1	351.3	2.23

Coumaric acid-O-hexoside	325.1	326.2	3.40
		327.0	1.15
Caffeic acid	179.0	177.0	1.33
Feruloylquinic acid	367.1	369.1	1.82
Sinapic acid-O-hexoside I	385.1	387.1	1.61
Sinapic acid-O-hexoside II	385.1	387.1	1.61
Ferulic acid-O-hexoside	355.1	355.1	1.08
Indole-3-carboxylic acid	174.1	177.0	1.33
Ferulic acid	193.1	195.0	1.03
3,7-Dimethylquercetin	329.1	326.2	3.40
		327.0	1.15
8-Prenylnaringenin	339.1	337.2	1.17
6-Prenylnaringenin	339.1	340.3	3.77
Cohumulone I	347.2	344.3	1.32
Cohumulone II	347.2	344.3	1.32
Iso- α -cohumulone	347.2	344.3	1.32
Ad-humulone	361.2	359.1	2.22
n-Humulone	361.2		
Iso- α -ad/n-humulone	361.2	362.3	1.01
Iso- α -ad/n-humulone	361.2		

m/z, Relación masa-carga; *datos de Quifer-Rada *et al.*, 2015; **dato de este trabajo; % abundancia, abundancia relativa del compuesto en cada pico.

Tabla S4. Ácidos fenólicos identificados mediante cromatograma de iones totales en cerveza con alcohol.

Pico 1			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Vanillic cid	167.0	165.9	2.51
Gallic acid	169.0	171.0	2.51
		172.9	5.86
4-Vinylguaiacol	149.1	144.0	2.65
		144.9	2.92
Hydrocyphenyl Acetic acid I	151.0	147.0	16.82
		147.9	2.64
Hydroxyphenyl Acetic acid I, II	151.0	148.8	2.86
		152.0	64.29
		153.0	9.54
		153.9	2.49
Protocatechuic acid-O-hexoside	315.1	314.0	9.61
		314.9	3.13
Protocatechuic acid	153.0	148.8	2.86
		152.0	64.27
		153.0	9.54
		153.9	2.49
Catechin	289.1	291.1	18.94
Catechin-o-di-hexoside	451.1	453.2	100.00
		454.1	22.86
		455.2	3.61
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	320.9	3.03
		326.2	5.91
Epicatechin	289.1	291.2	18.94
Catechin-o-hexoside II	451.2	453.2	100.00

		454.1	22.86
		455.2	3.61
Caffeic acid	179.0	175.0	7.03
		177.0	3.56
		182.8	3.25
Feruloylquinic acid	367.1	365.2	4.68
p-Coumaric acid	163.0	158.0	6.47
		158.9	11.75
		160.0	2.55
		161.0	5.22
		163.0	2.99
		165.9	2.51
Pico 2			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Gallic acid	169.0	171.0	2.35
		167.1	2.47
		166.0	2.32
4-vinylguaiacol	149.1	153.0	5.48
		152.0	29.24
		148.9	3.04
		147.0	13.83
		145.0	10.67
		144.0	2.22
Caffeic acid-o-hexoside I	341.1	336.9	2.20
Caffeic acid-o-hexoside II	341.1	336.9	2.20
Protocatechuic acid-o-hexoside	315.1	315.1	2.62
		314.0	7.20
		313.0	2.34
Protocatechuic acid	153.0	158.9	5.92
		157.9	5.25
		157.0	8.69
		153.0	5.48
		152.0	29.24
		148.9	3.04
Catechin	289.1	293.0	2.41
		291.2	20.47
Catechin-o-hexoside	451.1	454.2	18.20
		453.3	65.56
		451.1	2.38
Neochlorogenic acid 3-caffeoylquinic acid	353.1	355.1	2.60
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	153.0	5.48
		148.9	29.24
		148.9	3.04
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	329.0	2.22
		326.1	6.22
		321.0	2.78
4-Hydroxybenzoic acid	137.0	142.9	2.59
		138.9	3.39
		137.0	13.14
		136.0	24.75
		135.1	5.46
		133.0	3.93

Hydroxyphenil acetic acid II	151.0	153.0	5.48
		152.0	29.24
		148.9	3.04
Epicatechin	289.1	293.0	241.00
		291.2	20.47
1-Caffeoylquimic acid	353.1	355.1	2.60
Vanillic acid	167.0	152.9	5.93
		171.0	2.35
		167.1	2.47
		166.0	2.32
		162.9	3.20
Chlorogenic acid 5-caffeoylquimic acid	353.1	355.1	2.60
Catechin-o-hexoside II	451.1	454.2	18.21
		453.3	65.56
		451.1	2.38
Caffeic acid	179.0	183.0	2.76
		177.0	3.90
		175.0	6.96
Feruloylquimic acid	367.1	372.2	100.00
Cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquimic acid) isoxanthohumol	353.1	355.1	2.60
Hydroxyphenil acetic acid III	151.0	153.0	5.48
		152.0	29.24
		148.9	3.04
p-Coumaric acid	163.0	166.0	2.32
Pico 3			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Gallic acid	169.0	164.9	2.31
Vanillic acid	167.0		
p-Coumaric acid	163.0		
Quercetin-3-o-glucoside	463.1	468.3	8.92
Catechin-o-hexoside II	451.1	455.3	3.68
Catechin-o-hexoside I	451.1		
Catechin-o-hexoside II	451.1	453.3	100.00
Catechin-o-hexoside I	451.1		
Kaempferol-3-o-glucoside	447.1	444.0	2.72
Sinapic acid-o-hexoside II	385.1	380.2	7.65
Sinapic acid-o-hexoside I	385.1		
Feruloylquimic acid	367.1	372.1	58.06
		365.1	3.74
ad-Humulone	361.2	365.1	3.74
Iso-alfa-ad/n-humulone	361.2		
n-Humulone	361.2		
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	326.1	5.87
3,7-Dimethyl quercetin	329.0	---	---
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	320.9	2.80
Protocatechuic acid-o-hexoside	315.0	314.9	2.70
Protocatechuic acid-o-hexoside	315.0	314.0	7.77
Pico 4			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Galic acid	169.0	172.9	1.74
4-Vynilguaiacol	149.1	150.1	8.34

		150.9	2.43
Protocatechuic acid	153.0	153.0	9.78
		153.9	1.53
Hydroxyphenil acetic acid I	151.0	150.9	2.43
Hydroxyphenil acetic acid II	151.0		
Hydroxyphenil acetic acid III	151.0		
Protoatechuic acid-o-hexoside	315.1	311.0	2.88
		313.9	1.62
Catechin	289.1	291.1	6.39
		291.8	1.95
Epicatechin	289.1	291.1	6.39
		291.8	1.95
Catechin-o-hexoside I	451.1	453.3	64.26
		454.3	17.67
		455.3	2.76
Catechin-o-hexoside II	451.1	453.3	64.26
		454.3	17.67
		455.3	2.76
Neochlorogenic acid-3-caffeoylquinic acid	353.1	348.8	1.62
1-Caffeoylquinic acid		357.2	100.00
Chlorogenic acid-5-caffeoylquinic acid			
Cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)	353.1	357.2	100.00
Isoxanthohumol			
Ferulic acid-o-hexoside	355.1	357.2	100.00
Pico 5			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
4-Vinylguaiacol	149.0	148.9	1.73
Protocatechuic acid-o-hexoside	315.0	311.0	1.09
4-Hydroxibenzoic acid	137.0	136.9	1.06
Vanilic acid	167.0	167.0	1.73
Caffeic acid	179.0	178.8	1.23
p-Cumaric acid	163.0	162.9	1.80
Sinapic acid	223.0	223.0	2.31
Pico 6			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Indole-3-carboxylic acid	174.1	173.0	2.79
		174.0	3.01
p-Coumaric acid	163.0	161.1	1.15
Hydroxyphenyl acetic acid III	151.0	153.1	1.71
Hydroxyphenyl acetic acid II	151.0	153.1	1.71
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	153.1	1.71
Feruloylquinic acid	367.1	366.0	1.31
Caffeic acid	179.0	179.0	1.21
Catequin-o-hexoside II	451.1	451.1	1.63
Catequin-o-hexoside I	451.1	451.1	1.63
Epicatechin	289.1	291.2	100.00
Catechin	289.1	291.2	100.00
4-Hydroxybenzoic acid	137.0	138.9	1.16
Iso-alfa-ad/n-humulone	361.2	366.0	1.31
Iso-alfa-ad/n-humulone	361.2	366.0	1.31

N-humulone	361.2	366.0	1.31
Ad-humulone	361.2	366.0	1.31
3,7-Dimethylquercetin	329.1	331.2	2.10
Catechin-o-dihexoside	613.1	617.3	1.92
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	326.1	1.01
Kaempferol-3-o-glucoside	447.1	451.1	1.63
Apigenin-c-hexoside	431.1	435.1	1.39
Sinapic acid	223.1	223.0	1.40
Apigenin-c-hexoside-c-pentaside	563.1	564.3	1.24
Pico 7			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Gallic acid	169.0	170.8	2.74
Vanillic acid	167.0	170.8	2.74
4-Vinylguaiacol	149.1	149.0	2.20
Caffeic acid-o-hexoside I	341.1	343.0	2.46
Caffeic acid-o-hexoside II	341.1	343.0	2.46
Protocatechule acid-o-hexoside	315.1	314.1	3.90
Protocatechule acid	153.0	153.0	3.41
Catechin	289.1	291.0	33.45
Epicatechin	289.1	291.0	33.45
Catechin-o-hexoside I	451.1	453.3	93.20
Kaempferol-3-o-glucoside	447.1	453.3	93.20
Neochlorogenic acid 3-caffeoylquinic acid	353.1	352.1	2.15
Chlorogenic acid 5-caffeoylquinic	353.1	352.1	2.15
Isoxanthohumol	353.1	352.1	2.15
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	149.0	2.20
Hydroxyphenyl acetic acid II	151.0	149.0	2.20
Hydroxyphenyl acetic acid III	151.0	149.0	2.20
Catechin-o-dihexoside	613.2	613.2	4.52
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	325.1	5.50
Pico 8			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Malvidin-3-glucoside	493.4	491.3	1.08
Pentunidin-3-glucoside	479.9	475.3	24.06
		476.4	6.82
		477.3	1.30
Catechin-o-hexoside I	451.1	455.3	4.52
Catechin-o-hexoside II	451.1	454.3	26.39
		453.3	100.00
Apigenin-c-hexoside	431.1	436.3	1.00
Pelargonidin-3-glucoside	433.4	435.3	3.07
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	326.2	1.28
3,7-Dimethylquercetin	329.1	326.2	1.28
Sinapic acid	223.1	227.2	1.12
4-Vinylguaiacol	149.1	147.0	1.27
Pico 9			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
Catechin-o-hexoside I	451.1	455.3	4.46
Catechin-o-hexoside II	451.1	454.3	28.49
		454.3	100.00

Apigenin-c-hexoside	431.1	435.3	3.27
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	326.2	1.18
3,7-dimethylquercetin	329.1	326.2	1.18
4-Vinylguaiacol	149.1	147.0	1.25
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	147.0	1.25
Hydroxyphenyl acetic acid II	151.0	147.0	1.25
Hydroxyphenyl acetic acid III	151.0	147.0	1.25
Pelargonidin-3-glucoside	433.4	435.3	3.27
Pentunidin-3-glucoside	479.4	477.3	1.82
		476.3	10.26
		475.3	37.79
Malvidin	331.3	326.2	1.18
Malvidin-3-glucoside	493.4	491.2	1.48
Pico 10			
Compuesto	m/z*	m/z**	% abundancia
4-Vinylguaiacol	149.1	147.1	2.82
Caffeic acid-o-hexoside I	341.1	343.3	7.05
Caffeic acid-o-hexoside II	341.1	343.3	7.05
Protocatechuic acid	153.0	157.0	1.12
Catechin	289.1	287.6	2.47
Catechin-o-hexoside I	451.1	452.3	1.29
Neochlorogenic acid 3-caffeoylquinic acid	353.1	352.0	3.51
Hydroxyphenyl acetic acid I	151.0	147.1	2.82
Coumaric acid-o-hexoside	325.1	326.1	4.37
Hydroxyphenyl acetic acid II	151.0	147.1	2.82
Epicatechin	289.1	287.6	2.47
1-Caffeoylquinic acid	353.1	352.0	3.51
Chlorogenic acid 5-caffeoylquinic acid	353.1		
Catechin-o-hexoside II	451.1	452.3	1.29
Caffeic acid	179.0	176.9	1.18
Feruloylquinic acid	367.1	362.1	1.39
Cryptochlorogenic acid	353.1	352.0	3.51
Hydroxyphenyl acetic acid III	151.0	147.2	1.43
p-coumaric acid	163.0	158.1	1.52
Ferulic acid-o-hexoside	355.1	359.3	2.32
Indole-3-carboxylic acid	174.1	174.9	1.65
Ferulic acid	193.1	194.9	1.13
Sinapic acid	223.1	222.9	1.05
Apigenin-c-hexoside	431.1	435.3	2.01
Kaempferol-3-o-glucoside	447.1	452.3	1.29
3,7-dimethylquercetin	329.1	326.1	4.37
Isoxanthohumol	353.1	352.0	3.51
8-PenylNaringenin	339.1	340.3	3.75
6-penylNaringenin	339.1	340.3	3.75
Cohumulone I	347.2	351.2	5.72
Cohumulone II	347.2		
Iso-alfa-cohumulone	347.2		
Ad-Humulone	361.2	362.1	1.39
n-Humulone			
Iso-alfa-ad/n-humulone			
Iso-alfa-ad/n-humulone			

m/z, Relación masa-carga; *datos de Quifer-Rada *et al.*, 2015; **dato de este trabajo; % abundancia, abundancia relativa del compuesto en cada pico.

Tabla S5. Todas las variables cuantificadas durante la intervención con cerveza sin alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Día 1	Día 15	Día 30	p-value ^a
Participantes (Masculino/Femenino)	35 (21/14)	35 (21/14)	35 (21/14)	ND
Edad (años)	28.77 ± 7.86	28.77 ± 7.86	28.77 ± 7.86	1.00
Peso (Kg)	69.60 ± 15.51	70.15 ± 15.81	68.85 ± 15.50	0.93
Altura (m)	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	1.00
IMC (Kg/m ²)	24.85 ± 4.08	25.04 ± 4.15	24.59 ± 4.10	0.84
Cintura	82.96 ± 12.03	82.27 ± 11.65	81.96 ± 12.08	0.94
Cadera	89.61 ± 9.05	89.25 ± 9.94	89.33 ± 10.04	0.96
ICC	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.05	0.92 ± 0.05	0.81
Presión sistólica (mmHg)	113.20 ± 10.99	114.29 ± 11.53	109.66 ± 11.15	0.19
Presión diastólica (mmHg)	72.74 ± 7.92	72.86 ± 11.86	71.29 ± 7.77	0.78
Pulso	69.34 ± 11.14	72.05 ± 12.28	72.05 ± 10.04	0.44 ^b
Bioquímica sanguínea				
Glucosa (70-99 mg/dL)	86.49 ± 5.95	84.74 ± 6.09	78.51 ± 7.64	****<0.01 ^b
Insulina (2.7-10.4 µU/mL)	10.52 ± 9.42	9.11 ± 7.13	9.70 ± 4.16	0.30
HOMA/ IR (< 3)	2.28 ± 2.10	1.89 ± 1.37	1.90 ± 0.89	0.56
CβF (%)	161.40 ± 129.50	180.40 ± 224.30	271.30 ± 268.40	****<0.01
Perfil lipídico				
Colesterol (<239 mg/dL)	197.63 ± 32.80	193.29 ± 38.48	197.14 ± 35.11	0.70
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	133.90 ± 114.40	114.90 ± 60.60	134.70 ± 89.60	0.61
HDL (> 40 mg/dL)	48.69 ± 9.07	50.66 ± 9.73	49.20 ± 9.52	0.66 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	123.10 ± 31.42	119.64 ± 34.04	123.61 ± 32.75	0.75
VLDL (10-40 mg/dL)	25.99 ± 21.77	22.73 ± 14.76	24.46 ± 18.84	0.66
IAP (3-5)	4.24 ± 1.23	3.95 ± 1.07	4.20 ± 1.24	0.49
Perfil hepático				
Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	0.28 ± 0.09	0.26 ± 0.10	0.27 ± 0.11	0.45
Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	0.84 ± 0.36	0.82 ± 0.36	0.85 ± 0.42	1.00
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.55 ± 0.27	0.57 ± 0.26	0.58 ± 0.31	0.90
ALT (< 55 U/L)	24.43 ± 8.11	23.03 ± 6.39	22.71 ± 6.78	0.57
AST (5-34 U/L)	24.94 ± 13.63	21.83 ± 13.05	23.89 ± 15.14	0.54
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	78.14 ± 23.43	74.43 ± 19.35	78.63 ± 19.93	0.71
Perfil de inflamación				
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	1.64 ± 1.65	4.55 ± 17.47	3.32 ± 8.07	0.97
VSG (< 30 mm/H)	2.43 ± 1.31	2.77 ± 2.32	3.29 ± 3.55	0.86
Ácidos grasos de cadena corta				
Ácido acético (mM/100mg)	191.30 ± 93.53	248.10 ± 93.90	219.90 ± 110.02	0.02
Ácido propiónico (mM/100mg)	25.65 ± 27.26	21.64 ± 14.61	22.80 ± 19.16	0.95
Ácido butírico (mM/100mg)	12.31 ± 5.55	13.38 ± 6.06	11.36 ± 5.97	0.28

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon^a, excepto para la prueba T de muestras pareadas^b. Los valores p <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01 y **** indica p≤0.0001.

Tabla S6. Todas las variables cuantificadas durante la intervención con cerveza con alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Day 1	Day15	Day 30	p-value ^a
Participantes (Masculino/Femenino)	33 (18/15)	33 (18/15)	33 (18/15)	ND
Edad (años)	29.70 ± 9.25	29.70 ± 9.25	29.70 ± 9.25	ND
Peso (Kg)	67.68 ± 17.50	66.75 ± 15.85	67.67 ± 15.94	0.99
Altura (m)	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.09	1.00
IMC (Kg/m ²)	23.67 ± 4.57	23.60 ± 4.26	23.89 ± 4.15	0.83
Cintura	80.41 ± 12.11	81.33 ± 12.25	81.20 ± 12.38	0.94
Cadera	87.63 ± 10.52	87.68 ± 9.68	87.36 ± 10.79	0.97
ICC	0.92 ± 0.05	0.93 ± 0.06	0.93 ± 0.06	0.74 ^b
Presión sistólica (mmHg)	113.32 ± 16.24	113.82 ± 16.62	112.11 ± 10.96	0.78
Presión diastólica (mmHg)	68.41 ± 9.48	67.18 ± 8.69	71.84 ± 11.19	**0.01
Pulso	72.11 ± 12.47	71.03 ± 11.23	72.07 ± 7.60	0.96
Porcentaje de musculo (%)	31.16 ± 6.07	32.09 ± 5.86	31.86 ± 5.85	0.80
Porcentaje de grasa (%)	28.37 ± 7.09	27.06 ± 6.63	27.62 ± 6.70	0.69 ^b
Grasa visceral (%)	6.46 ± 4.29	6.42 ± 3.91	6.48 ± 3.95	0.99
GEB (cal)	1476 ± 267	1506 ± 279	1503 ± 281	0.72
Bioquímica sanguínea				
Glucosa (70-99 mg/dL)	77.57 ± 4.44	82.84 ± 5.08	84.55 ± 4.87	****<0.01 ^b
Insulina (2.7-10.4 µU/mL)	7.07 ± 2.97	6.96 ± 2.44	7.16 ± 4.18	0.87
HOMA/ IR (< 3)	1.34 ± 0.52	1.43 ± 0.46	1.49 ± 0.83	0.84
CβF (%)	224.19 ± 262.37	131.15 ± 48.08	116.17 ± 93.74	****<0.01
Perfil lipídico				
Colesterol (<239 mg/dL)	186.85 ± 35.42	194.24 ± 31.66	182.79 ± 36.58	0.31
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	121.12 ± 57.09	138.00 ± 108.70	124.36 ± 53.88	0.89
HDL (> 40 mg/dL)	52.82 ± 12.07	53.67 ± 11.44	49.90 ± 11.20	0.37 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	116.64 ± 31.36	124.26 ± 34.67	119.06 ± 34.29	0.60 ^b
VLDL (10-40 mg/dL)	24.22 ± 11.42	27.60 ± 21.75	24.87 ± 10.78	0.89 ^a
IAP (3-5)	3.71 ± 1.06	3.80 ± 1.11	3.86 ± 1.20	0.90
Perfil hepático				
Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	0.27 ± 0.11	0.31 ± 0.10	0.33 ± 0.15	0.41
Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	2.55 ± 9.79	0.86 ± 0.32	0.92 ± 0.49	0.83
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.57 ± 0.46	0.56 ± 0.22	0.59 ± 0.34	0.76
ALT (< 55 U/L)	21.94 ± 12.39	29.39 ± 43.88	21.97 ± 14.04	0.88
AST (5-34 U/L)	23.76 ± 5.53	33.60 ± 60.50	24.21 ± 10.13	0.55
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	69.36 ± 17.25	70.06 ± 18.04	68.94 ± 17.57	0.93
Perfil de inflamación				
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	1.17 ± 2.23	2.70 ± 4.10	2.40 ± 3.10	0.87
VSG (< 30 mm/H)	4.33 ± 3.24	4.24 ± 3.46	2.64 ± 1.39	**0.01
Ácidos grasos de cadena corta				
Ácido acético (mM/100mg)	414.64 ± 177.64	532.90 ± 181.80	432.73 ± 155.43	**0.01
Ácido propiónico (mM/100mg)	48.57 ± 30.70	58.08 ± 37.61	54.27 ± 28.79	0.58
Ácido butírico (mM/100mg)	11.87 ± 10.73	13.04 ± 5.95	10.91 ± 5.47	0.12

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; GEB, Gasto energético basal; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta

densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media \pm desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon^a, excepto para la prueba T de muestras pareadas^b. Los valores $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos. * indica $p \leq 0.05$, ** indica $p \leq 0.01$ y **** indica $p \leq 0.0001$.

Tabla S7. Análisis LEfSe de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol.

Bacteria	Tiempo	LDA	p - value	q - value
<i>g_Bulleidia</i>	Día 01	2.41	***<0.01	*0.02
<i>o_Rhizobiales</i>	Día 01	2.03	***<0.01	**<0.01
<i>g_Agrobacterium</i>	Día 01	2.12	***<0.01	**0.01
<i>f_Sphingomonadaceae</i>	Día 01	3.74	**<0.01	*0.02
<i>o_Streptophyta</i>	Día 01	2.39	***<0.01	**<0.01
<i>g_Dialister</i>	Día 30	4.10	****<0.01	**<0.01
<i>f_Erysipelotrichaceae</i>	Día 30	3.66	****<0.01	****<0.01
<i>g_Actinomyces</i>	Día 30	2.43	****<0.01	****<0.01
<i>g_Staphylococcus</i>	Día 30	2.55	****<0.01	**<0.01
<i>g_Parabacteroides</i>	Día 30	3.28	***<0.01	***<0.01
<i>g_Veillonella</i>	Día 30	2.49	****<0.01	****<0.01
<i>g_Haemophilus</i>	Día 30	2.04	***<0.01	**0.01
<i>f_Rikenellaceae</i>	Día 30	3.54	****<0.01	***<0.01
<i>f_Enterobacteriaceae</i>	Día 30	3.36	****<0.01	***<0.01
<i>g_Lactococcus</i>	Día 30	2.50	****<0.01	***<0.01
<i>g_Bacteroides</i>	Día 30	4.30	****<0.01	***<0.01
<i>c_Actinobacteria</i>	Día 30	2.05	****<0.01	***<0.01
<i>g_Weissella</i>	Día 30	2.37	****<0.01	***<0.01
<i>g_Phascolarctobacterium</i>	Día 30	3.28	***<0.01	*0.04
<i>g_Streptococcus</i>	Día 30	3.54	****<0.01	****<0.01
<i>g_Acinetobacter</i>	Día 30	2.22	***<0.01	***<0.01
<i>g_Sutterella</i>	Día 30	2.91	***<0.01	**0.01
<i>g_Turicibacter</i>	Día 30	2.35	****<0.01	***<0.01
<i>g_Lactobacillus</i>	Día 30	2.96	***<0.01	**0.01

LDA: Linear discriminant analysis. El valor LDA mínimo aceptado fue 2,0 como se indica en la Figura 17A. El nombre taxonómico se añadió antes de la abreviatura de cada taxón. "c", clase; "o", orden; "f", familia; "g", género. Los p -values se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis; la prueba de False Discovery Rate (FDR) (q -values) se calcularon utilizando el método Benjamini-Hochberg. Los p and q values $< 0,05$ se consideran estadísticamente significativos. * indica $p \leq 0,05$, ** indica $p \leq 0,01$, *** indica $p \leq 0,001$ y **** indica $p \leq 0,0001$.

Tabla S8. Análisis LEfSe de la microbiota intestinal durante el consumo moderado de cerveza con alcohol.

Bacteria	Tiempo	LDA	p - value	q - value
<i>g_Lentzea</i>	Día 01	3.25	***<0.01	*0.02
<i>c_Cytophagia</i>	Día 01	2.47	****<0.01	**<0.01
<i>o_Cytophagales</i>	Día 01	2.46	****<0.01	**<0.01
<i>f_Sphingomonadaceae</i>	Día 01	2.38	****<0.01	**<0.01
<i>f_Cytophagaceae</i>	Día 01	2.34	****<0.01	**<0.01
<i>f_Chitinophagaceae</i>	Día 01	2.33	****<0.01	**<0.01
<i>c_Saprospirae</i>	Día 01	2.33	****<0.01	**<0.01
<i>p_Nitrospirae</i>	Día 01	2.07	**<0.01	*0.05
<i>g_Nitrospira</i>	Día 01	2.07	**<0.01	*0.05
<i>c_Nitrospira</i>	Día 01	2.05	**<0.01	*0.05
<i>o_Nitrospirales</i>	Día 01	2.02	**<0.01	*0.05

g_Sphingomonas	Día 01	2.02	***<0.01	*0.04
c_Bacteroidia	Día 30	4.70	*0.02	0.44
p_Bacteroidetes	Día 30	4.69	*0.02	0.45
c_Bacilli	Día 30	3.83	*0.02	0.40
g_Proteiniaclicum	Día 30	3.32	*0.02	0.44
g_Paracoccus	Día 30	3.32	*0.02	0.44
o_Bacillales	Día 30	3.25	****<0.01	**<0.01
g_Bacillus	Día 30	3.23	****<0.01	**<0.01
g_Dysgonomonas	Día 30	3.15	***<0.01	*0.03
g_Pseudomonas	Día 30	2.76	***<0.01	**0.01
g_Succinivibrio	Día 30	2.67	***<0.01	*0.04
o_Aeromonadales	Día 30	2.66	***<0.01	*0.04
f_Bacillaceae	Día 30	2.07	***<0.01	*0.03

LDA: Linear discriminant analysis. El valor LDA mínimo aceptado fue 2,0 como se indica en la Figura 17B. El nombre taxonómico se añadió antes de la abreviatura de cada taxón. "c", clase; "o", orden; "f", familia; "g", género. Los *p*-values se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis; la prueba de False Discovery Rate (FDR) (*q*-values) se calcularon utilizando el método Benjamini-Hochberg. Los *p* and *q* values <0,05 se consideran estadísticamente significativos. * indica $p \leq 0,05$, ** indica $p \leq 0,01$, *** indica $p \leq 0,001$ y **** indica $p \leq 0,0001$.

Tabla S9. Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza sin alcohol en el día 1.

No	OTUs ID	Bacteria	No	OTUs ID	Bacteria
1	7747	<i>Lachnobacterium</i>	27	4341534	Ruminococcaceae
2	9037	Clostridiales	28	4347159	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
3	97263	Ruminococcaceae	29	4355971	Clostridiaceae
4	173876	Clostridiales	30	4382678	<i>Coprococcus</i>
5	174654	<i>Ruminococcus</i>	31	4387706	Lachnospiraceae
6	176507	Ruminococcaceae	32	4414044	<i>Roseburia</i>
7	177224	Clostridiales	33	4416570	Lachnospiraceae
8	178713	Ruminococcaceae	34	4425526	Lachnospiraceae
9	179664	Clostridiales	35	4435400	Lachnospiraceae
10	180462	<i>Blautia</i>	36	4435575	Clostridiales
11	182753	Lachnospiraceae	37	4452107	Clostridiales
12	185753	<i>Blautia</i>	38	4452700	Clostridiaceae
13	194353	<i>Blautia</i>	39	4457438	Lachnospiraceae
14	199456	<i>Blautia</i>	40	4464173	Lachnospiraceae
15	204099	Ruminococcaceae	41	4465746	Peptostreptococcaceae
16	277204	Ruminococcaceae	42	4465907	<i>Blautia</i>
17	302939	<i>Blautia</i>	43	4468391	<i>Ruminococcus</i>
18	332962	Clostridiales	44	4472130	Lachnospiraceae
19	341444	Clostridiales	45	4474380	Clostridiales
20	652696	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	46	4476330	<i>Blautia</i>
21	821722	<i>Blautia</i>	47	4478125	Ruminococcaceae
22	238681	Ruminococcaceae	48	4481131	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
23	317739	<i>Bifidobacterium longum</i>	49	4481427	Clostridiales
24	329173	<i>Bifidobacterium longum</i>	50	4482516	Clostridiaceae
25	360954	<i>Coprococcus</i>	51	4483037	Ruminococcaceae

26	433673	<i>Roseburia</i>	52	4484075	Ruminococcaceae
----	--------	------------------	----	---------	-----------------

1

Ver figura S3, Anexo 3.

Tabla S10. Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza sin alcohol en el día 30.

No.	OTUs ID	Bacteria	No.	OTUs ID	Bacteria
1	2177	Clostridiales	10	333360	Clostridiales
2	2445	Clostridiales	11	362991	<i>Ruminococcus</i>
3	4777	<i>Collinsella</i>	12	365385	<i>Bifidobacterium</i>
4	5341	Coriobacteriaceae	13	3562626	<i>Bacteroides</i>
5	163243	<i>Ruminococcus</i>	14	4296496	Clostridiales
6	195938	Lachnospiraceae	15	4377144	Ruminococcaceae
7	230132	RF39	16	4423553	Ruminococcaceae
8	295100	Christensenellaceae	17	4476561	Barnesiellaceae
9	308786	<i>Ruminococcus</i>	18	4480861	<i>Catenibacterium</i>

Ver figura S4, Anexo 3.

Tabla S11. Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza con alcohol en el día 1.

No	OTUs ID	Bacteria	No	OTUs ID	Bacteria
1	8	<i>Blautia</i>	34	840376	Ruminococcaceae
2	9	<i>Dialister</i>	35	2037235	<i>Prevotella copri</i>
3	45	Ruminococcaceae	36	2386814	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
4	326	<i>Ruminococcus</i>	37	2498994	Erysipelotrichaceae
5	483	Coriobacteriaceae	38	3931537	Ruminococcaceae
6	1123	RF39	39	4015729	<i>Dorea</i>
7	3487	<i>Prevotella copri</i>	40	4328241	<i>Phascolarctobacterium</i>
8	4956	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	41	4335376	Coriobacteriaceae
9	6276	Coriobacteriaceae	42	4374302	<i>Dorea</i>
10	9884	<i>Collinsella aerofaciens</i>	43	4377144	Ruminococcaceae
11	14230	Lachnospiraceae	44	4388316	Clostridiales
12	14685	Lachnospiraceae	45	4393499	Ruminococcaceae
13	14686	Clostridiales	46	4393532	<i>Eggerthella</i>
14	14931	Ruminococcaceae	47	4414044	<i>Roseburia</i>
15	16571	Lachnospiraceae	48	4419504	Ruminococcaceae
16	174654	<i>Ruminococcus</i>	49	4430561	Enterobacteriaceae
17	176507	Ruminococcaceae	50	4435575	Clostridiales
18	177224	Clostridiales	51	4441081	<i>Collinsella</i>
19	178713	Ruminococcaceae	52	4452107	Lachnospiraceae
20	180462	<i>Blautia</i>	53	4452700	Clostridiaceae
21	181335	<i>Blautia</i>	54	4457438	Lachnospiraceae
22	182044	Ruminococcaceae	55	4465907	<i>Blautia</i>
23	191355	Erysipelotrichaceae	56	4468391	<i>Ruminococcus</i>
24	195938	Lachnospiraceae	57	4468891	Erysipelotrichaceae
25	196729	<i>Prevotella copri</i>	58	4476751	<i>Ruminococcus cross4 gnavus</i>
26	198824	Lachnospiraceae	59	4478125	Ruminococcaceae
27	264552	<i>Dialister</i>	60	4479405	Enterobacteriaceae
28	277204	Ruminococcaceae	61	4481131	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
29	311446	Ruminococcaceae	62	4481613	<i>Collinsella aerofaciens</i>
30	329693	<i>Prevotella copri</i>	63	4482516	Clostridiaceae
31	341444	Clostridiales	64	4482983	Lachnospiraceae

32	345899	<i>Prevotella copri</i>	65	4484034	<i>Bacteroides</i>
33	798581	<i>Ruminococcus</i>	66	4484075	Ruminococcaceae

Ver figura S5, Anexo 3.

Tabla S12. Lista de taxones bacterianos durante el consumo de cerveza con alcohol en el día 30.

No.	OTUs ID	Bacteria	No.	OTUs ID	Bacteria
1	45	Ruminococcaceae	18	323906	Ruminococcaceae
2	476	<i>Dialister</i>	19	356167	Ruminococcaceae
3	478	<i>Desulfovibrio</i>	20	921020	RF39
4	4341	Clostridiales	21	977628	RF39
5	4356	Ruminococcaceae	22	2423305	Coriobacteriaceae
6	4360	<i>Dialister</i>	23	3562626	<i>Bacteroides</i>
7	4912	<i>Dialister</i>	24	4326870	<i>Dialister</i>
8	72142	<i>Prevotella copri</i>	25	4335376	Coriobacteriaceae
9	168383	Clostridiales	26	4356697	Ruminococcaceae
10	182044	Ruminococcaceae	27	4377144	Ruminococcaceae
11	187517	Mogibacteriaceae	28	4416614	<i>Bacteroides</i>
12	191502	Clostridiales	29	4435784	<i>Bacteroides</i>
13	210895	Clostridiales	30	4445078	Clostridiales
14	295100	Christensenellaceae	31	4453773	Desulfovibrionaceae
15	305056	Ruminococcaceae	32	4468234	<i>Bacteroides</i>
16	307352	Ruminococcaceae	33	4475784	<i>Enterococcus</i>
17	314605	Clostridiales			

Ver figura S6, Anexo 3.

Tabla S13. Comparaciones estadísticas para el género masculino durante el consumo de cerveza sin alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Día 1	Día 30	p-value ^a
Participantes (Masculino)	21	21	ND
Edad (años)	30.19 ± 9.06	30.19 ± 9.06	ND
Peso (Kg)	77.50 ± 14.19	76.76 ± 14.27	**0.01 ^b
Altura (m)	1.72 ± 0.07	1.72 ± 0.07	ND
IMC (Kg/m ²)	26.28 ± 4.17	26.02 ± 4.19	**0.01 ^b
Cintura	88.00 ± 11.13	88.02 ± 10.84	0.95 ^b
Cadera	91.83 ± 9.49	92.43 ± 10.68	0.17 ^b
ICC	0.96 ± 0.03	0.95 ± 0.03	0.53 ^b
Presión sistólica (mmHg)	116.48 ± 10.83	113.90 ± 10.34	0.23 ^b
Presión diastólica (mmHg)	73.67 ± 8.25	72.10 ± 7.27	0.41 ^b
Pulso	66.14 ± 9.76	69.95 ± 9.54	0.08 ^b
Bioquímica sanguínea			
Glucosa (70-99 mg/dL)	87.38 ± 5.89	78.95 ± 8.89	****<0.01
Insulina (2.7-10.4 µU/mL)	11.28 ± 11.87	9.76 ± 3.84	0.38
HOMA/ IR (< 3)	2.47 ± 2.63	1.93 ± 0.89	0.85
CβF (%)	166.02 ± 163.85	195.92 ± 135.08	*0.02
Perfil lipídico			
Colesterol (<239 mg/dL)	203.67 ± 29.09	202.24 ± 28.58	0.73 ^b
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	159.86 ± 140.05	151.19 ± 105.09	0.89
HDL (> 40 mg/dL)	45.29 ± 7.85	46.48 ± 8.26	0.21 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	128.52 ± 26.18	128.89 ± 24.96	0.92 ^b
VLDL (10-40 mg/dL)	30.23 ± 27.14	26.87 ± 23.46	*0.04
IAP (3-5)	4.67 ± 1.25	4.54 ± 1.25	0.18
Perfil hepático			
Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	1.03 ± 0.33	1.01 ± 0.41	0.75

Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	0.33 ± 0.08	0.31 ± 0.10	0.28 ^b
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.69 ± 0.26	0.70 ± 0.32	0.67
ALT (< 55 U/L)	28.10 ± 14.05	24.43 ± 13.16	*0.02
AST (5-34 U/L)	25.81 ± 8.29	22.76 ± 5.28	*0.03
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	81.14 ± 26.08	79.71 ± 20.50	0.94
Perfil de inflamación			
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	1.57 ± 1.71	1.56 ± 1.68	0.63
VSG (< 30 mm/H)	2.10 ± 0.30	2.28 ± 0.90	0.41
Ácidos grasos de cadena corta			
Ácido acético (mM/100mg)	197.83 ± 100.84	234.04 ± 114.66	0.27
Ácido propiónico (mM/100mg)	26.93 ± 25.18	26.86 ± 22.67	0.54
Ácido butírico (mM/100mg)	12.63 ± 6.27	12.66 ± 6.89	0.99 ^b

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon^a, excepto para la prueba T de muestras pareadas^b. Los valores p <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01 y **** indica p≤0.0001.

Tabla S14. Comparaciones estadísticas para el género femenino durante el consumo de cerveza sin alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Día 1	Día 30	p-value ^a
Participantes (Femenino)	14	14	ND
Edad (años)	26.64 ± 5.21	26.64 ± 5.21	ND
Peso (Kg)	57.74 ± 8.19	56.99 ± 7.89	0.30 ^b
Altura (m)	1.59 ± 0.05	1.59 ± 0.05	ND
IMC (Kg/m ²)	22.72 ± 2.92	22.43 ± 2.92	0.51
Cintura	74.83 ± 8.67	72.86 ± 7.22	*0.04
Cadera	86.02 ± 7.25	84.67 ± 7.02	0.16
ICC	0.87 ± 0.05	0.86 ± 0.03	0.68
Presión sistólica (mmHg)	108.29 ± 9.60	103.29 ± 9.38	0.06
Presión diastólica (mmHg)	71.36 ± 7.47	70.07 ± 8.60	0.67 ^b
Pulso	74.14 ± 11.68	76.36 ± 9.87	0.41 ^b
Bioquímica sanguínea			
Glucosa (70-99 mg/dL)	85.14 ± 5.99	77.86 ± 5.52	**<0.01 ^b
Insulina (2.7-10.4 μU/mL)	9.38 ± 3.61	9.61 ± 4.74	0.90
HOMA/ IR (< 3)	2.00 ± 0.85	1.85 ± 0.93	0.68
CβF (%)	154.51 ± 49.71	346.54 ± 401.22	*0.03
Perfil lipídico			
Colesterol (<239 mg/dL)	188.57 ± 36.93	189.50 ± 43.16	0.90
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	95.07 ± 36.25	110.07 ± 54.13	0.12
HDL (> 40 mg/dL)	53.79 ± 8.58	53.29 ± 10.11	0.72 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	114.98 ± 37.54	115.69 ± 41.64	0.68
VLDL (10-40 mg/dL)	19.63 ± 5.87	20.83 ± 7.64	0.33
IAP (3-5)	3.60 ± 0.90	3.67 ± 1.06	0.46 ^b
Perfil hepático			
Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	0.55 ± 0.15	0.61 ± 0.29	0.42
Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	0.21 ± 0.058	0.21 ± 0.10	0.65
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.34 ± 0.10	0.39 ± 0.20	0.28

ALT (< 55 U/L)	20.21 ± 11.92	23.07 ± 18.21	0.47
AST (5-34 U/L)	22.36 ± 7.66	22.64 ± 8.79	0.50
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	73.64 ± 18.80	77.00 ± 19.70	0.14 ^b
Perfil de inflamación			
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	1.73 ± 1.62	5.95 ± 12.39	*0.05
VSG (< 30 mm/H)	2.93 ± 1.98	4.79 ± 5.26	0.31
Ácidos grasos de cadena corta			
Ácido acético (mM/100mg)	181.51 ± 84.02	198.70 ± 103.08	0.98
Ácido propiónico (mM/100mg)	23.73 ± 31.02	16.71 ± 10.16	0.85
Ácido butírico (mM/100mg)	11.83 ± 4.44	9.42 ± 3.64	*0.04 ^b

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon^a, excepto para la prueba T de muestras pareadas^b. Los valores p <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01 y **** indica p≤0.0001.

Tabla S15. Comparaciones estadísticas para el género masculino durante el consumo de cerveza con alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Día 1	Día 30	p-value ^a
Participantes (Masculino)	18	18	ND
Edad (años)	31.78 ± 10.04	31.78 ± 10.04	ND
Peso (Kg)	79.81 ± 14.38	77.92 ± 12.42	0.58
Altura (m)	1.73 ± 0.07	1.73 ± 0.07	ND
IMC (Kg/m ²)	26.06 ± 4.73	26.00 ± 4.08	0.48
Cintura	89.03 ± 9.02	89.89 ± 9.75	0.11
Cadera	93.33 ± 9.62	93.42 ± 9.84	0.75
ICC	0.95 ± 0.03	0.96 ± 0.04	0.12 ^b
Presión sistólica (mmHg)	122.75 ± 12.90	117.25 ± 10.90	*0.04 ^b
Presión diastólica (mmHg)	71.12 ± 10.96	73.12 ± 14.92	0.21
Pulso	73.20 ± 11.75	73.80 ± 8.74	0.87 ^b
Porcentaje de musculo (%)	35.25 ± 5.01	36.33 ± 3.74	0.25 ^b
Porcentaje de grasa (%)	26.28 ± 7.64	25.01 ± 6.29	0.19 ^b
Grasa visceral (%)	8.89 ± 4.42	8.83 ± 3.91	0.76
GEB (cal)	1680.28 ± 186.34	1729.17 ± 163.73	0.15
Bioquímica sanguínea			
Glucosa (70-99 mg/dL)	78.33 ± 4.79	85.56 ± 4.66	****<0.01 ^b
Insulina (2.7-10.4 μU/mL)	6.93 ± 2.82	7.88 ± 5.36	0.44
HOMA/ IR (< 3)	1.33 ± 0.50	1.65 ± 1.05	*0.04
CβF (%)	203.07 ± 203.46	135.27 ± 123.73	**0.04
Hemoglobina A1c (4-6 %)	5.02 ± 0.24	5.01 ± 0.25	0.48
Perfil lipídico			
Colesterol (<239 mg/dL)	187.72 ± 34.49	184.33 ± 33.96	0.29
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	134.33 ± 63.16	140.67 ± 62.03	0.62
HDL (> 40 mg/dL)	47.89 ± 10.82	44.67 ± 10.49	**<0.01 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	120.10 ± 31.23	123.51 ± 31.16	0.26 ^b
VLDL (10-40 mg/dL)	26.87 ± 12.63	28.13 ± 12.41	0.62
IAP (3-5)	4.13 ± 1.21	4.37 ± 1.32	*0.04 ^b
Perfil hepático			
Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	0.96 ± 0.62	1.06 ± 0.51	0.09

Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	0.29 ± 0.09	0.36 ± 0.15	** <0.01
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.67 ± 0.55	0.70 ± 0.36	0.18
ALT (< 55 U/L)	26.94 ± 14.25	26.28 ± 14.73	0.79
AST (5-34 U/L)	25.78 ± 5.79	27.06 ± 10.47	0.65
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	73.44 ± 17.83	71.94 ± 18.72	0.12
Perfil de inflamación			
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	2.17 ± 2.15	2.18 ± 2.35	0.91
VSG (< 30 mm/H)	3.06 ± 1.70	2.39 ± 0.92	0.16
Ácidos grasos de cadena corta			
Ácido acético (mM/100mg)	390.25 ± 195.84	413.46 ± 173.77	0.42
Ácido propiónico (mM/100mg)	40.53 ± 30.97	56.64 ± 29.16	0.06
Ácido butírico (mM/100mg)	11.09 ± 13.48	10.21 ± 6.27	0.56

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; GEB, Gasto energético basal; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon^a, excepto para la prueba T de muestras pareadas^b. Los valores p <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01 y **** indica p≤0.0001.

Tabla S16. Comparaciones estadísticas para el género femenino durante el consumo de cerveza con alcohol.

Datos antropométricos y clínicos	Día 1	Día 30	p-value ^a
Participantes (Femenino)	15	15	ND
Edad (años)	27.20 ± 8.18	27.20 ± 8.18	ND
Peso (Kg)	53.11 ± 5.71	53.17 ± 5.93	0.98
Altura (m)	1.60 ± 0.04	1.60 ± 0.04	ND
IMC (Kg/m ²)	20.79 ± 2.10	21.37 ± 2.57	0.33 ^b
Cintura	70.07 ± 5.17	70.77 ± 4.62	0.07 ^b
Cadera	80.80 ± 6.97	80.10 ± 6.72	0.27 ^b
ICC	0.87 ± 0.03	0.88 ± 0.04	0.06 ^b
Presión sistólica (mmHg)	92.50 ± 27.73	103.87 ± 7.12	0.08
Presión diastólica (mmHg)	64.58 ± 5.18	71.33 ± 3.63	**0.01 ^b
Pulso	70.75 ± 13.73	69.33 ± 5.12	0.50
Porcentaje de musculo (%)	26.25 ± 2.55	26.50 ± 2.17	0.54 ^b
Porcentaje de grasa (%)	30.88 ± 5.63	30.75 ± 5.94	0.50 ^b
Grasa visceral (%)	3.53 ± 1.30	3.67 ± 1.18	0.16 ^b
GEB (cal)	1230.33 ± 54.64	1231.80 ± 54.29	0.55
Bioquímica sanguínea			
Glucosa (70-99 mg/dL)	76.67 ± 3.96	83.33 ± 5.01	***0.01 ^b
Insulina (2.7-10.4 μU/mL)	7.23 ± 3.24	6.29 ± 1.90	0.23
HOMA/ IR (< 3)	1.36 ± 0.57	1.30 ± 0.42	0.64 ^b
CβF (%)	249.52 ± 325.30	115.24 ± 35.48	**0.01
Hemoglobina A1c (4-6 %)	4.92 ± 0.22	4.92 ± 0.22	1.00 ^b
Perfil lipídico			
Colesterol (<239 mg/dL)	185.80 ± 37.70	180.93 ± 40.64	0.43 ^b
Triglicéridos (150-200 mg/dL)	105.27 ± 45.98	104.80 ± 34.82	0.93
HDL (> 40 mg/dL)	58.73 ± 11.05	56.20 ± 8.69	0.10 ^b
LDL (< 130 mg/dL)	112.48 ± 32.10	113.72 ± 38.10	0.84 ^b
VLDL (10-40 mg/dL)	21.05 ± 9.20	20.96 ± 6.96	0.93
IAP (3-5)	3.21 ± 0.54	3.26 ± 0.68	0.62 ^b
Perfil hepático			

Bilirrubina total (0.22-1.04 mg/dL)	4.46 ± 14.54	0.75 ± 0.42	0.59
Bilirrubina directa (0.12-0.42 mg/dL)	0.25 ± 0.13	0.29 ± 0.14	0.12
Bilirrubina Indirecta (0.09-0.65 mg/dL)	0.44 ± 0.30	0.47 ± 0.28	0.41
ALT (< 55 U/L)	21.33 ± 4.20	16.80 ± 11.61	0.11
AST (5-34 U/L)	15.93 ± 5.79	20.80 ± 8.86	0.14
Fosfatasa alcalina (40-150 U/L)	64.47 ± 15.72	65.33 ± 15.96	1.00
Perfil de inflamación			
PCR (0.10-8.20 mg/dL)	2.16 ± 2.40	2.65 ± 3.90	0.36
VSG (< 30 mm/H)	5.87 ± 4.00	2.93 ± 1.79	**0.01
Ácidos grasos de cadena corta			
Ácido acético (mM/100mg)	443.92 ± 154.50	455.86 ± 132.30	0.84 ^b
Ácido propiónico (mM/100mg)	58.22 ± 28.40	51.42 ± 29.10	0.43
Ácido butírico (mM/100mg)	12.82 ± 6.39	11.76 ± 4.37	0.50 ^b

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura-cadera; GEB, Gasto energético basal; Homa/IR, Homeostatic model assessment/Insulin resistance; CβF, Células β funcionales; HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad; IAP, Índice aterogénico del plasma; ALT, Alanina transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; PCR, Proteína C reactiva; VSG, Velocidad de sedimentación globular; ND, Datos no determinados. Los datos son la media ± desviación estándar. El valor de p se calculó con base en la prueba de rango de signos de Wilcoxon^a, excepto para la prueba T de muestras pareadas^b. Los valores p <0.05 se consideran estadísticamente significativos. * indica p≤0.05, ** indica p≤0.01 y **** indica p≤0.0001.

Anexo 3: Figuras suplementarias

Figura S1.	Fragmentogramas de análisis de espectrometría de masas de alta resolución de la CSA.	110
Figura S2.	Fragmentogramas de análisis de espectrometría de masas de alta resolución de la CCA.	111
Figura S3.	Análisis co-occurrence significativo para el día 1 durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol.	112
Figura S4.	Análisis co-occurrence significativo para el día 30 durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol.	113
Figura S5.	Análisis co-occurrence significativo para el día 1 durante el consumo moderado de cerveza con alcohol.	114
Figura S6.	Análisis co-occurrence significativo para el día 30 durante el consumo moderado de cerveza con alcohol.	115
Figura S7.	Análisis de beta diversidad de la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza al día 1.	116
Figura S8.	Análisis de diversidad beta de la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza por tiempo y género.	116

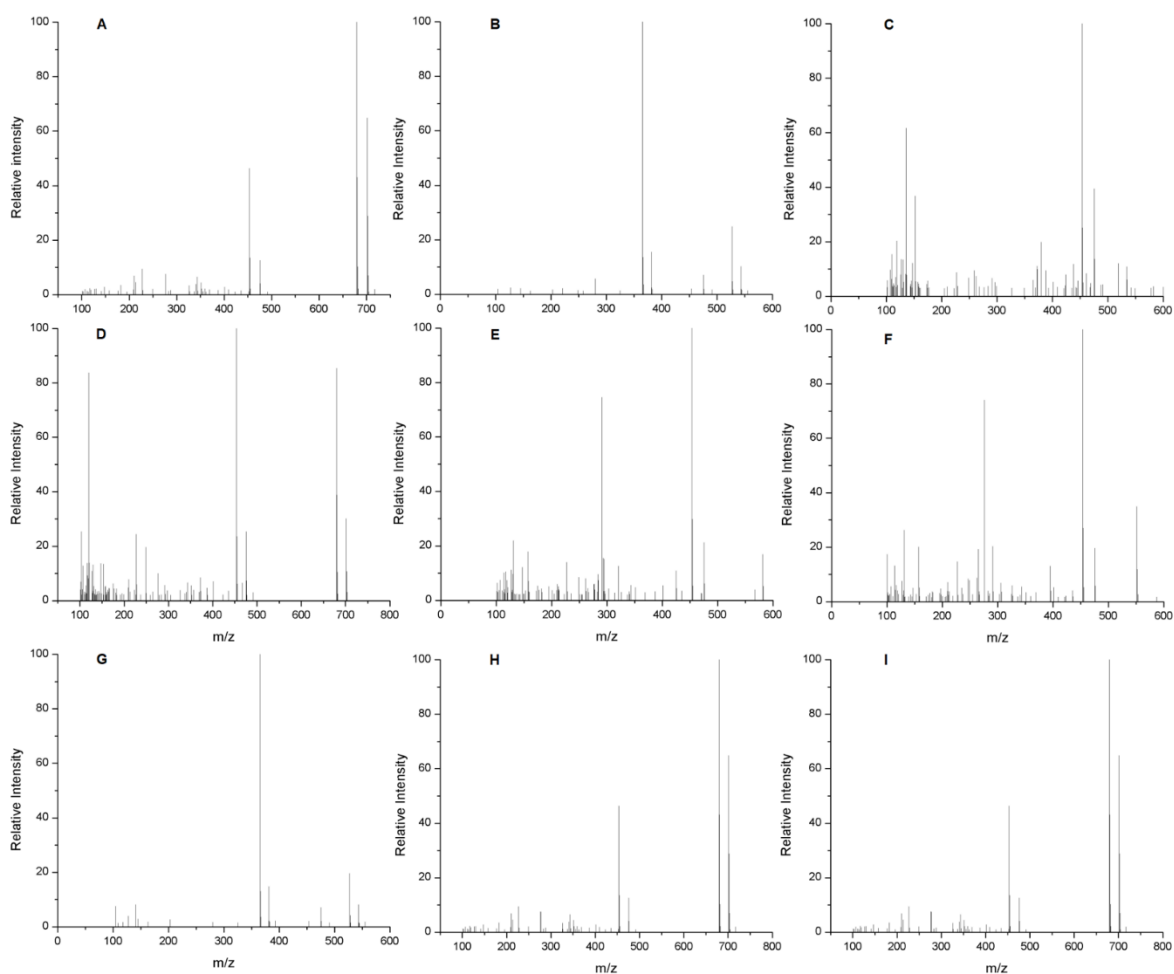


Figura S1. Fragmentogramas de análisis de espectrometría de masas de alta resolución de la CSA. La figura muestra todos los fragmentogramas (A-I), obtenidos para cada pico del cromatograma de iones totales que se muestra en la Figura 7.A. El eje Y muestra el porcentaje de abundancia relativa de los compuestos fragmentados en el pico correspondiente y el eje X muestra la relación masa-carga (m/z).

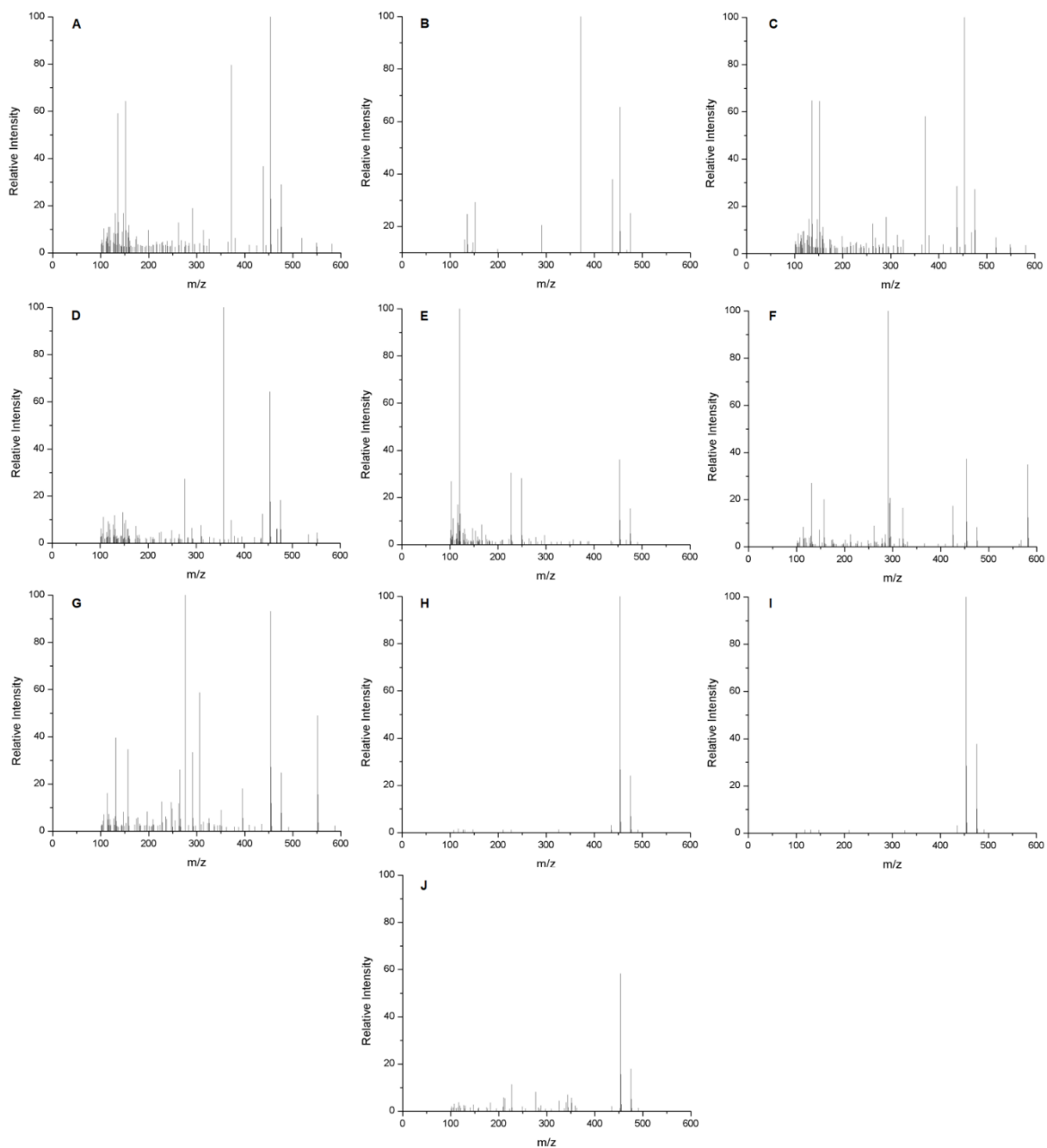


Figura S2. Fragmentogramas de análisis de espectrometría de masas de alta resolución de la CCA. La figura muestra todos los fragmentogramas (A-J), obtenidos para cada pico del cromatograma de iones totales que se muestra en la Figura 7.B. El eje Y muestra el porcentaje de abundancia relativa de los compuestos fragmentados en el pico correspondiente y el eje X muestra la relación masa-carga (m/z).

Cerveza sin alcohol (Día 1)

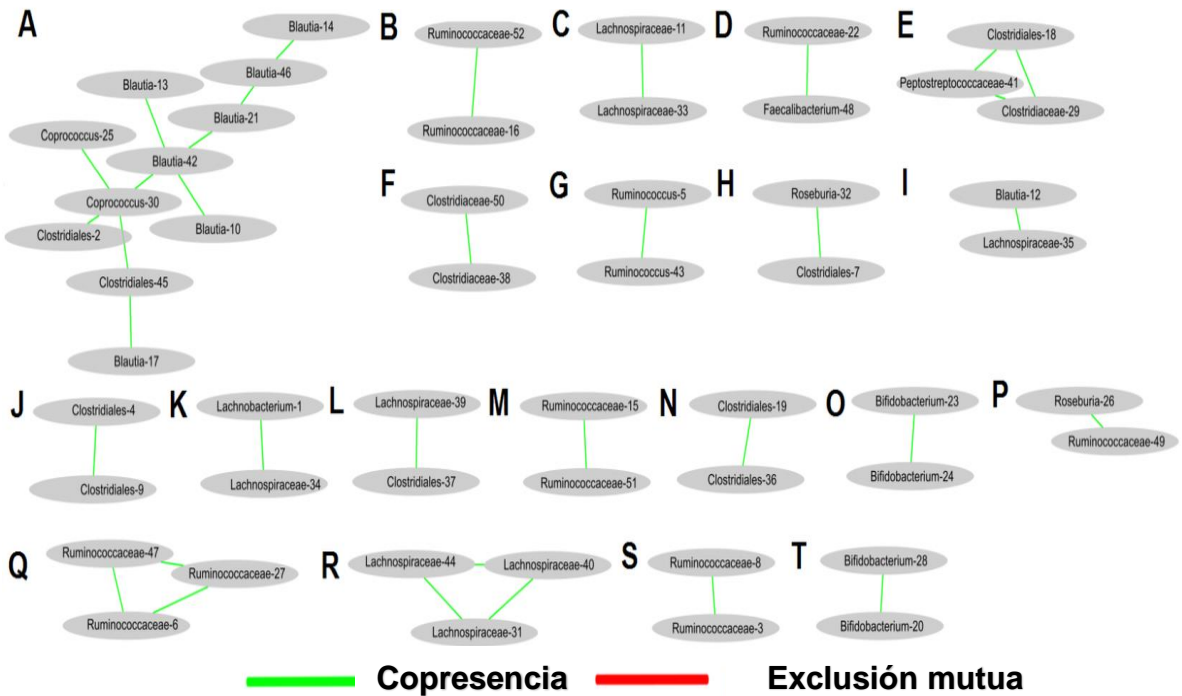


Figura S3. Análisis co-ocurrencia significativo para el día 1 durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol. Este gráfico muestra interacciones seleccionadas entre diferentes comunidades bacterianas; copresencia (positivo, líneas verdes) y exclusión mutua (negativo, líneas rojas). Este análisis se realizó utilizando el archivo *otu_table.biom* con el plug-in CoNet, donde las redes de co-ocurrencia generadas fueron visualizadas por el software Cytoscape (v3.6.1). Cada nodo indica un clado microbiano (taxón bacteriano) que pertenece a un número único de OTU. Los bordes (líneas) que conectan dos nodos, representan correlaciones significativas ($p < 0.05$; $q < 0.05$; $R > 0.8$). En este gráfico, algunos nombres de bacterias se muestran más de una vez, p. Ej. *Coprococcus*, *Blautia*, etc., sin embargo, pertenecen a diferentes números de OTU. Los nombres de las bacterias y el número de OTU correspondiente se muestran en el Anexo 2, Tabla S9.

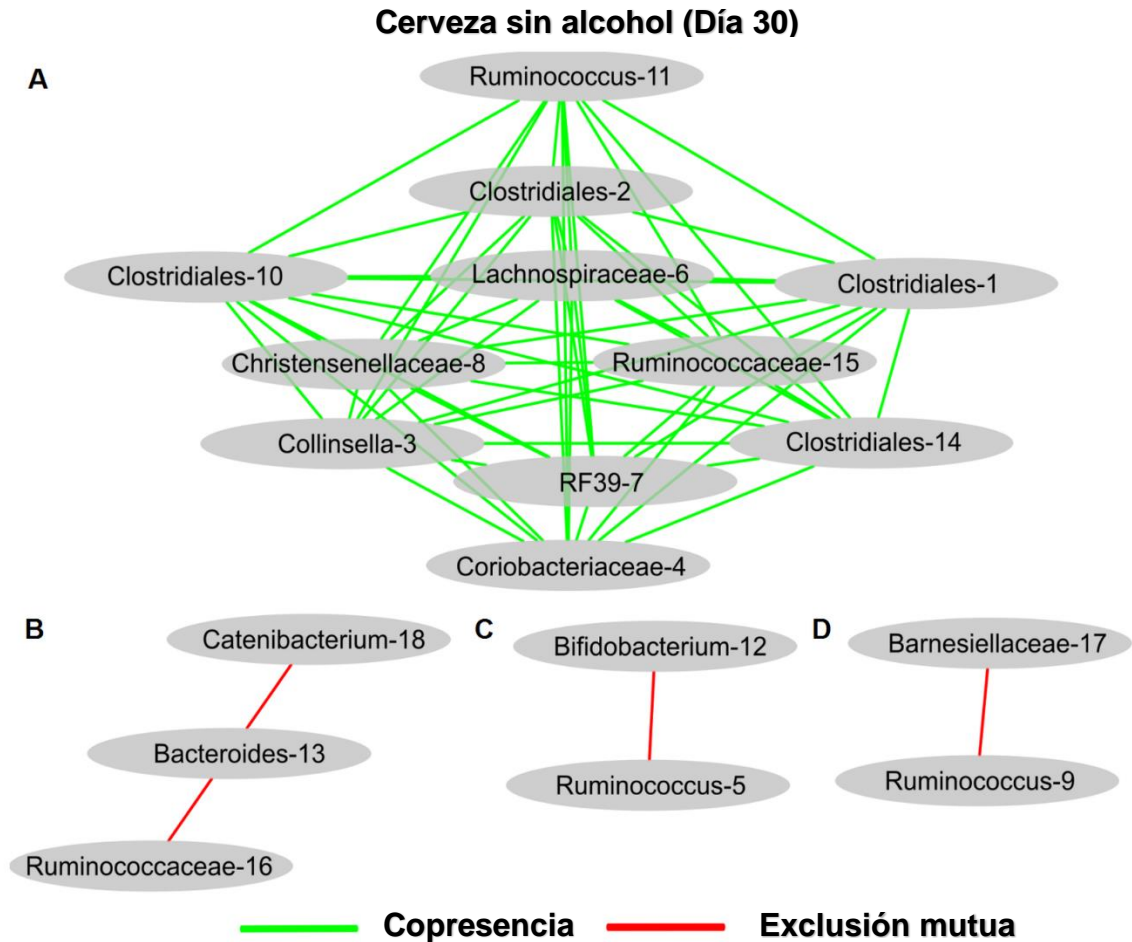


Figura S4. Análisis co-ocurrencia significativo para el día 30 durante el consumo moderado de cerveza sin alcohol. Este gráfico muestra interacciones seleccionadas entre diferentes comunidades bacterianas; copresencia (positivo, líneas verdes) y exclusión mutua (negativo, líneas rojas). Este análisis se realizó utilizando el archivo `otu_table.biom` con el plug-in CoNet, donde las redes de co-ocurrencia generadas fueron visualizadas por el software Cytoscape (v3.6.1). Cada nodo indica un clado microbiano (taxón bacteriano) que pertenece a un número único de OTU. Los bordes (líneas) que conectan dos nodos, representan correlaciones significativas ($p < 0.05$; $q < 0.05$; $R > 0.8$). En este gráfico, algunos nombres de bacterias se muestran más de una vez, p. Ej. *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, etc., sin embargo, pertenecen a diferentes números de OTU. Los nombres de las bacterias y el número de OTU correspondiente se muestran en el Anexo 2, Tabla S10.

Cerveza con alcohol (Día 1)

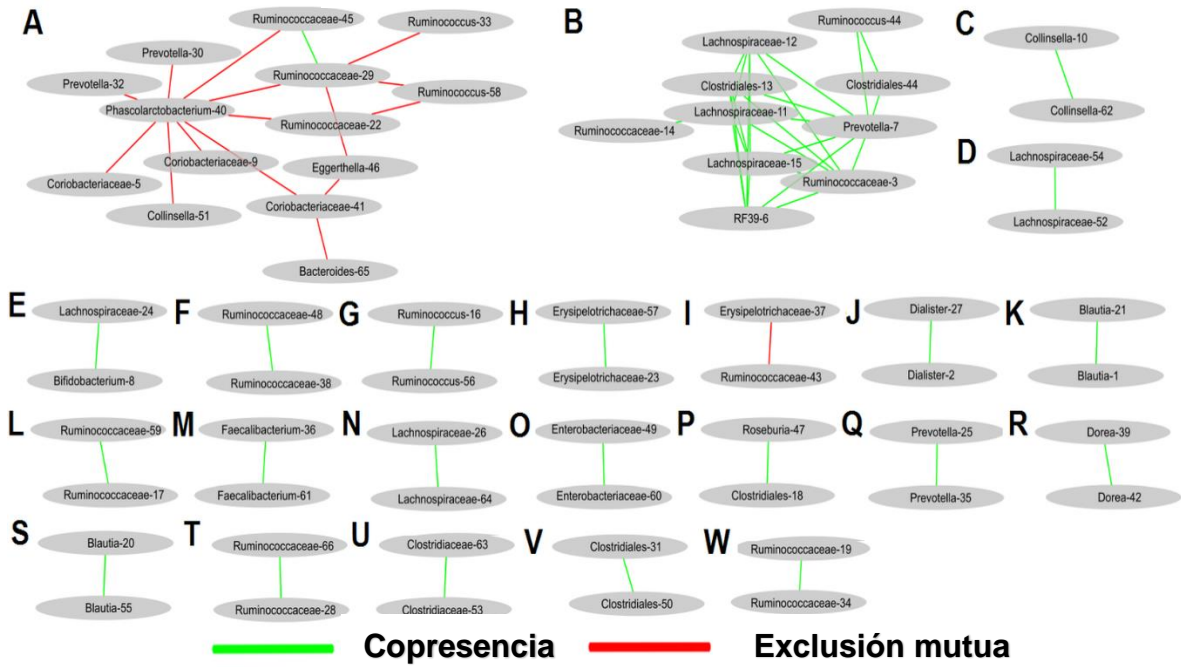


Figura S5. Análisis co-ocurrencia significativo para el día 1 durante el consumo moderado de cerveza con alcohol. Este gráfico muestra interacciones seleccionadas entre diferentes comunidades bacterianas; copresencia (positivo, líneas verdes) y exclusión mutua (negativo, líneas rojas). Este análisis se realizó utilizando el archivo *otu_table.biom* con el plug-in CoNet, donde las redes de co-ocurrencia generadas fueron visualizadas por el software Cytoscape (v3.6.1). Cada nodo indica un clado microbiano (taxón bacteriano) que pertenece a un número único de OTU. Los bordes (líneas) que conectan dos nodos, representan correlaciones significativas ($p < 0.05$; $q < 0.05$; $R > 0.8$). En este gráfico, algunos nombres de bacterias se muestran más de una vez, p. Ej. *Prevotella*, *Eggerthella*, etc., sin embargo, pertenecen a diferentes números de OTU. Los nombres de las bacterias y el número de OTU correspondiente se muestran en el Anexo 2, Tabla S11.

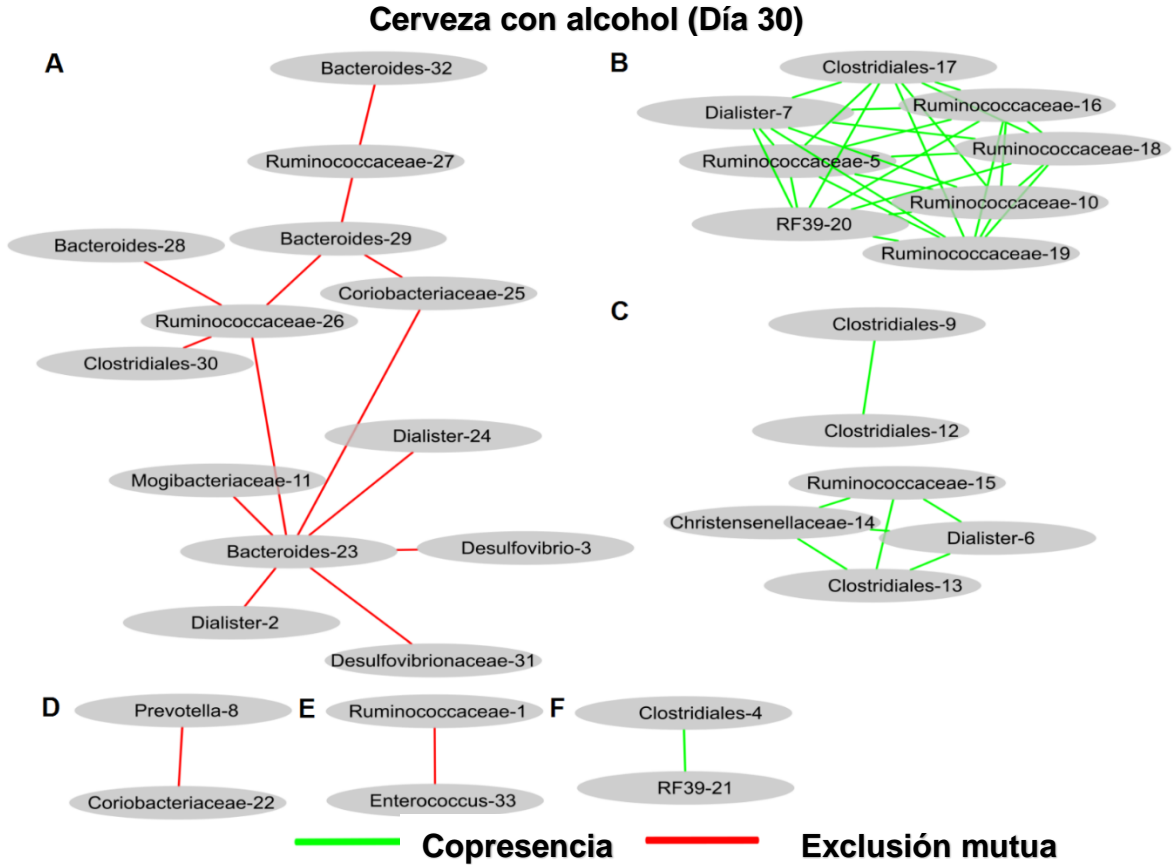


Figura S6. Análisis co-ocurrencia significativo para el día 30 durante el consumo moderado de cerveza con alcohol. Este gráfico muestra interacciones seleccionadas entre diferentes comunidades bacterianas; copresencia (positivo, líneas verdes) y exclusión mutua (negativo, líneas rojas). Este análisis se realizó utilizando el archivo `otu_table.biom` con el plug-in CoNet, donde las redes de co-ocurrencia generadas fueron visualizadas por el software Cytoscape (v3.6.1). Cada nodo indica un clado microbio (taxón bacteriano) que pertenece a un número único de OTU. Los bordes (líneas) que conectan dos nodos, representan correlaciones significativas ($p < 0.05$; $q < 0.05$; $R > 0.8$). En este gráfico, algunos nombres de bacterias se muestran más de una vez, p. Ej. *Bacteroides*, *Dialister*, etc., sin embargo, pertenecen a diferentes números de OTU. Los nombres de las bacterias y el número de OTU correspondiente se muestran en el Anexo 2, Tabla S12.

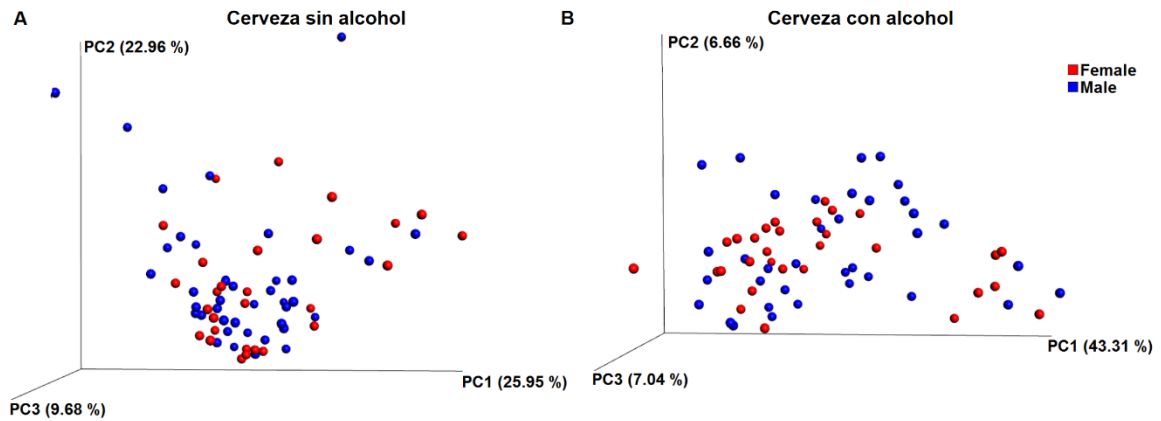


Figura S7. Análisis de beta diversidad de la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza al día 1. Sin alcohol (**A**) y con alcohol (**B**) calculados mediante métricas de disimilitud utilizando tablas OTU y análisis Weighted UniFrac. Los análisis muestran la diferencia entre géneros, Femenino (color rojo) y Masculino (color azul). Se generaron diagramas de dispersión tridimensionales utilizando análisis de coordenadas principales (PCoA) en tres ejes diferentes que muestra el porcentaje de diferencias totales. Los *p-value* se calcularon utilizando el método ANOSIM para comparar las diversidades beta. La cerveza sin alcohol (Femenino vs Masculino) no tiene diferencias significativas (**A**; *p-value* 0.857); ni la cerveza con alcohol (Femenino vs Masculino) (**B**; *p-value* 0.631).

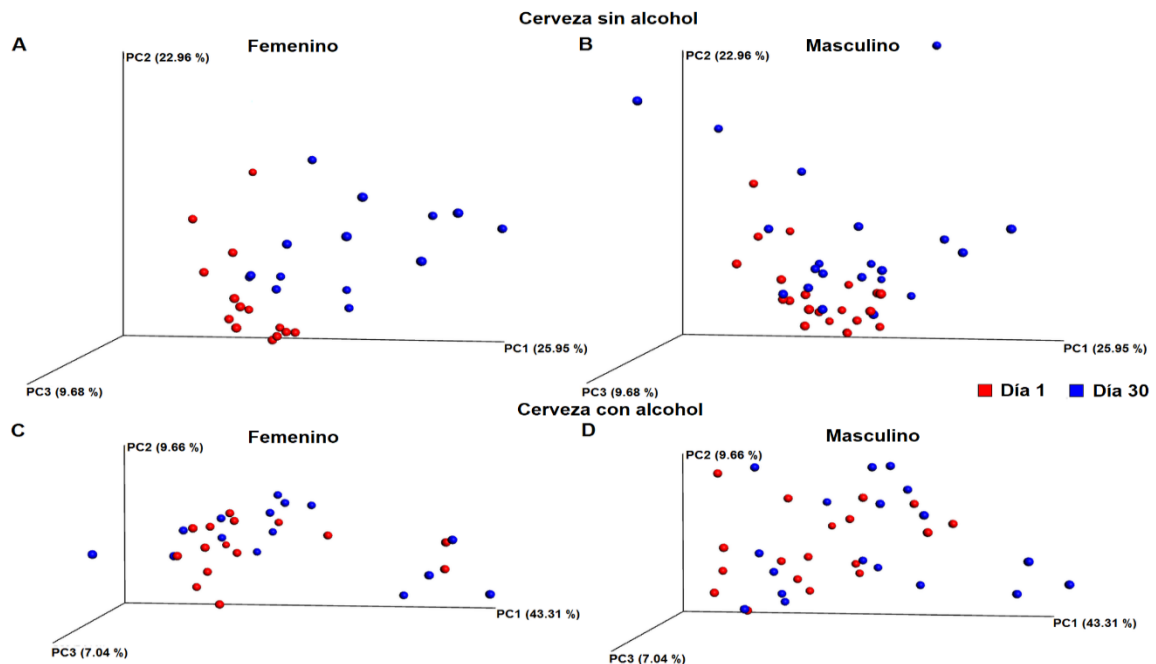
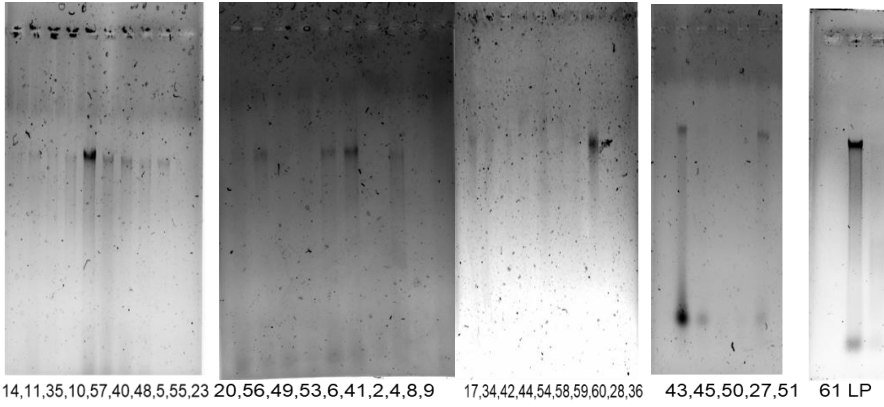


Figura S8. Análisis de diversidad beta de la microbiota intestinal durante el consumo de cerveza por tiempo y género. Femenino (**A**) Masculino (**B**). Calculado por métricas de disimilitud usando tablas OTU y análisis Weighted UniFrac. Los análisis muestran la diferencia entre el día 1 (color rojo) y el día 30 (color azul). Se generaron diagramas de dispersión tridimensionales utilizando análisis de coordenadas principales (PCoA) en tres ejes diferentes que muestra el porcentaje de diferencias totales. Los *p-value* se calcularon utilizando el método ANOSIM para comparar las diversidades beta. La cerveza sin alcohol (Femenino y Masculino) tiene diferencias significativas (**A**; *p-value* 0.001), (**B**; *p-value* 0.001); pero no para la cerveza con alcohol (Femenino y Masculino) (**C**; *p-value* 0.322) (**D**; *p-value* 0.475).

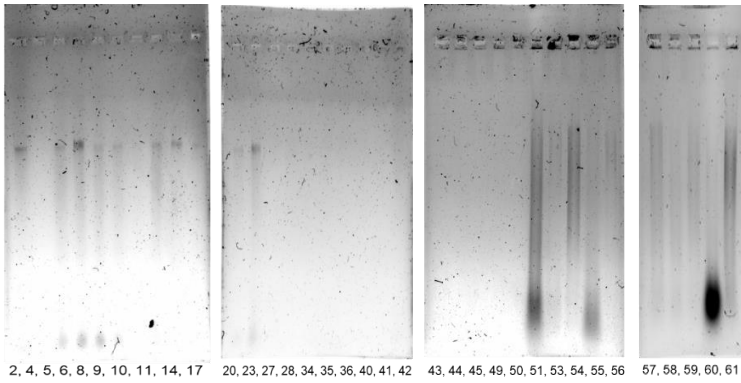
Anexo 4: Geles de agarosa (0.5%) del DNA genómico de las muestras fecales de los participantes

Cerveza sin alcohol

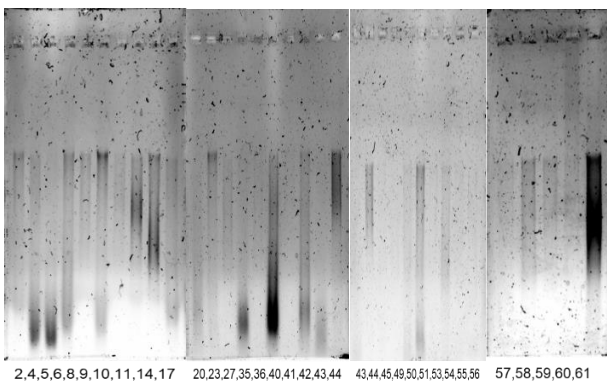
Día 1



Día 15

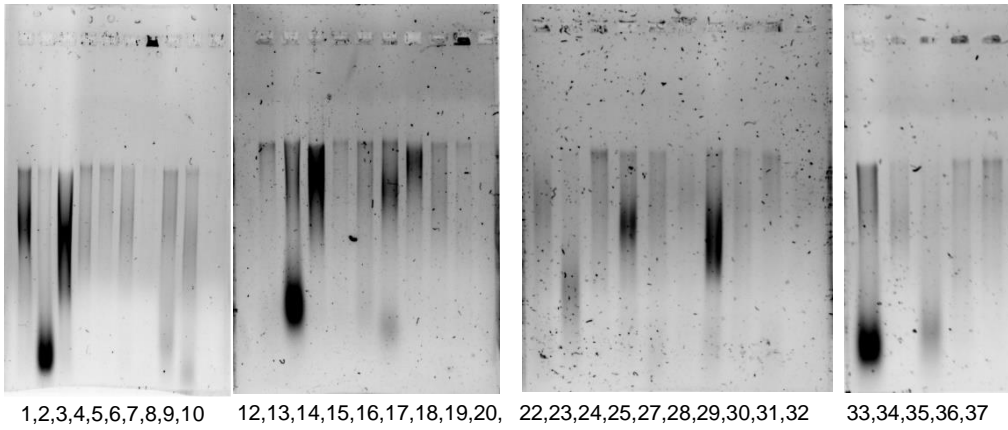


Día 30

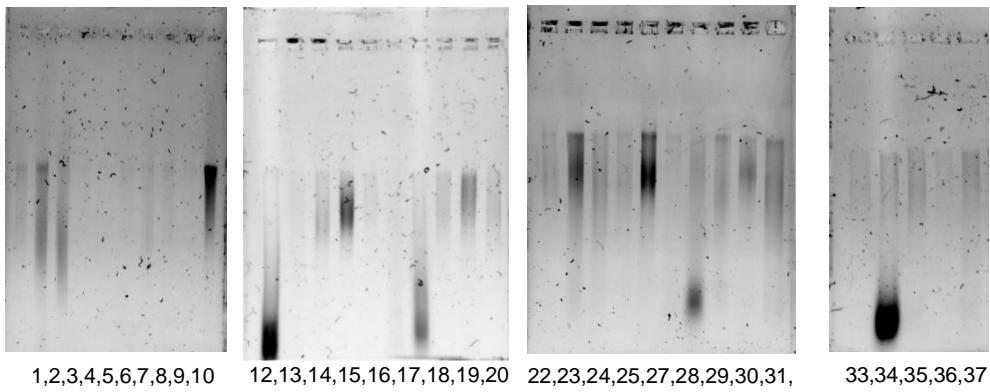


Cerveza con alcohol

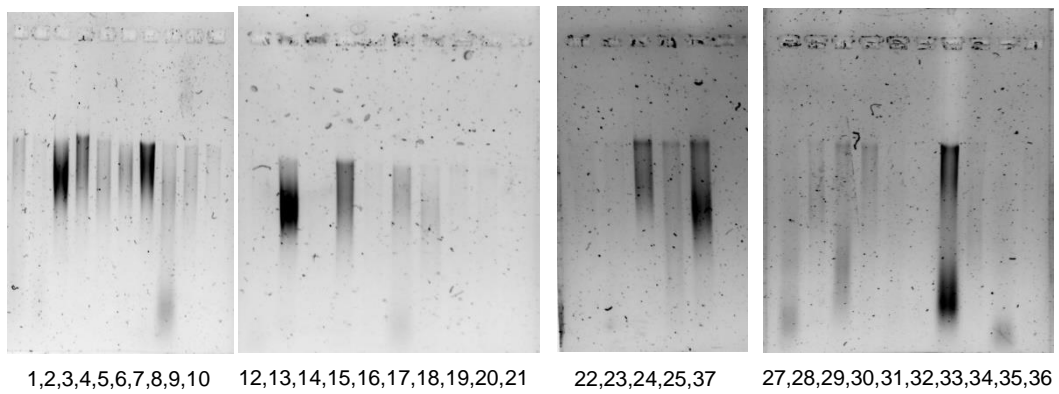
Día 1



Día 15



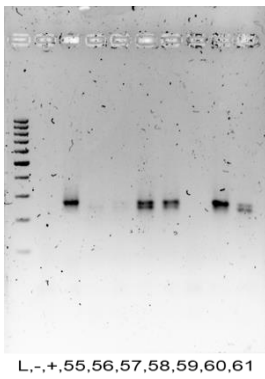
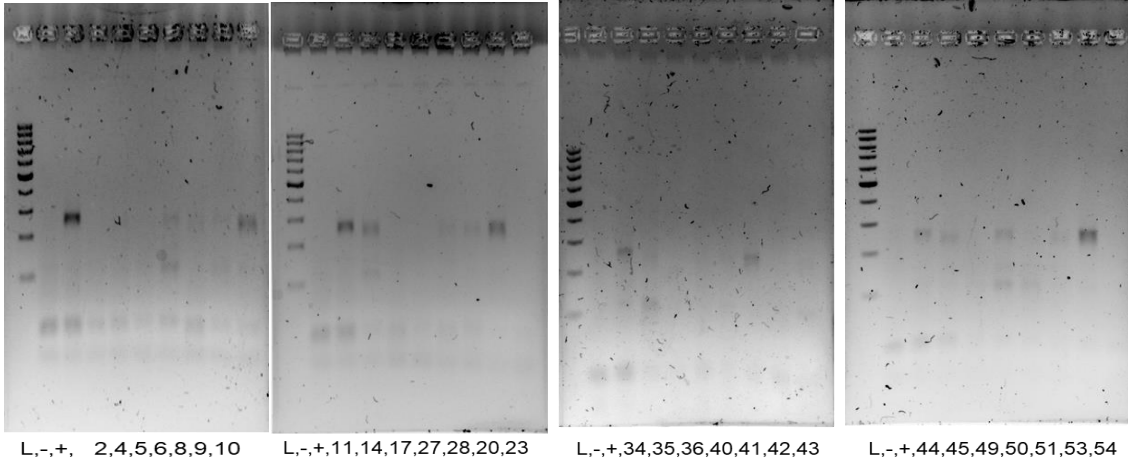
Día 30



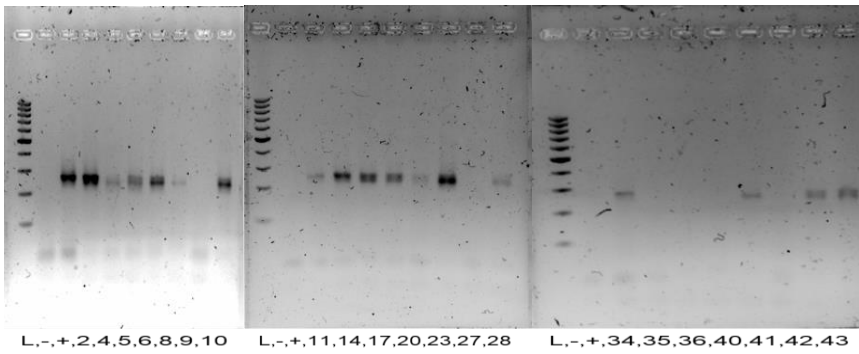
Anexo 5: Geles de agarosa (2%) de los amplicones de la región V3 del gen 16S ribosomal a partir del DNA obtenido de las muestras fecales

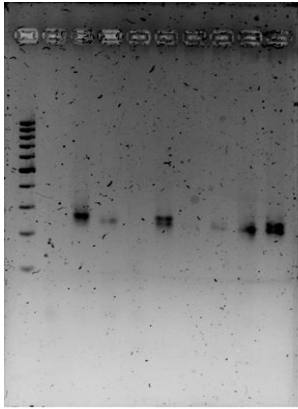
Cerveza sin alcohol

Día 1

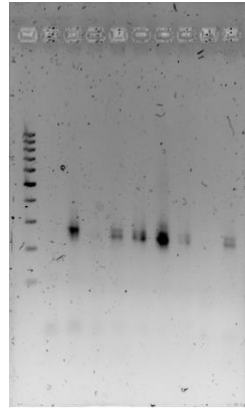


Día 15



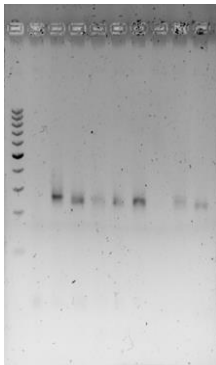


L-, +, 44, 45, 49, 50, 51, 53, 54

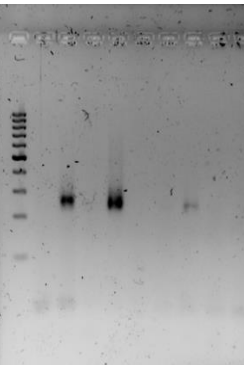


L-, +, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61

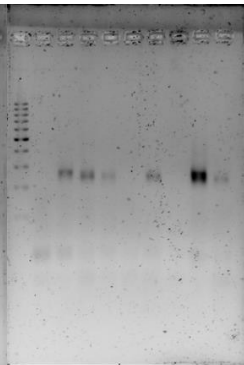
Día 30



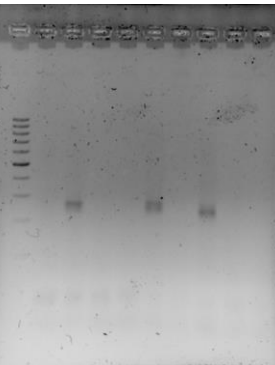
L-, +, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10



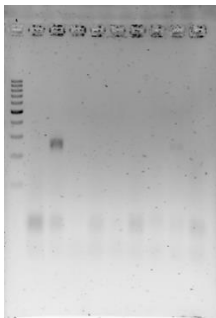
L-, +, 11, 14, 17, 20, 23, 27, 28



L-, +, 34, 35, 36, 40, 41, 42, 43

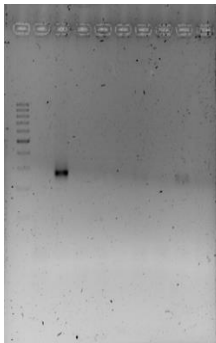


L-, +, 44, 45, 49, 50, 51, 53, 54

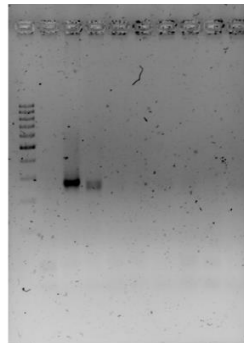


L-, +, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61

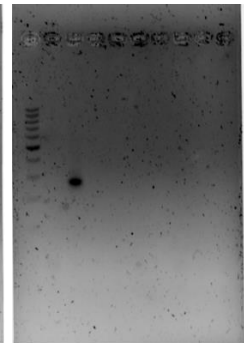
Repeticiones de PCR



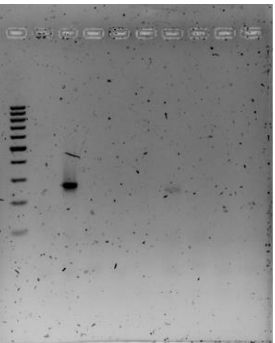
L-, +, 2, 4, 5, 8, 9, 14, 17



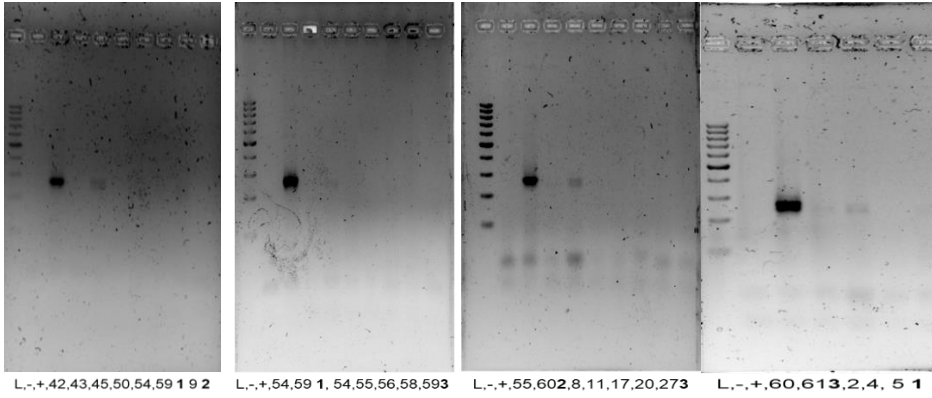
L-, +, 23, 27, 28, 34, 35, 36, 40



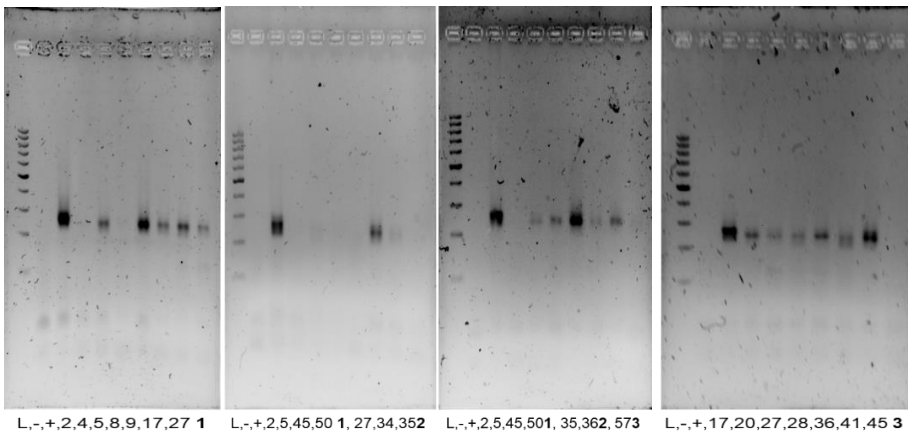
L-, +, 27, 34, 35, 36, 41, 45, 50



L-, +, 28, 36, 41, 44, 45, 50, 53

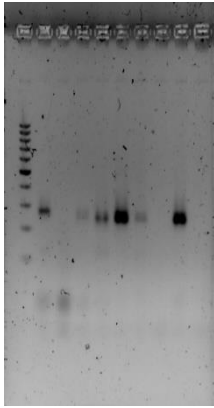


Repeticiones de extracción de DNA y PCR

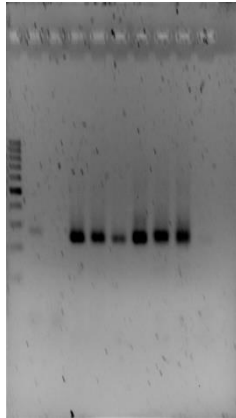


Cerveza con alcohol

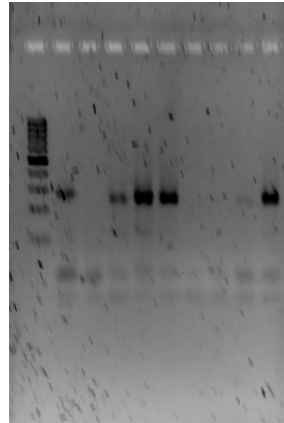
Día 1



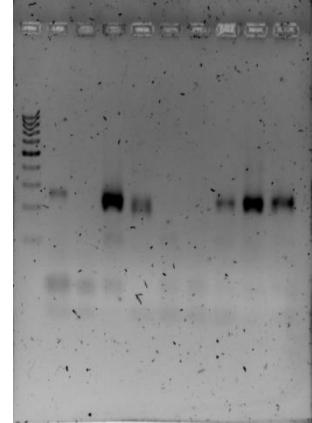
L,+,-, 1,2,3,4,5,6,7



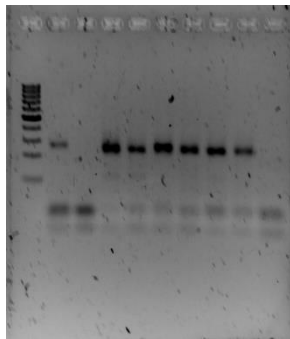
L,+,-, 8,9,12,13,14,15



L,+,-, 16,17,18,19,20,21,22

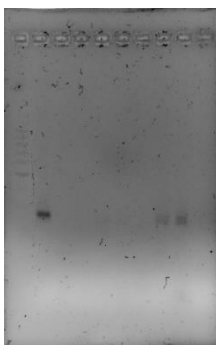


L,+,-, 23,24,25,27,28,29,30

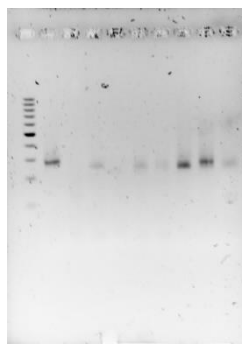


L,+,-, 31,32,33,34,35,36,37

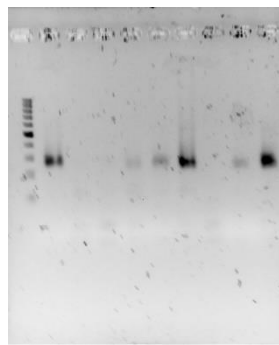
Día 15



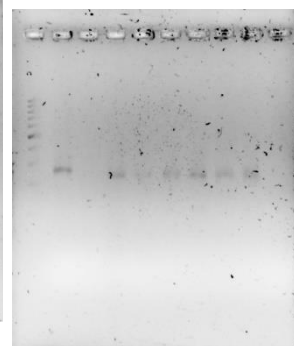
L,+,-, 1,2,3,4,5,6,7



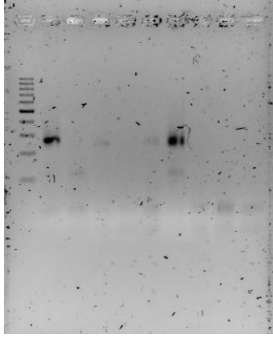
L,+,-, 8,9,12,13,14,15



L,+,-, 16,17,18,19,20,21,22

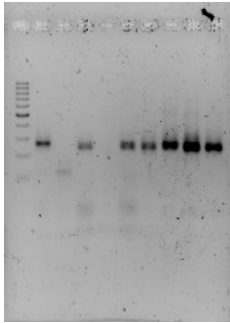


L,+,-, 23,24,25,27,28,29,30

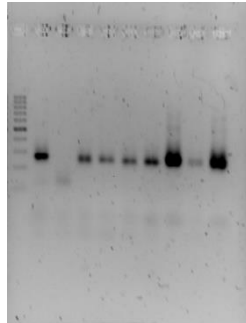


L,+,-, 31,32,33,34,35,36,37

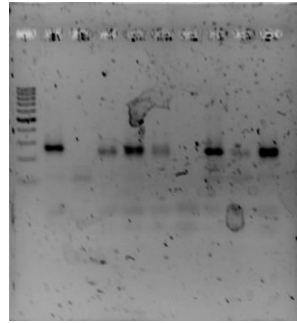
Día 30



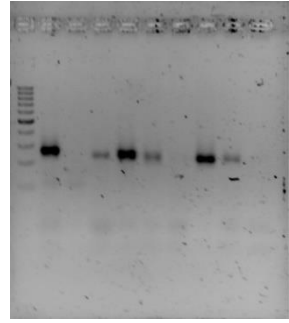
L,+,-, 1,2,3,4,5,6,7



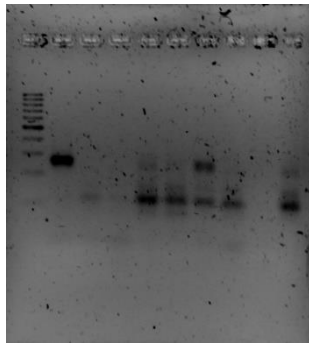
L,+,-, 8,9,12,13,14,15



L,+,-, 16,17,18,19,20,21,22

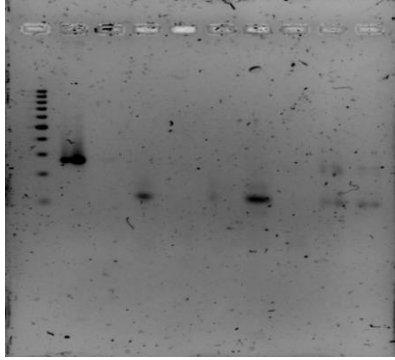


L,+,-, 23,24,25,27,28,29,30

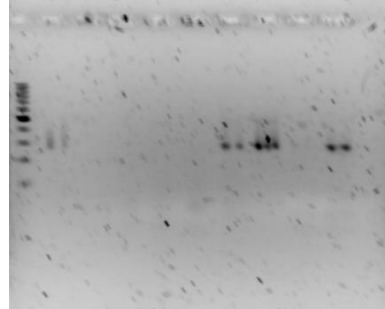


L,+,-, 31,32,33,34,35,36,37

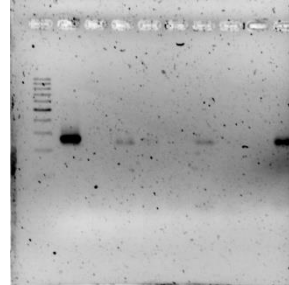
Repeticiones de PCR



L,+,-,2F23,19F39,27F46,30F49,31F1,32F2,33F3



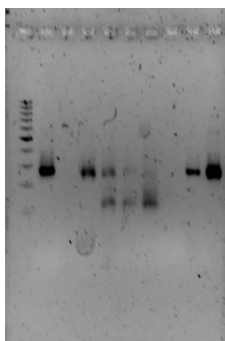
L,+,-,REP1,20F19,37F35 LECHECWFG1F8,CWFG2F9,RVJF10,PMMF11,AMF12



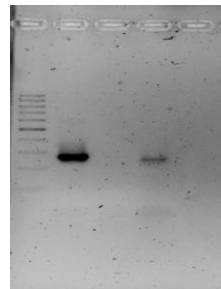
L,+,-,MTA1,15F14,19F18,20F19,37F35,MTA2,20F5,MTA3,19F39,36F6



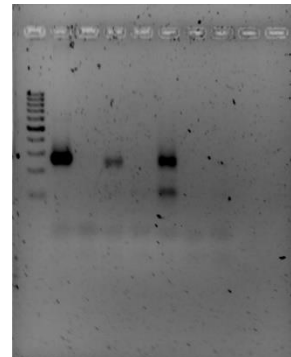
PCR L,+,-,REP3,35F5,36F6,37F7,REP2,1F36,20F5,REP1,15F14,19F18



L,+,-,MTA3,23F43



L,+,-,MTA1,19F18,20F19,MTA2,1F36,20F5,MTA3,19F39

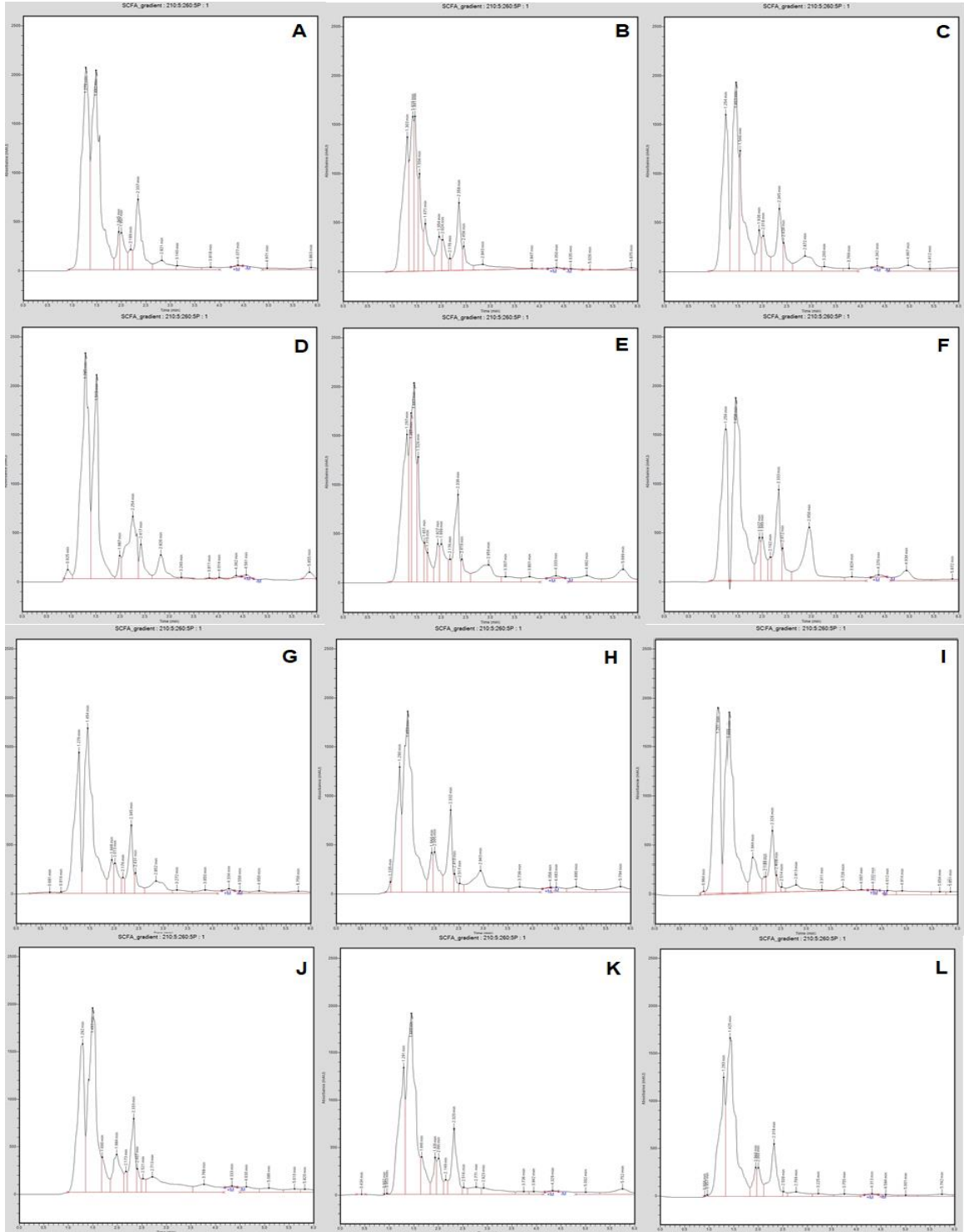


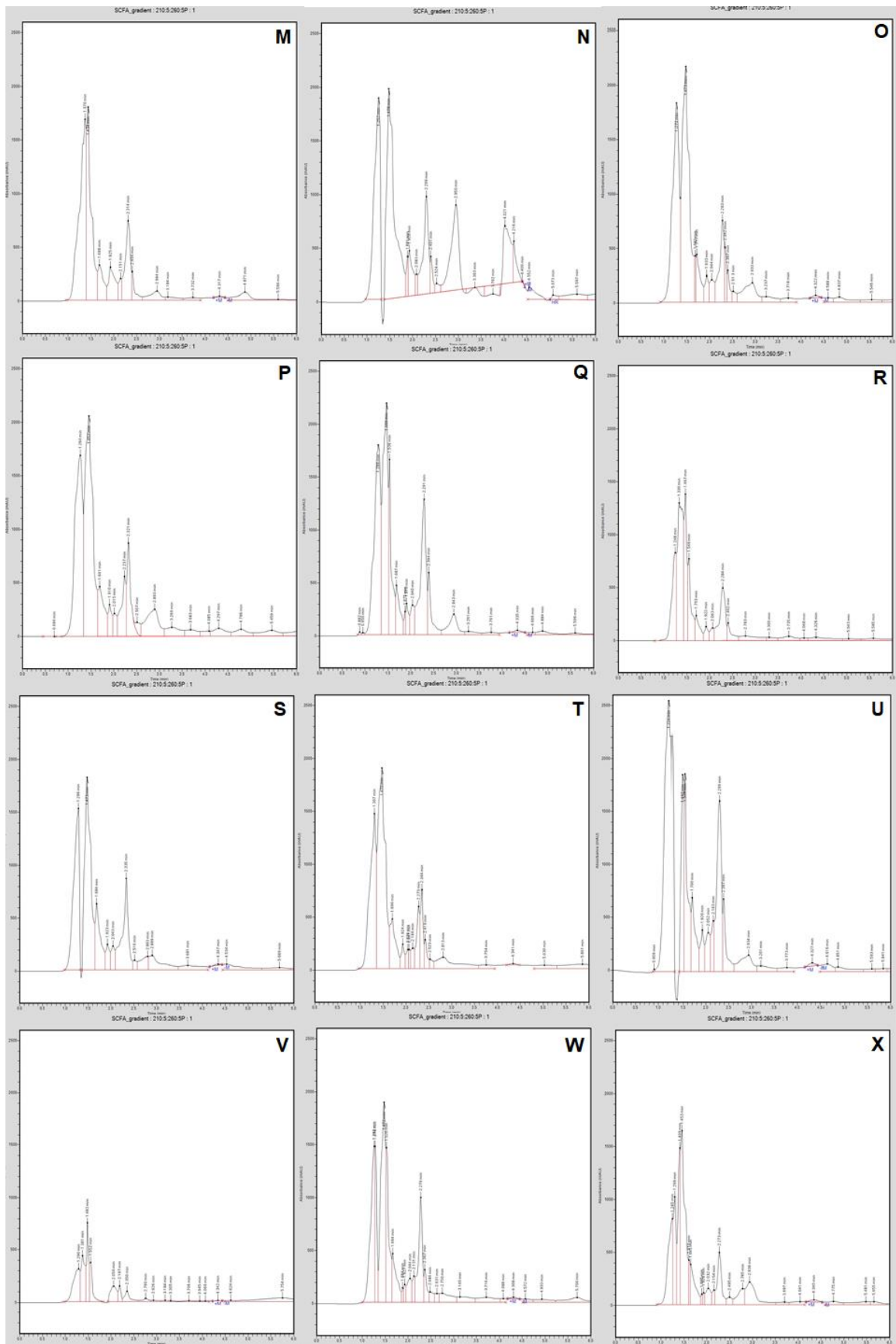
L,+,-,MTA3,37F7,32F2,33F3,37F7,MTA2,1F36,CWF9,RVJF10

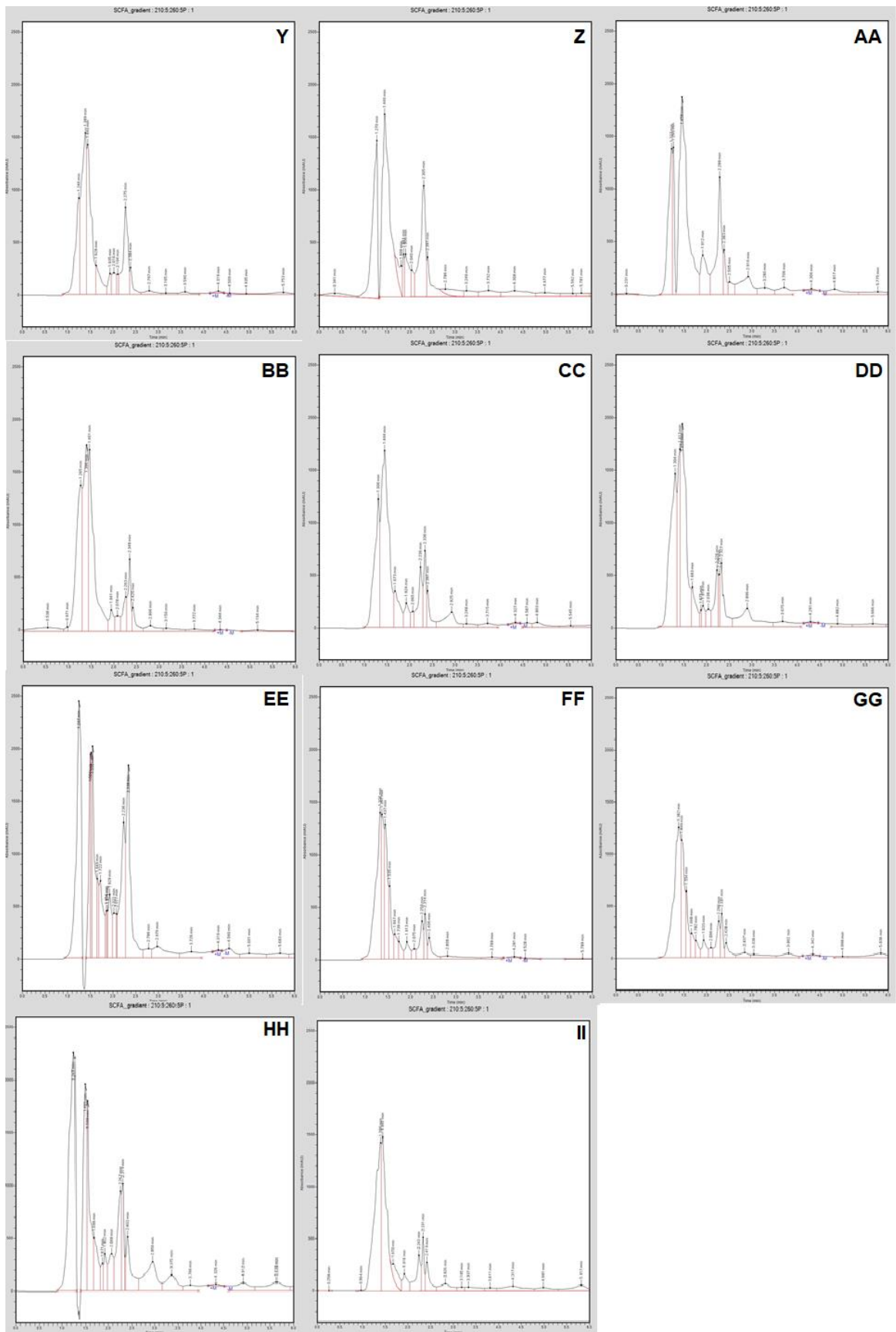
Anexo 6: Cromatogramas de los AGCC de muestras fecales de los participantes

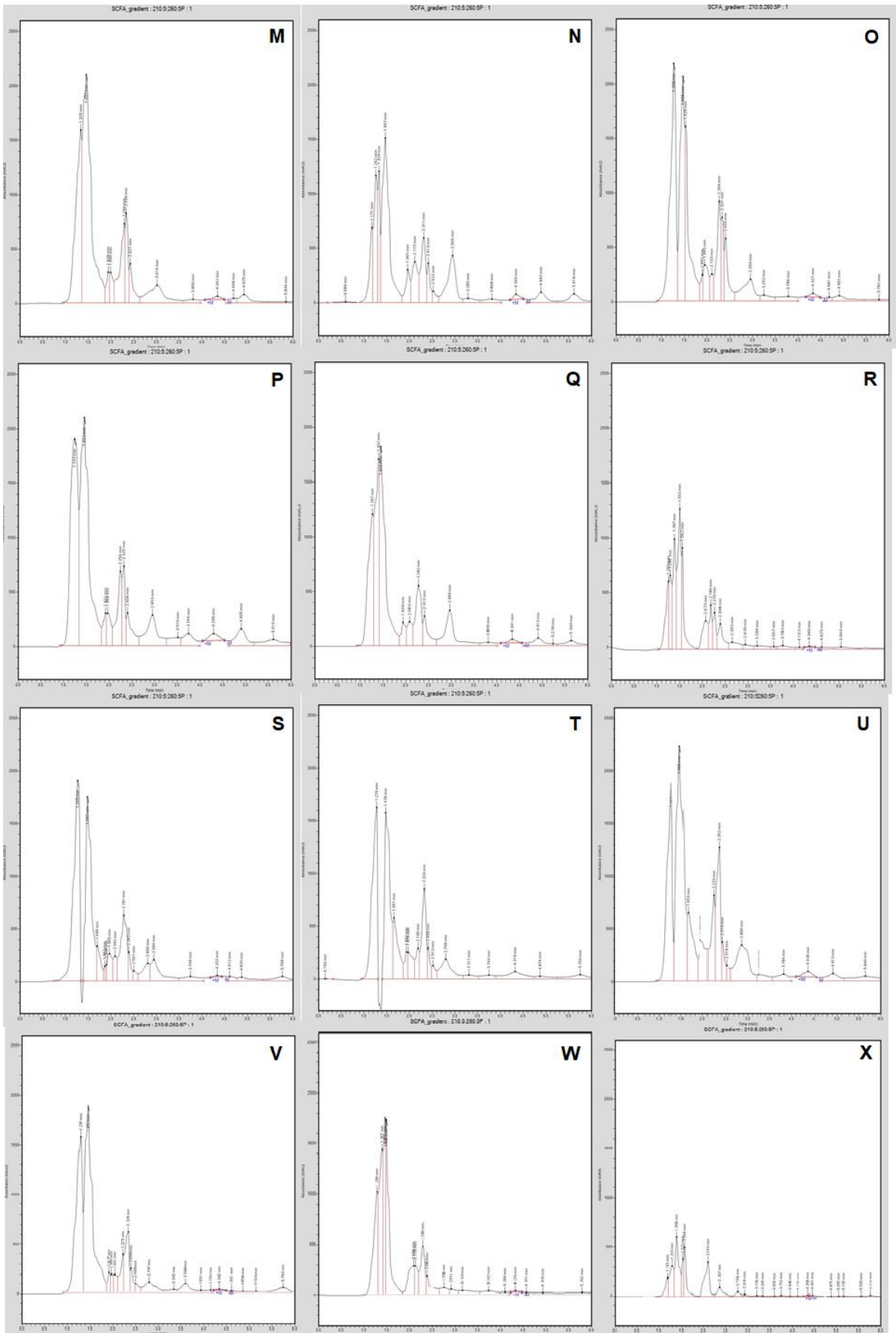
Cerveza sin alcohol

Día 1

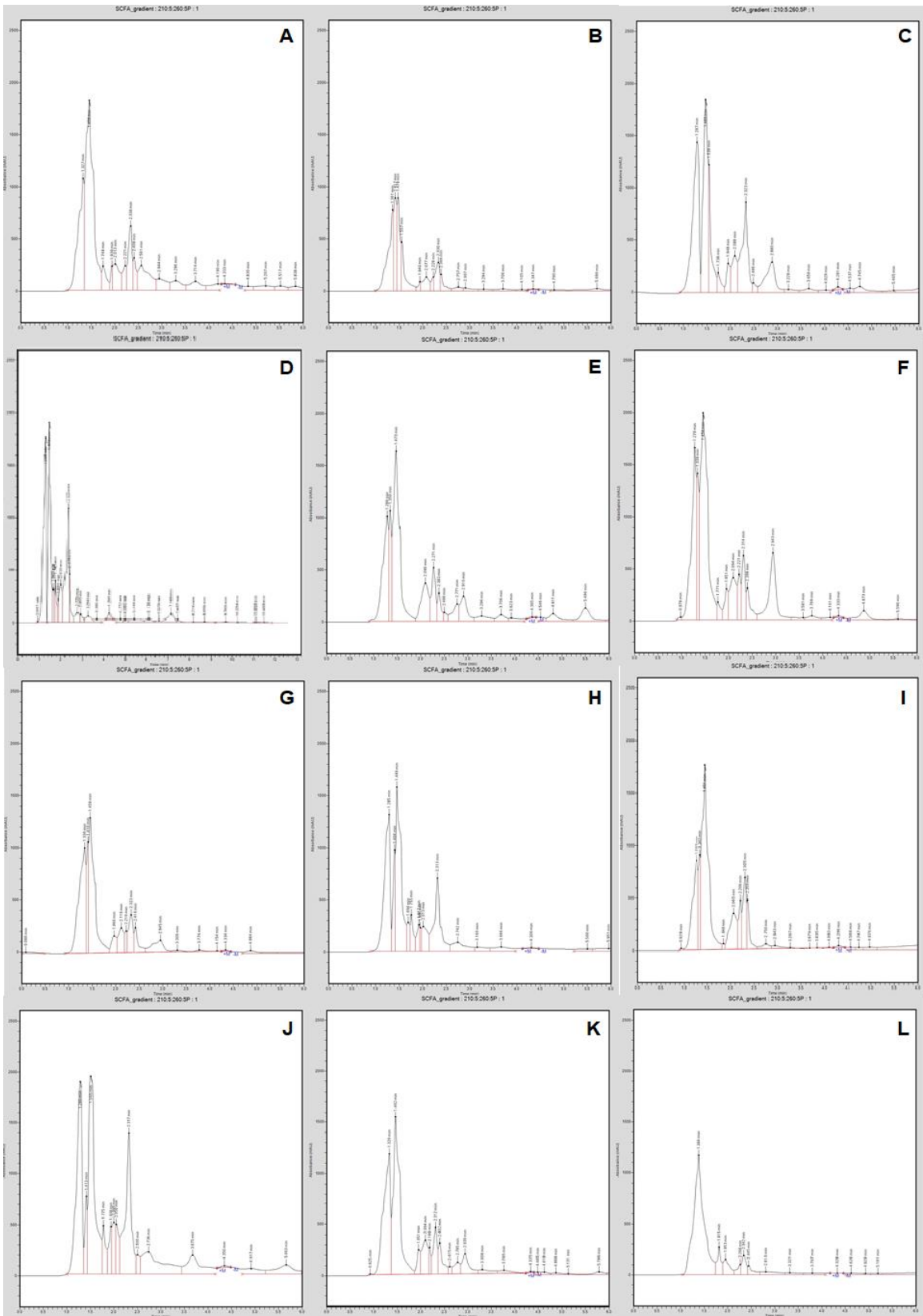


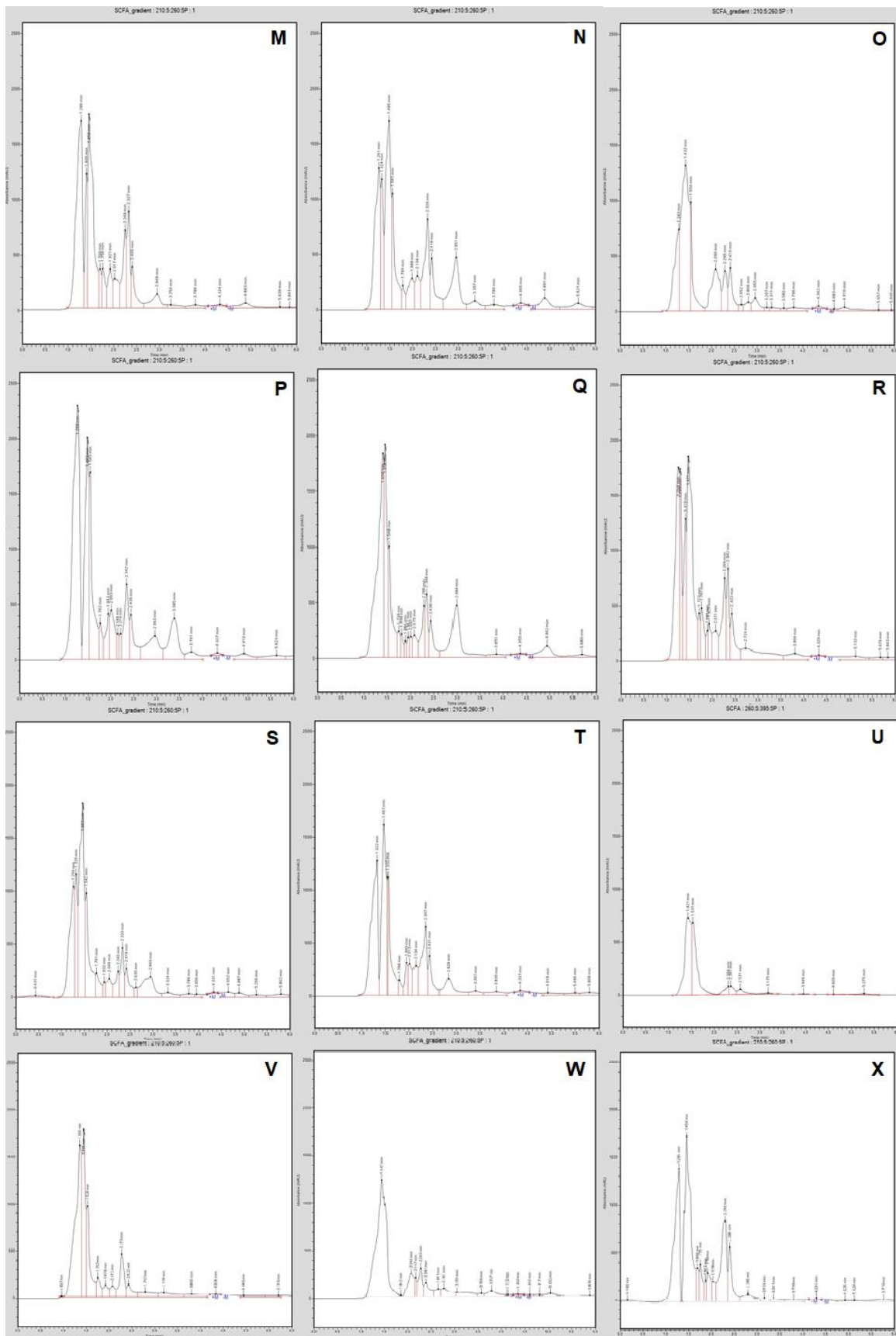


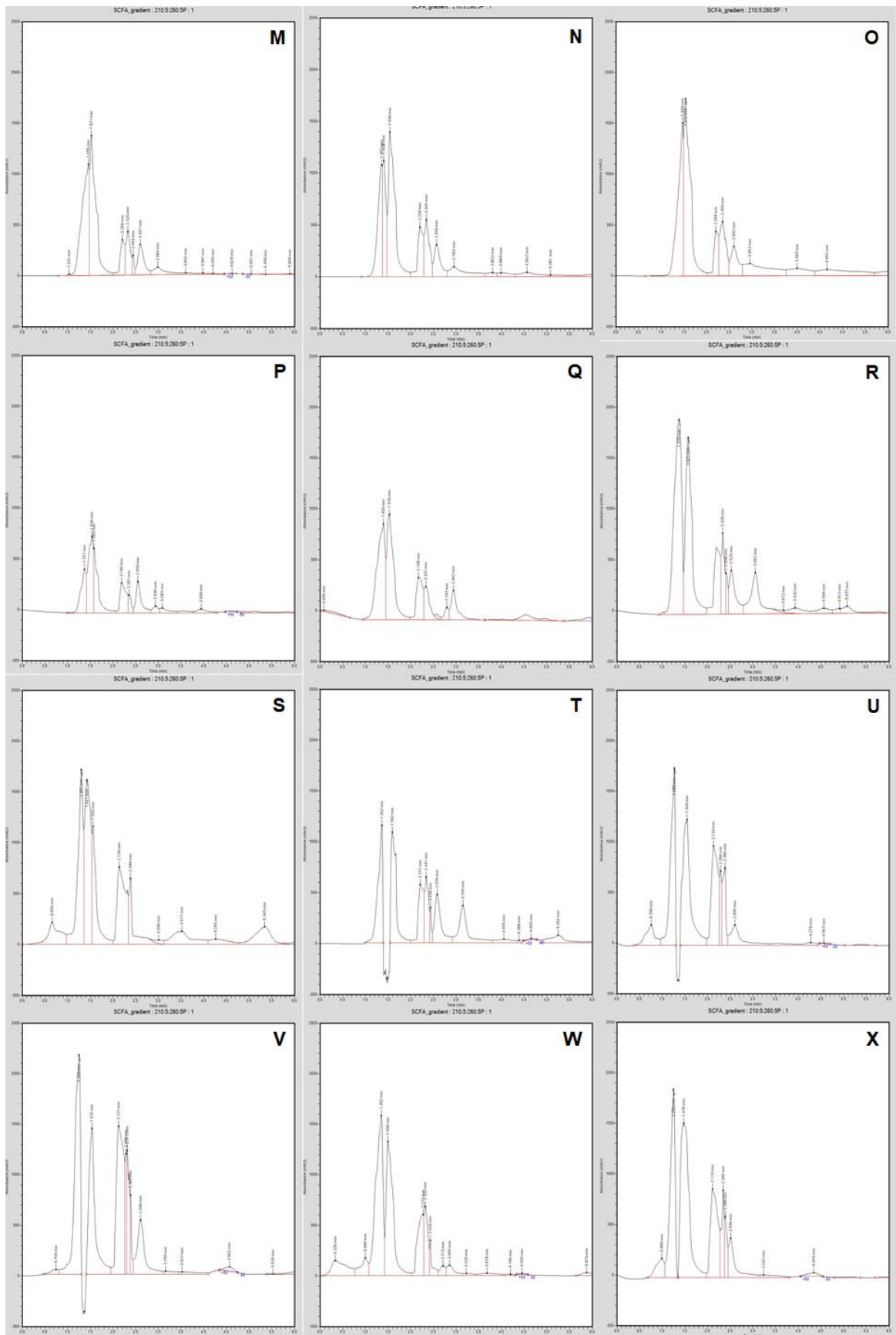


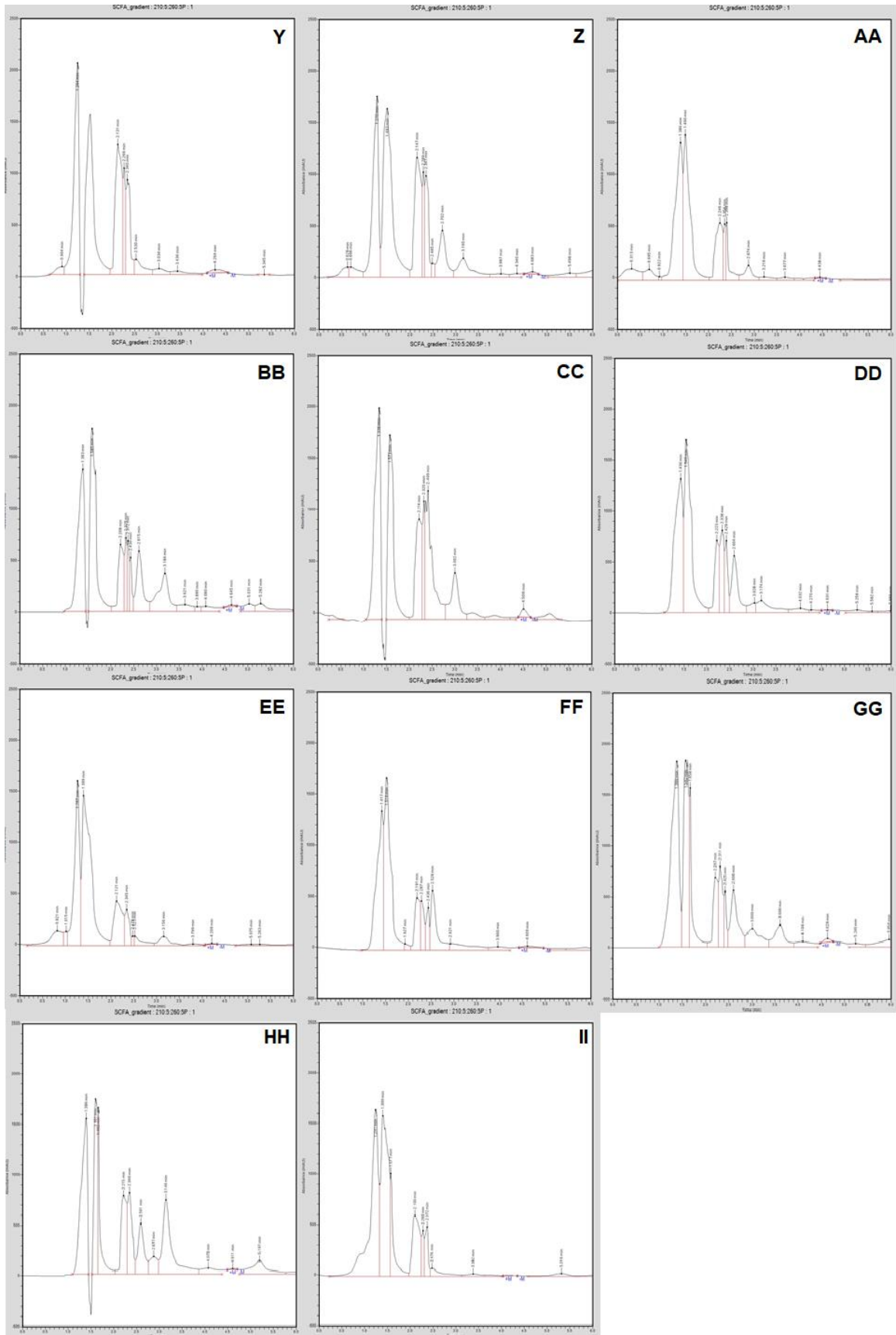


Día 30

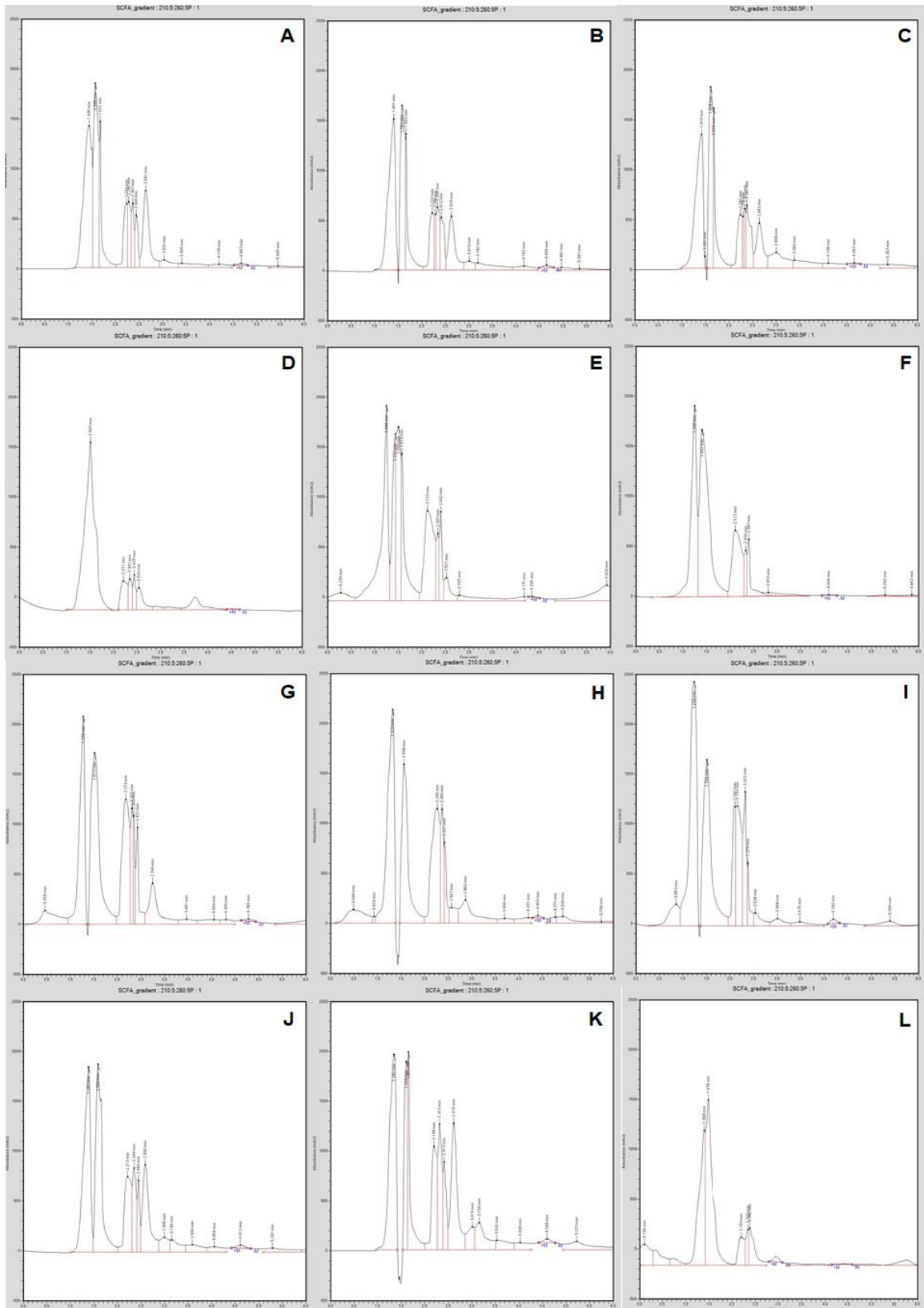


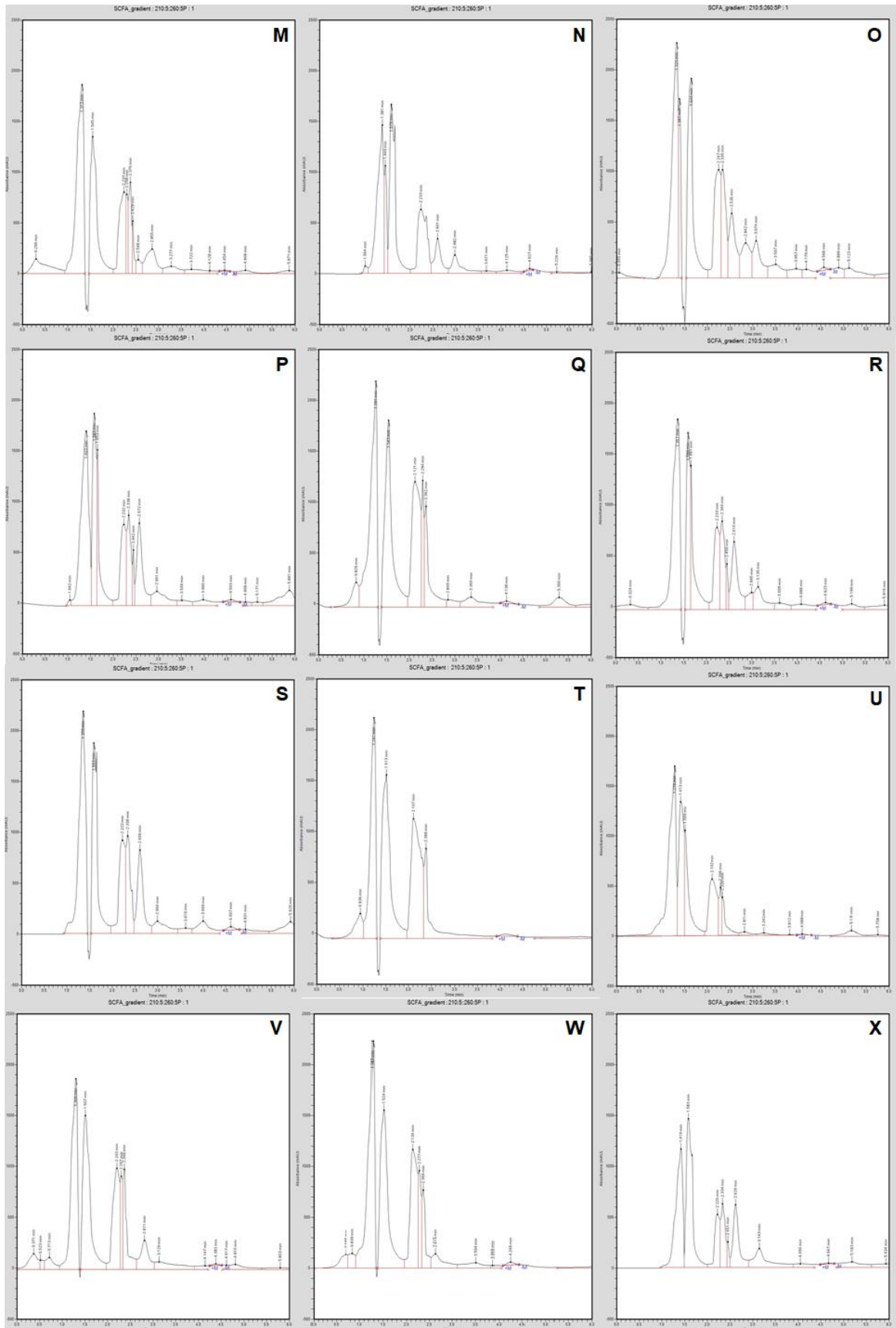


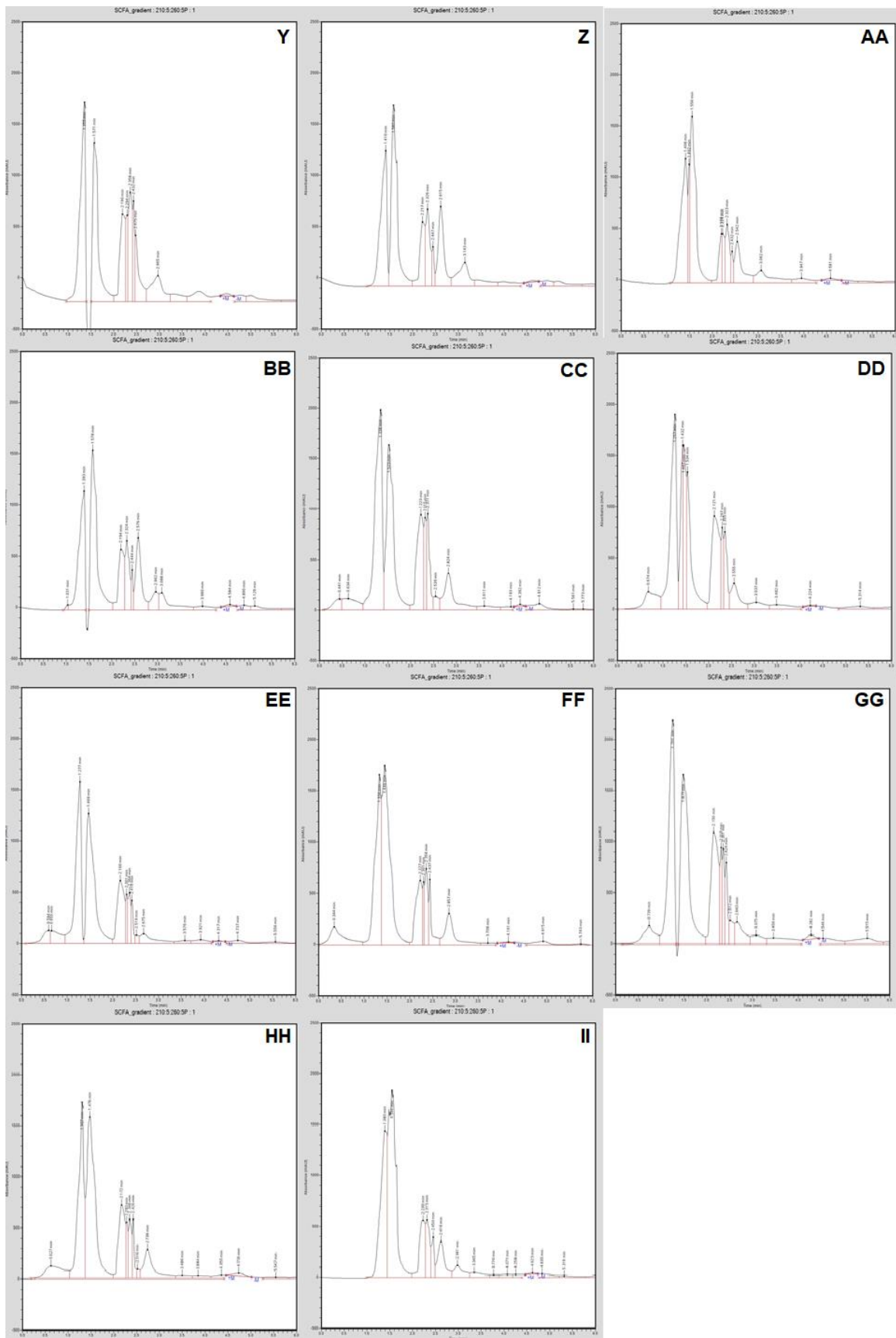




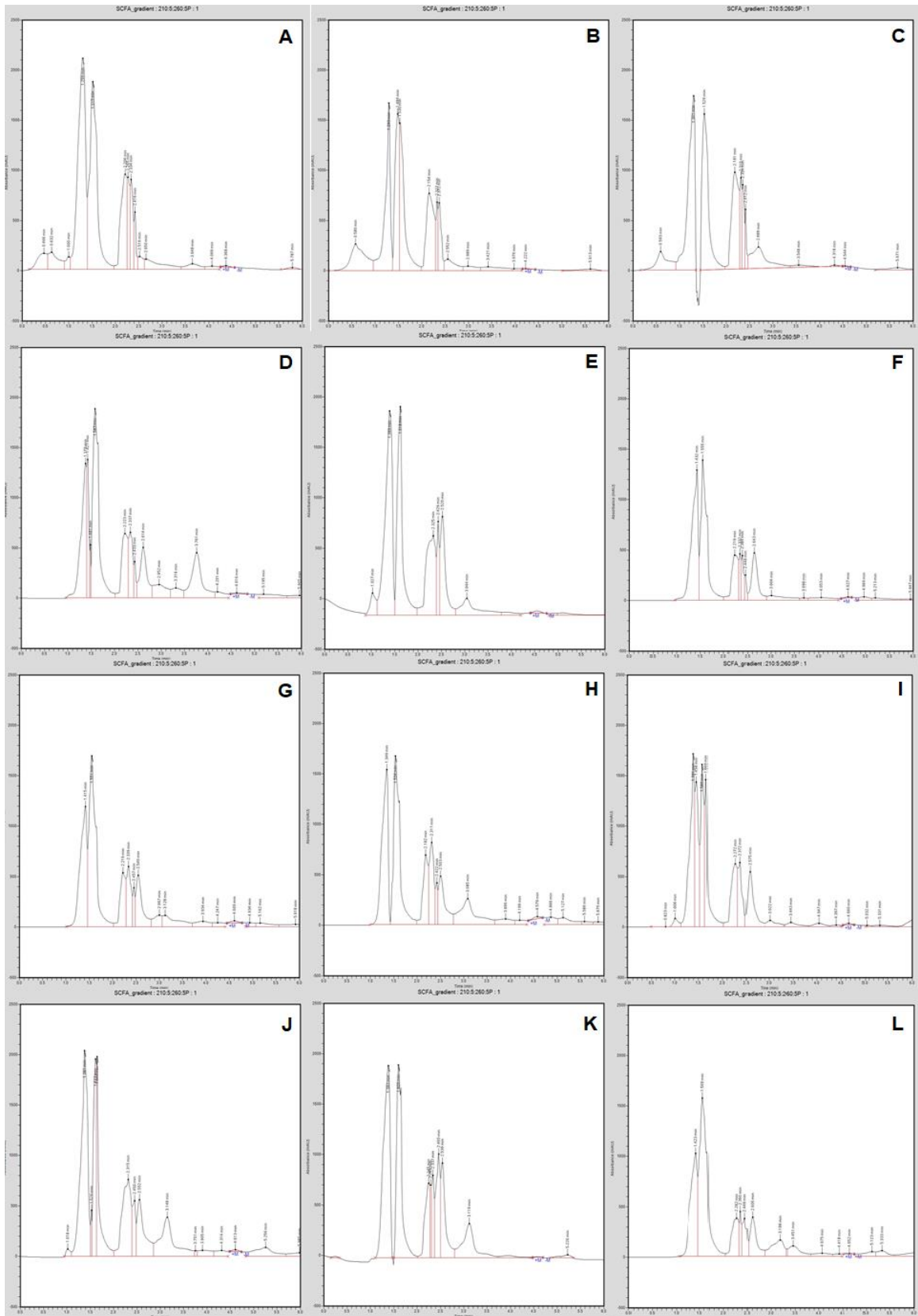
Día 15

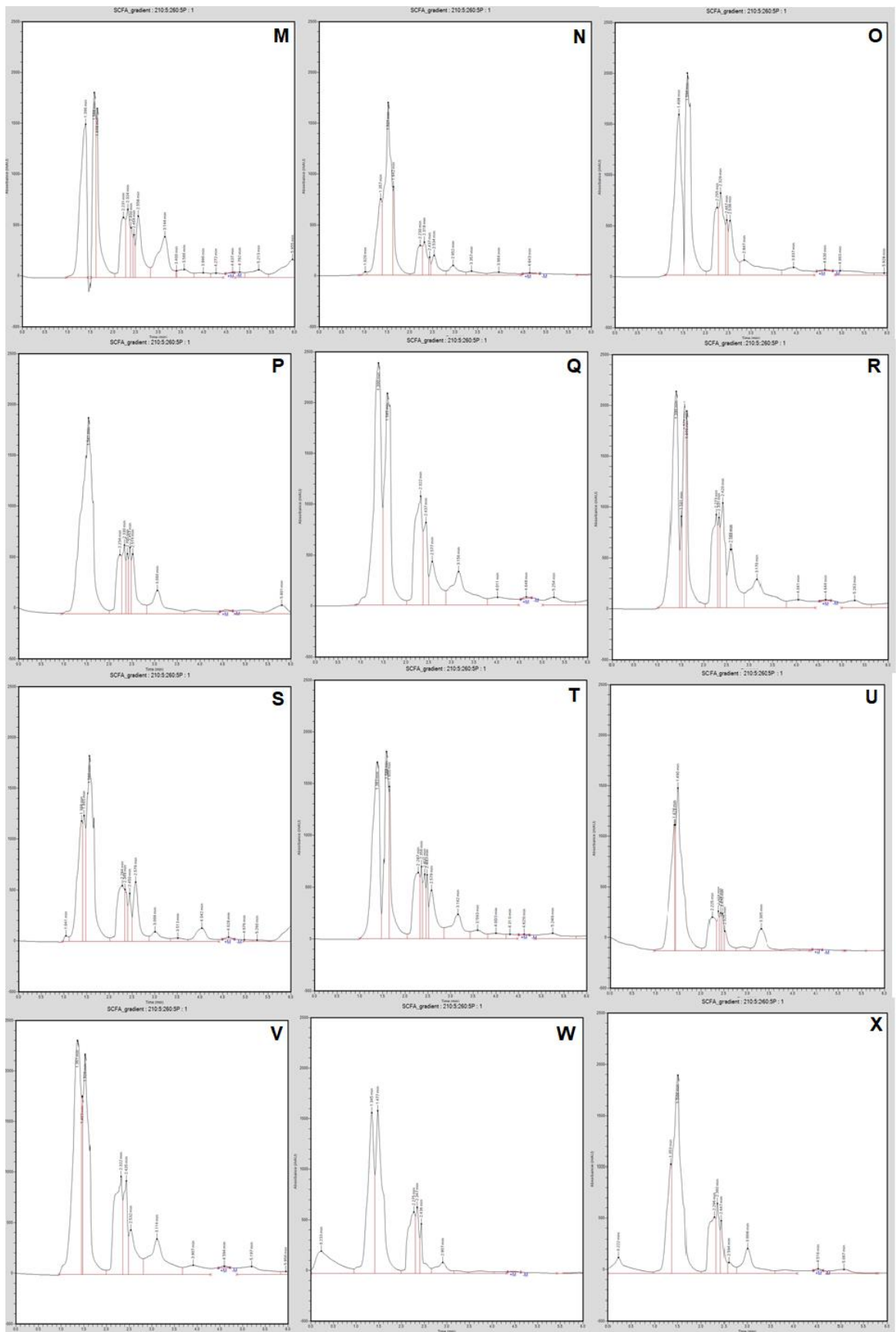


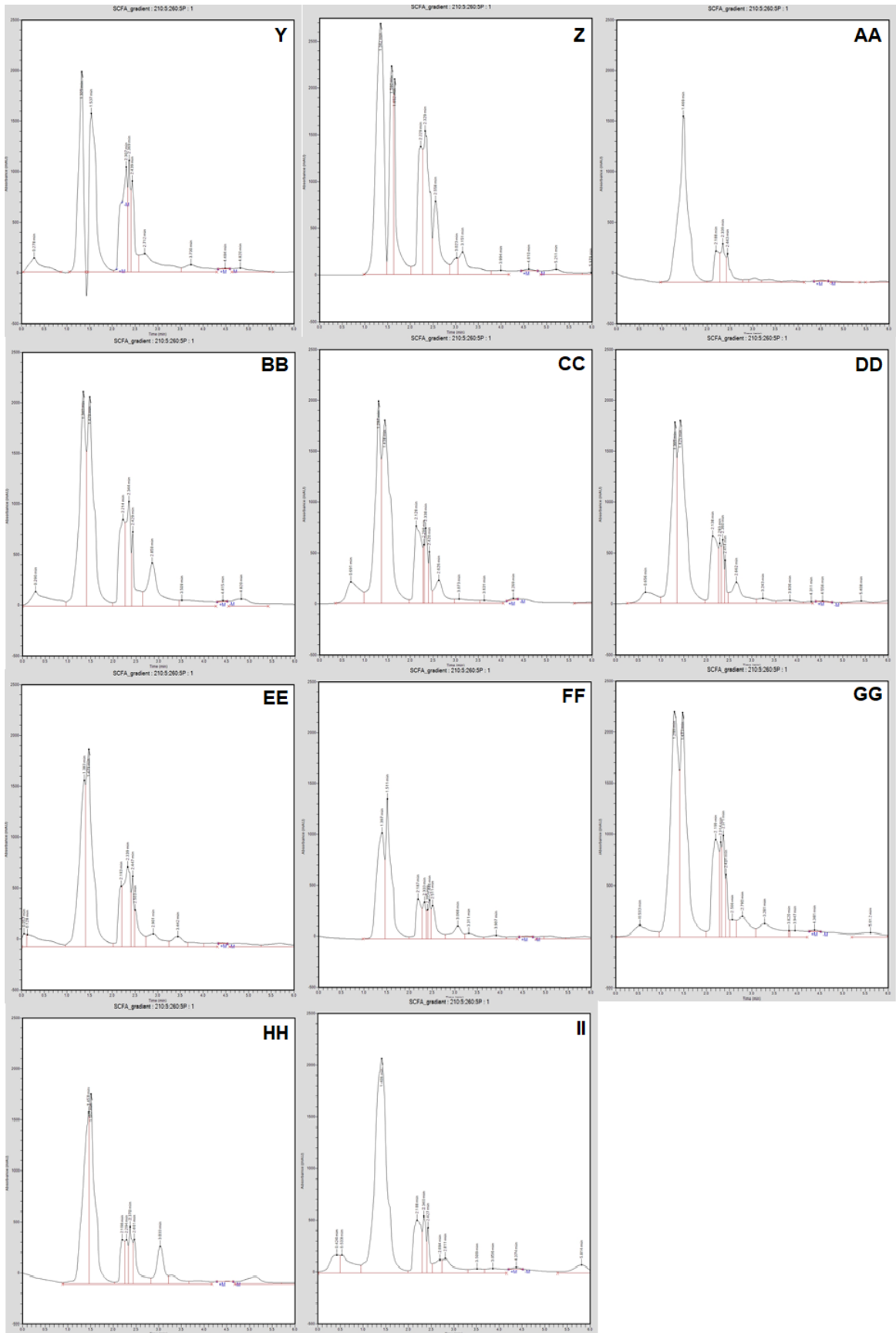




Día 30





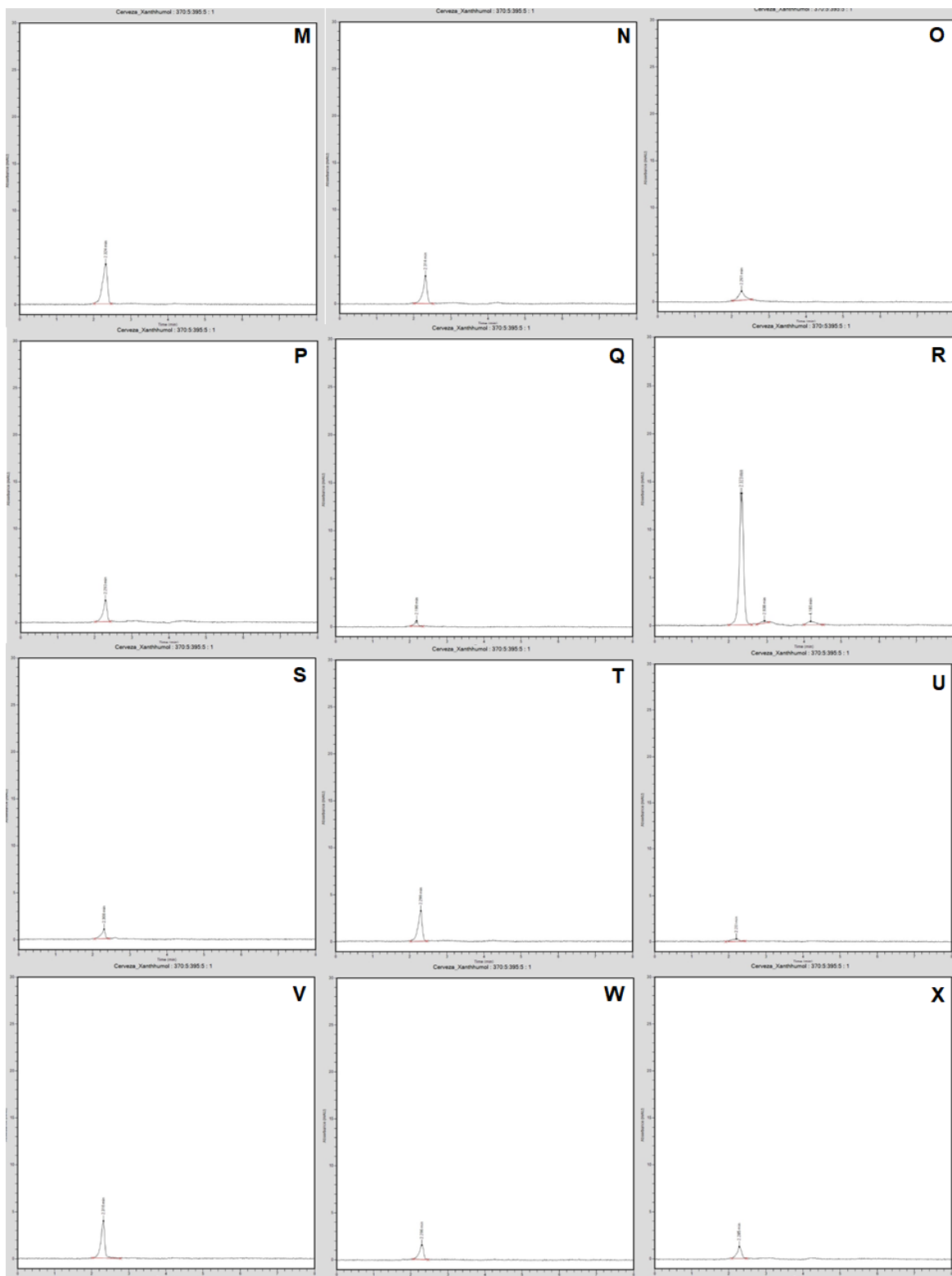


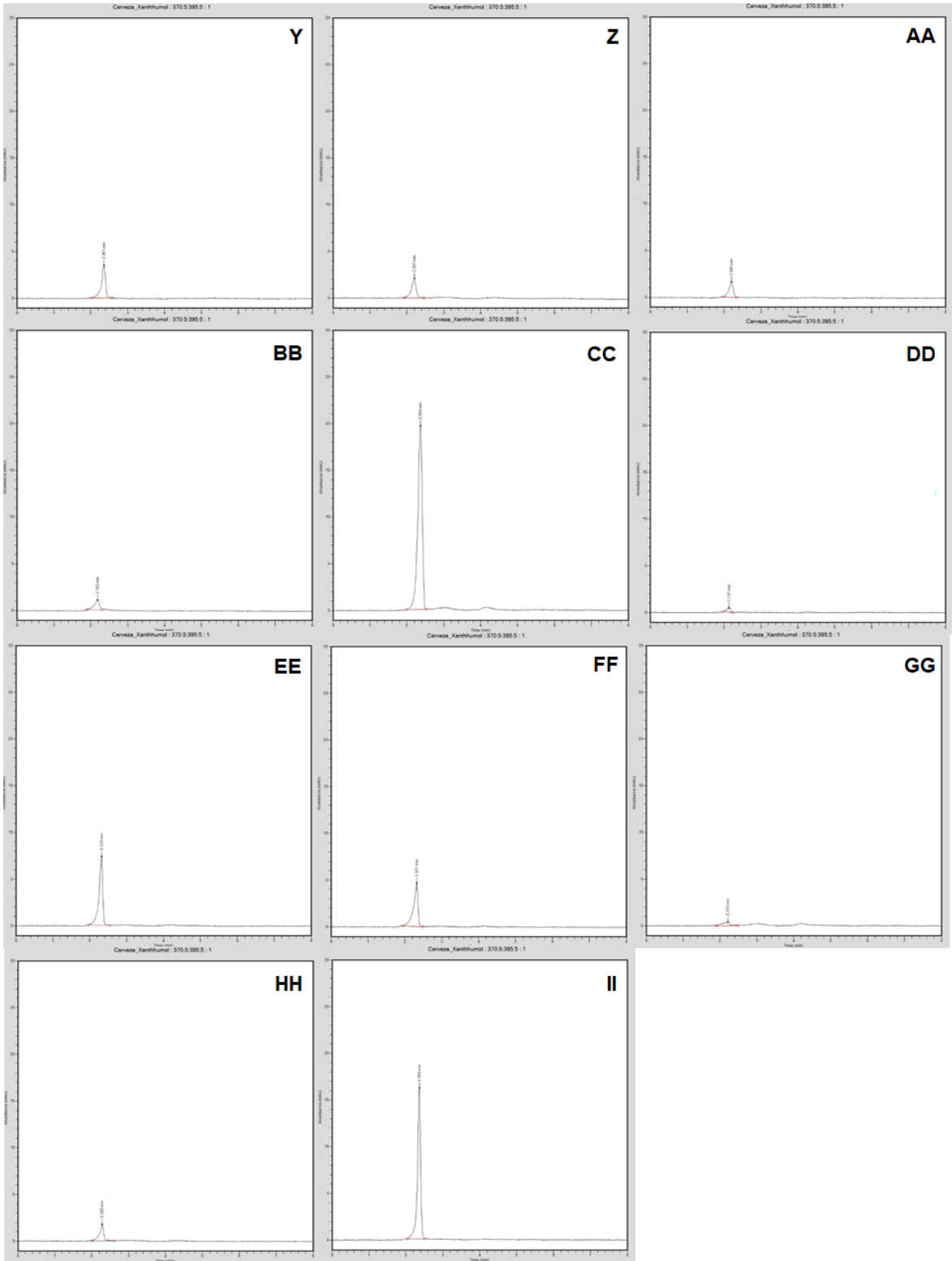
Anexo 7: Cromatogramas de los sueros de los participantes.

Cerveza sin alcohol

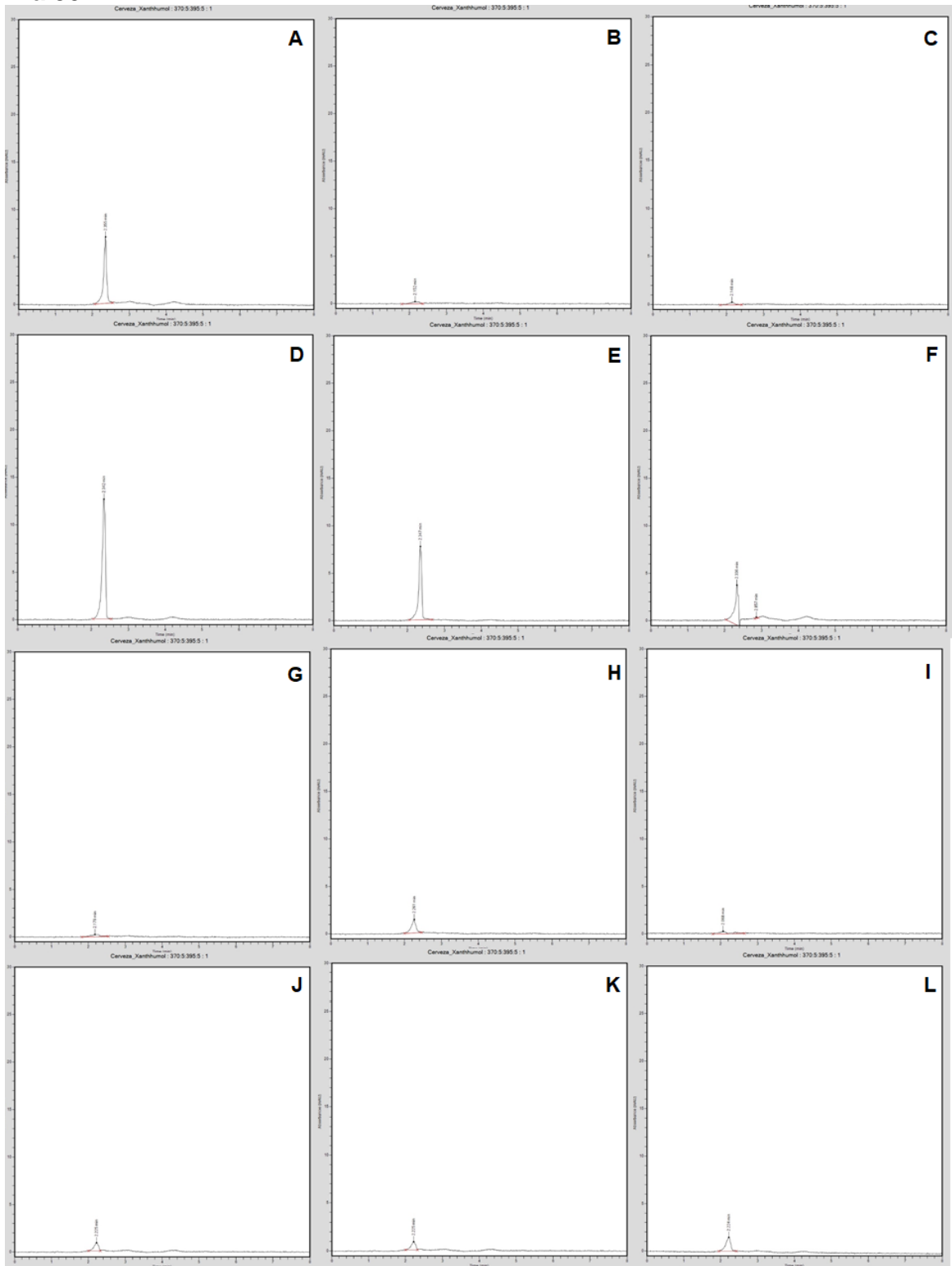
Día 15

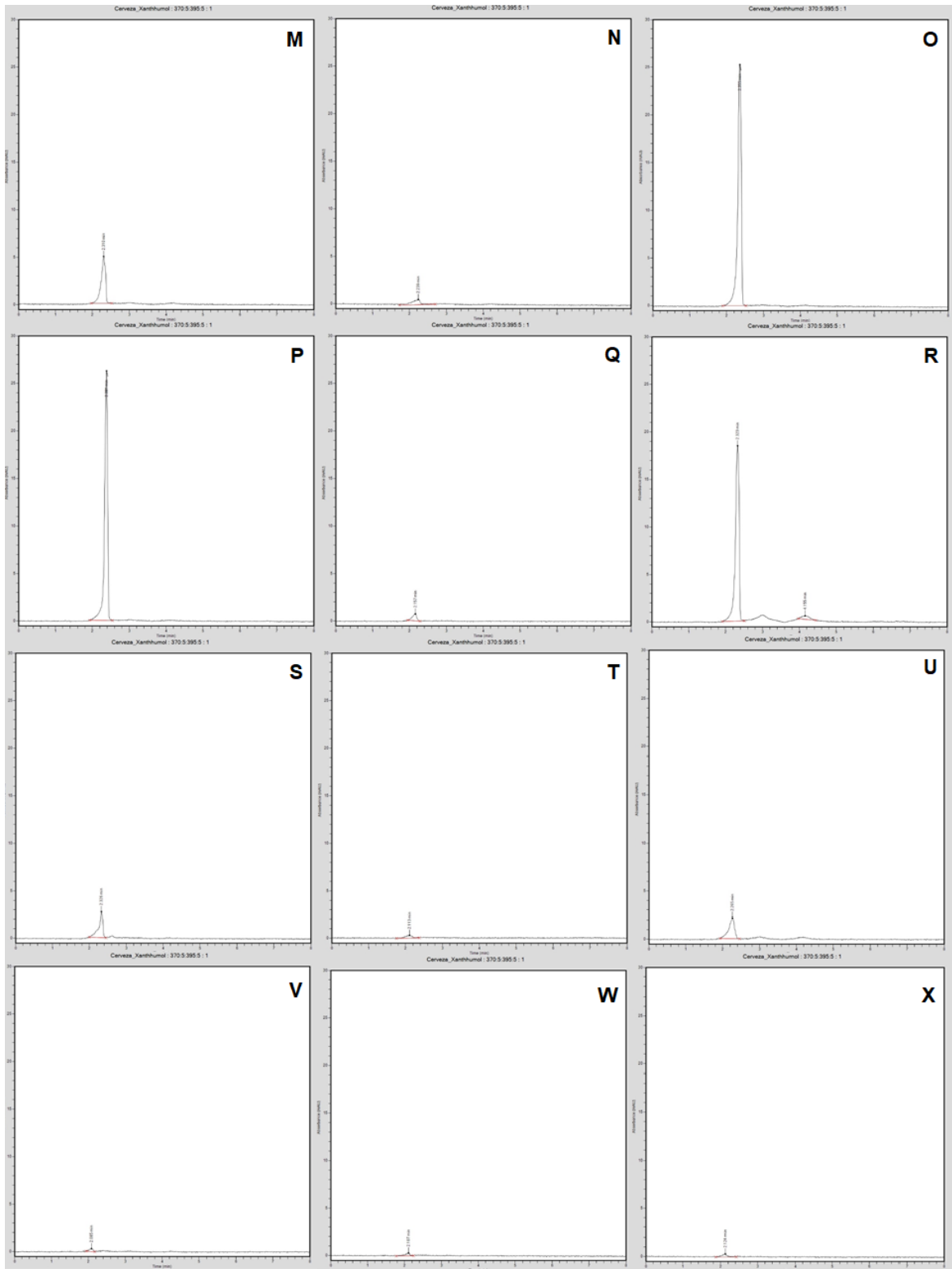






Día 30

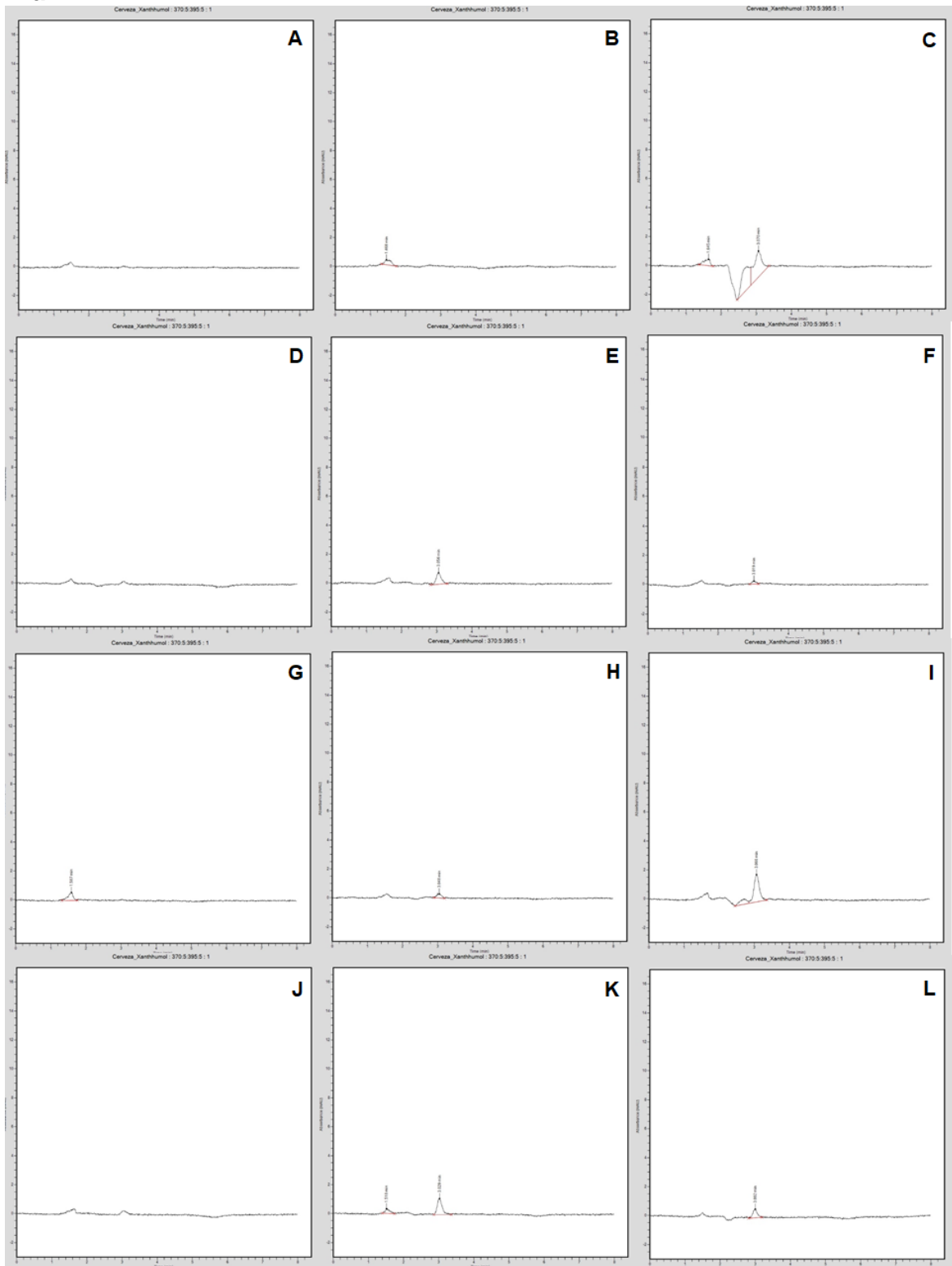




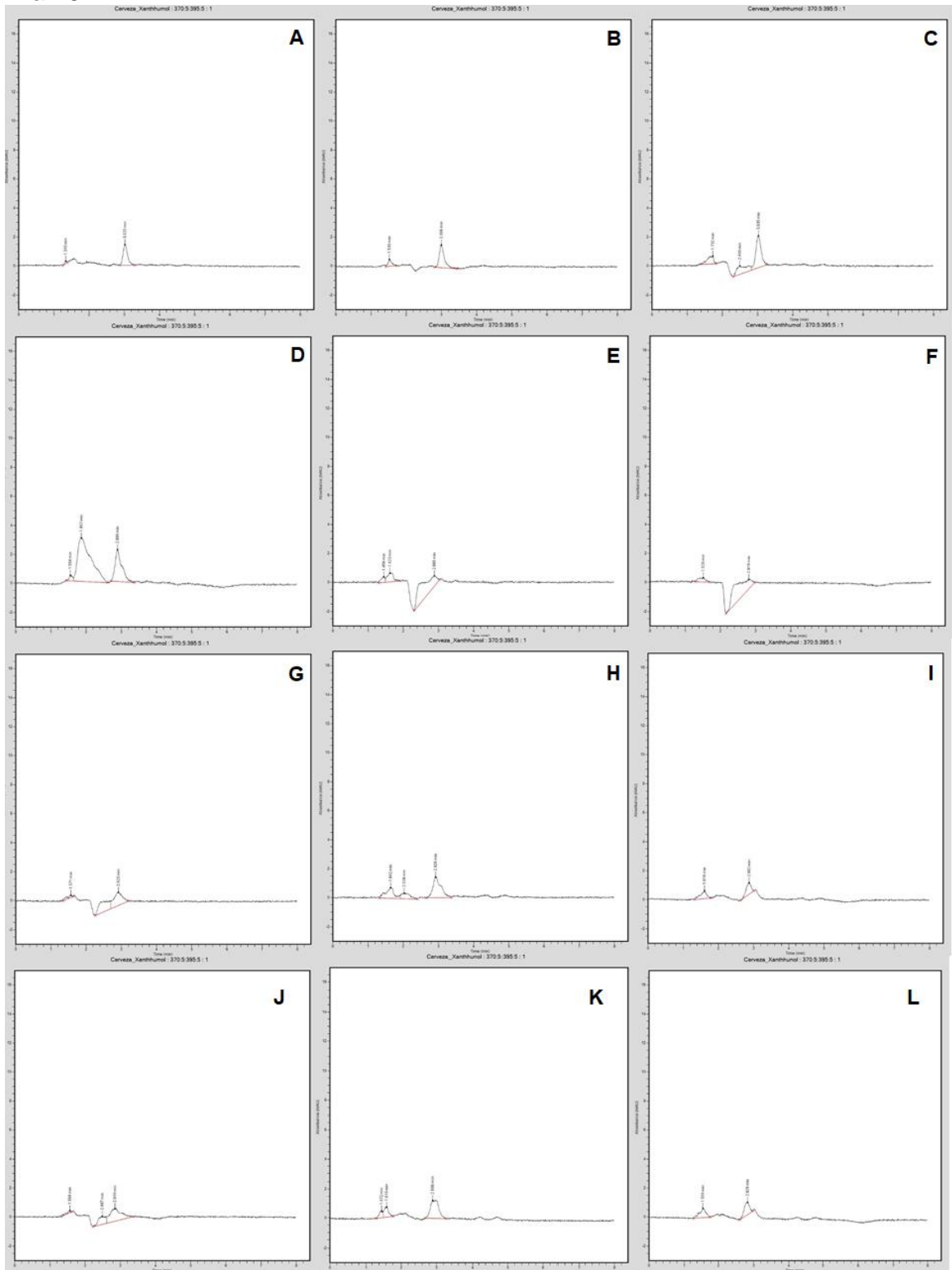


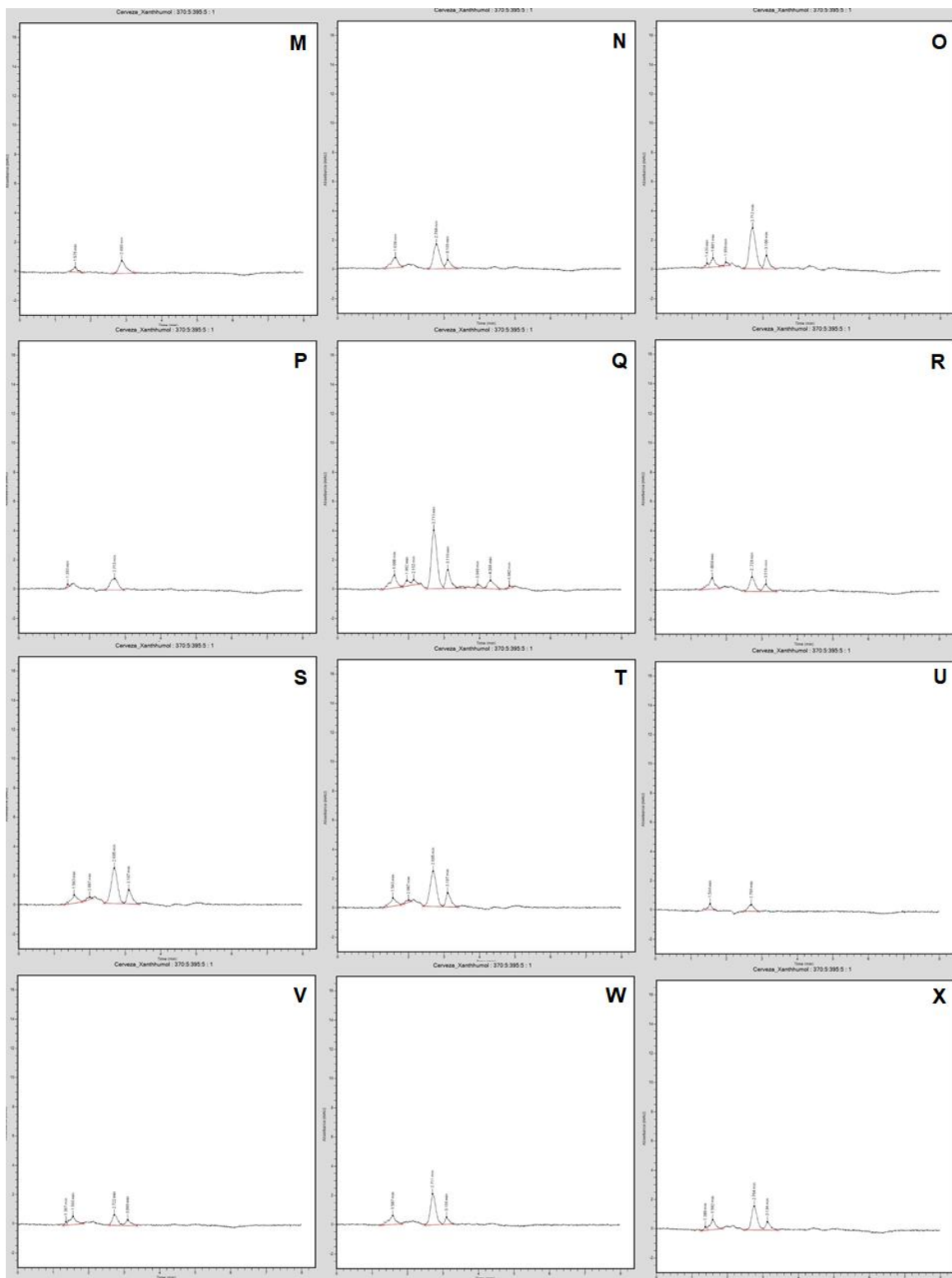
Cerveza con alcohol

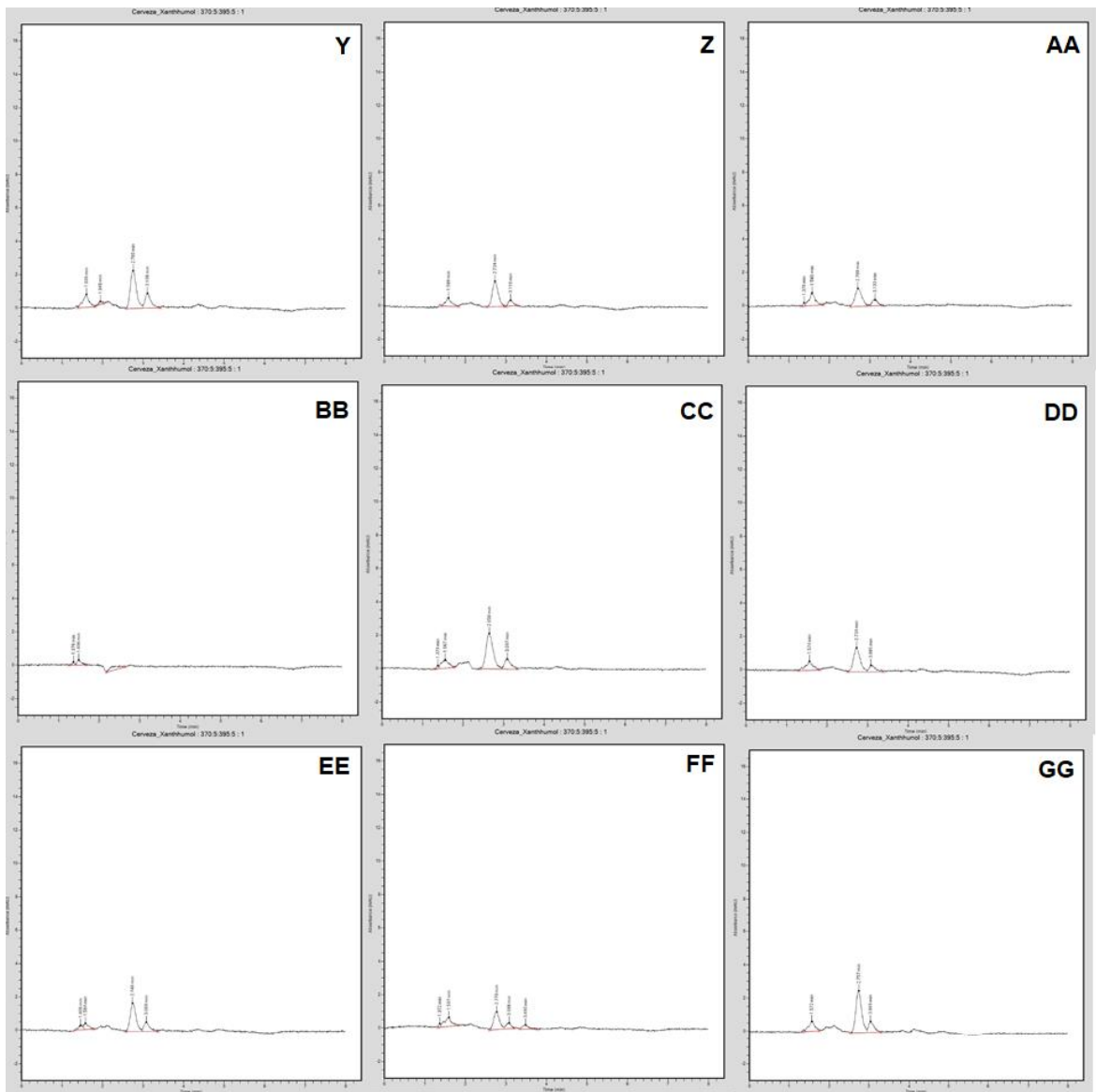
Día 1



Día 15







Anexo 8: 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 9: 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 acabo "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



Cinvestav

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-