



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del nopal en un modelo animal de obesidad inducido por dieta y el impacto en la composición de la microbiota.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Sánchez Tapia Mónica Todd Curie

TUTOR:

Dra. Nimbe Torres y Torres. INCMNSZ

COMITÉ TUTOR:

Dr. Javier Torres López. CMN SXXI
Dr. José Guillermo Aguilar Osorio. FQ, UNAM

Ciudad de México. Abril, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

VOCAL: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

VOCAL: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

VOCAL: DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

SECRETARIO: DR. ADRIÁN OCHOA LEYVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”. DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA NUTRICIÓN.

TUTORA:

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES, INCMNSZ

COMITÉ TUTOR:

DR. JAVIER TORRES LÓPEZ. CMN SXXI

DR. JOSÉ GUILLERMO AGUILAR OSORIO. FQ, UNAM

SUSTENTANTE: SÁNCHEZ TAPIA MÓNICA TODD CURIE

Agradecimientos

A mi familia

A mi madre Conchita Tapia, por apoyarme siempre, por motivarme, porque me ha dado ejemplo de perseverancia, constancia y respeto, por darme sus enseñanzas y consejos, que me han permitido ser una persona de bien, por el valor que ha tenido para salir adelante y que lo demuestra día con día, pero sobre todo por su cariño incondicional. A mi padre, Guillermo Sánchez, por enseñarme que con esfuerzo y disciplina puedes alcanzar tus metas y que a pesar de todos los obstáculos se puede, porque el único que elige su destino es uno mismo. A mi hermano Guillermo Moshé Dayán, por compartir buenos y malos momentos conmigo, por su alegría, su fortaleza y cariño

A mis maestros

Por brindarme su tiempo y su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en desarrollo de mi formación académica, en especial, a la Dra. Nimbe Torres y Torres y al Dr. Armando Tovar Palacio, por darme la oportunidad de crecer tanto académica y personalmente, por apoyarme siempre y compartirme sus conocimientos y experiencias

A mis compañer@s y amig@s.

Por brindarme su apoyo, compañía y cariño, por compartir los buenos y malos momentos. Por brindarme su cariño y apoyo siempre, en especial a Sandy, Vale, Ari, Kenia Reina, Augusto, Miriam Radyx, Maru, Sayra, Sarai y Zuli por esos grandes momentos que compartimos. A Guillermo Ordaz por ayudarme con gran disposición y actitud y su amistad. A Miriam Aguilar López por compartirme sus conocimientos que fueron esenciales para el análisis de resultados y por su amistad. A Tauqueer y Karina por compartir buenos momentos y darme un panorama más amplio. A las chicas del basketball Silvia, Alicia, Ade, Ara, Dany, Mire y Zule por esos grandes y divertidos momentos, por esos juegos que me llenaban de alegría y me daban más fuerza. Y por supuesto a mi novio Jonathan Martin Benítez Ramírez por estar siempre conmigo, apoyándome, aconsejándome y por compartir hermosos momentos.

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP)

Por su apoyo para asistir a Boston a presentar el presente trabajo de investigación presente en el Experimental Biology 2015

A la Red de Apoyo a la Investigación (RAI)

Por permitirme realizar técnicas de última generación como lo es la secuenciación masiva. En especial a en especial, a Antonio Josué Olvera Martínez y Alejandra Contreras por transmitirme sus conocimientos, por su paciencia y apoyo.

A mis padres

*Por ser el pilar fundamental
de todo lo que soy, de toda mi
educación, tanto académica, como
de la vida, por su apoyo y amor
incondicional*

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	4
A. Alimentos funcionales.....	4
B. El nopal.....	7
C. Microbiota.....	12
D. Funciones de la microbiota intestinal.....	17
E. Polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP).....	19
OBJETIVOS	22
Principal.....	22
Específicos.....	22
HIPÓTESIS	23
JUSTIFICACIÓN	23
METODOLOGÍA	24
A. Animales de experimentación.....	24
B. Modificación de la dieta.....	25
C. Determinación de la curva de crecimiento e ingesta de los animales de experimentación.....	25
D. Cuantificación de parámetros bioquímicos.....	26
E. Medición de la curva de tolerancia a la glucosa (CTGO) de los animales de experimentación.....	26
F. Determinación del gasto calórico y coeficiente respiratorio.....	27
G. Evaluación de factores de transcripción y genes involucrados en el metabolismo de lípidos: SREBP-1, ACC, PPAR- α y CPT-1.....	28
H. Evaluación de genes involucrados en el estrés de retículo endoplásmico.....	29
I. Estudio de factores involucrados en el metabolismo de lípidos e inflamación en tejido adiposo.....	29

J.	Análisis histológico e inmunohistoquímico del hígado y tejido adiposo.....	30
K.	Caracterización de las poblaciones microbianas en el intestino de ratas que consumieron diferentes tipos de dietas	32
RESULTADOS		36
I.	Curva de crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar en un modelo de obesidad inducida por dieta (OID).....	36
II.	Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)	38
III.	Parámetros bioquímicos en suero en los diferentes grupos experimentales.....	40
IV.	Evaluación del gasto calórico y coeficiente respiratorio.....	44
V.	Estudio de factores involucrados en el metabolismo de lípidos	48
VI.	Evaluación de factores involucrados en el estrés del retículo endoplásmico.....	51
VII.	Evaluación factores involucrados en diferenciación celular, inflamación, estrés oxidante y hormonas en tejido adiposo	52
VIII.	Estudio histológico del impacto del consumo de nopal en la obesidad	53
IX.	Caracterización de la microbiota intestinal	58
A.	Extracción de DNA a partir de muestras fecales.....	58
B.	Determinación de la composición de la microbiota intestinal, antes y después del consumo de nopal en un modelo de OID por qPCR.....	58
C.	Secuenciamiento por síntesis de la microbiota intestinal utilizando la plataforma MiSeq de Illumina	62
DISCUSIÓN.....		67
CONCLUSIONES.....		79
BIBLIOGRAFÍA.....		81
ANEXO I: ABREVIATURAS		95

RESUMEN

Actualmente los consumidores tienen un mayor interés en comer saludable, cambiando de un consumo de alimentos altamente procesados a buscar un consumo de alimentos naturales, orgánicos que puedan proporcionar beneficios a la salud. Existen alimentos denominados funcionales los cuales además de su valor nutricional contienen compuestos bioactivos en pequeñas cantidades que tienen una función benéfica sobre la salud. Recientemente se ha caracterizado al nopal como un alimento funcional debido a la presencia de polifenoles, vitamina C y β -carotenos que le dan actividad antioxidante al nopal, sin embargo, debido a que su consumo es casi exclusivo de México no existen estudios respecto a sus mecanismos de acción. Por lo que es importante utilizar a la nutrigenómica, para explicar como un alimento puede regular la expresión de genes. De esta manera se pueden explicar el modo de acción del nopal lo cual nos proporcionaría una idea del beneficio de este alimento así como de su posible papel como prebiótico. Se ha descrito que los microbios residentes en el intestino, conocidos en conjunto como microbiota intestinal, han sido identificados como uno de los factores ambientales involucrados en el desarrollo de ciertas enfermedades. Una mayor aproximación a esta población microbiana podría contribuir a conocer el uso potencial del nopal como prebiótico. Estudios previos en el Departamento de Fisiología de la Nutrición han indicado que el consumo de nopal a largo plazo en un modelo de obesidad en ratas genéticamente modificada con una mutación en el receptor de leptina disminuye significativamente el estrés oxidativo y la esteatosis hepática. También estudios en pacientes con diabetes tipo 2 han demostrado que el consumo de nopal disminuye significativamente la secreción del péptido insulotrópico dependiente de glucosa (GIP, glucose insulinotropic peptide). Por lo que es de interés estudiar si el consumo de nopal en un modelo de obesidad inducido por dieta (grasa saturada y azúcar) regula la expresión de genes involucrados en la lipogénesis, la oxidación de ácidos grasos, la microbiota y la secreción del péptido GIP, siendo el objetivo del presente trabajo determinar el efecto del consumo de nopal sobre la composición de la microbiota intestinal. Para ello se desarrolló un modelo de obesidad inducida por dieta (OID) en ratas Wistar macho y posteriormente se les dieron diferentes dietas con o sin nopal, posteriormente se analizaron los tejidos hepático y adiposo, así como diversos parámetros séricos (insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, GIP y LPS) y fisiológicos (RER y VO_2), además de realizar por qPCR y secuenciación masiva el análisis de la composición de la microbiota intestinal. Finalmente se concluyó que el consumo de nopal tuvo efectos benéficos tanto en la disminución de anomalías bioquímicas durante la obesidad así como en la composición de la microbiota intestinal, por lo que, podríamos considerar a este alimento además de funcional como prebiótico.

INTRODUCCIÓN

El poder valorar la importancia de la relación entre la alimentación y la salud es una de las aportaciones más importantes del siglo XX al contexto histórico de la nutrición. (Morales Calatayud, 1999). Aunque desde el inicio de los tiempos la humanidad ha sido consciente de que necesitaba comer bien para vivir, y de que algunos alimentos en determinadas circunstancias podrían representar un riesgo a la salud, no fue hasta finales del siglo XX cuando se concientizó hasta qué punto una buena o mala alimentación puede contribuir positiva o negativamente a la salud (Lowenberg, 1970). Durante la primera mitad del siglo XX, los estudios nutricionales determinaron cuales eran los nutrientes esenciales y las cantidades que de cada uno de ellos era necesaria para cubrir las necesidades nutricionales y gracias a estos estudios, hoy en día existen tablas de referencia sobre ingestas recomendadas de nutrientes. Pero en el último tercio del siglo XX cambiaron las circunstancias alimentarias de las sociedades desarrolladas, de manera que durante esos años se observó que el consumo excesivo de ciertos nutrientes tenía un impacto negativo en la salud, surgiendo las recomendaciones de evitar el exceso del consumo de grasas, sal y azúcar (García Closas, 1995).

Actualmente la investigación nutricional tiene uno de sus principales ejes en el estudio de las conexiones entre ciertos componentes de la dieta y el posible efecto protector o preventivo frente a enfermedades crónico-degenerativas. Con ello, el interés del consumidor en comer saludable está cambiando hacia los potenciales beneficios de la salud de alimentos específicos e ingredientes de alimentos (Martínez Jiménez, 1998). Además, la evidencia científica soporta la idea de que algunos de estos alimentos puedan tener efectos positivos sobre la salud y el bienestar más allá de proveer los requerimientos básicos nutricionales (Ashwell, 2002). Los alimentos funcionales son aquellos que en forma natural o procesada además de sus componentes nutritivos contienen compuestos bioactivos, los cuales se encuentran en pequeñas cantidades y tienen una función benéfica dentro del organismo (Alvidrez MA, 2002).

Las nuevas tecnologías de la nutrigenómica, la cual es una rama de la genómica nutricional que pretende proporcionar un conocimiento molecular sobre los componentes de la dieta que contribuyen a la salud mediante la alteración de la expresión y/o estructuras según la constitución genética individual, tienen el enorme potencial de poder ayudar a conocer los mecanismos de acción de los nutrimentos a nivel molecular (Mutch, 2005). Con esto se podrá hacer recomendaciones más apropiadas sobre el consumo de un alimento y su efecto en la salud. En México, la nutrigenómica tiene un potencial aun mayor, ya que los alimentos se consumen por tradición o por costumbre, pero no se sabe si estos alimentos tienen un efecto en la salud, por lo que es de gran importancia estudiar los mecanismos de acción de los alimentos mexicanos. Estudios previos en el Departamento de Fisiología de la Nutrición han demostrado que el nopal es un alimento que actualmente se considera como un alimento funcional, ya que aparte de sus propiedades nutricionales, contiene fibra soluble e insoluble, vitamina C, β -carotenoides, flavonoides, fitoesteroles, clorofilas y polifenoles que le confieren al nopal actividad antioxidante, antihiper glucemiante y es capaz de regular el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Este alimento, debido a su alto contenido en agua aporta solamente 27 kcal/100 g de producto (Lopez-Romero, 2014).

En estudios recientes en un modelo de hiperinsulinemia e hiperleptinemia se ha demostrado que el consumo de nopal a largo plazo disminuye significativamente la esteatosis hepática, la formación de especies reactivas y la formación de malondialdehído (Moran-Ramos, 2012). Debido a que el nopal se consume casi exclusivamente en México no existe información sobre sus posibles mecanismos de acción. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el nopal tiene un índice glucémico bajo (I.G = 37), tiene actividad antihiper glucemiante y es capaz de disminuir la concentración del péptido gastrointestinal GIP (Lopez-Romero, 2014). Este péptido está involucrado en la estimulación de la secreción de insulina. A mayor estimulación de GIP por el páncreas mayor secreción de insulina y mayor estimulación de los receptores de GIP en el tejido adiposo que se asocia con una mayor lipogénesis y obesidad (Yip, 2000).

Por lo que el objetivo del presente trabajo es poder estudiar el efecto del consumo de nopal a largo plazo en un modelo de obesidad inducido por grasa saturada y azúcar en el agua sobre la expresión de genes involucrados en la lipogénesis, oxidación de ácidos grasos e inflamación, sobre los cambios en las principales filas de la microbiota fecal para poder considerar al nopal como un alimento prebiótico y por último estudiar el efecto del nopal sobre las concentraciones del péptido gastrointestinal GIP.

MARCO TEÓRICO

A. Alimentos funcionales

El concepto de alimentos funcionales se inició en Japón en la década de 1980 (Ashwell, 2002). En 1991, la Unión Europea, en un esfuerzo por reducir el creciente costo de la atención de la salud, se creó una categoría de alimentos con beneficios potenciales (Foods for Specified Health Use -FOSHU) (Grossklaus, 2009) Finalmente este concepto llegó a los EUA a finales de la década de los 90 (Arvanitoyannis y Van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2005). No existe una definición universal para los alimentos funcionales, sin embargo, una definición consenso es que son aquellos que en forma natural o procesada además de sus componentes nutritivos contienen compuestos bioactivos, los cuales se encuentran en pequeñas cantidades y tienen una función benéfica dentro del organismo y que además son consumidos como parte del patrón normal de alimentación (Colombo, 2010). Algunos aspectos de salud relacionados con estos alimentos funcionales son:

- Mejor desarrollo y crecimiento;
- Mantenimiento de la salud (por ejemplo, la función inmune, salud digestiva, salud mental, salud en el envejecimiento, el rendimiento físico);

- Reducción del riesgo de tener obesidad;
- Reducción de riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta (por ejemplo, la enfermedad cardiovascular, la diabetes tipo 2 y síndrome metabólico, enfermedades musculoesqueléticas). (Cappuccio y Pravst, 2011).

Respecto a la salud en el tracto gastrointestinal, que es primordial debido a que actúa como una interface entre la dieta y todas las demás funciones metabólicas, una adecuada función del tracto depende de un equilibrio en las bacterias benéficas para prevenir la invasión de bacterias patógenas y la generación de metabolitos no deseados (Hasler, 1998). Una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de alimentos funcionales radica en el uso de ingredientes para modificar la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal (probióticos, prebióticos y simbióticos) (Petschow *et al.*, 2013; Saier y Mansour, 2005).

Un probiótico contiene microorganismos vivos que al ser administrados en concentraciones adecuadas, confieren un beneficio al hospedero (Vitteta *et al.*, 2015), los beneficios potenciales para la salud que pueden tener los probióticos incluyen:

- Reducción de la incidencia o gravedad de las infecciones gastrointestinales;
- Reducción de la intolerancia a la lactosa;
- Mejora global de la función intestinal, incluyendo la reducción en el estreñimiento y la diarrea (Divyashri *et al.*, 2015).

Por otro lado los prebióticos, son ingredientes fermentados selectivamente que permiten cambios específicos, tanto en la composición y / o actividad en la microflora gastrointestinal, lo que confiere beneficios a la salud y bienestar del consumidor (Slavin, 2013; Hutkins *et al.*, 2015). Por ejemplo la inulina transgalactooligosacáridos son considerados prebióticos (Roberfroid, 2010). Sin embargo no todos los carbohidratos de la dieta son prebióticos y es necesario establecer criterios claros para establecer un ingrediente alimentario como prebiótico. Estos criterios son:

- Resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas de mamíferos, y a la absorción gastrointestinal.
- Fermentación mediada por la microbiota intestinal.
- Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales que contribuyen a la salud y el bienestar (Roberfroid, 2007).

Un alimento funcional considerado prebiótico puede presentar las siguientes propiedades:

- Mantenimiento de la microbiota intestinal y la estimulación del tránsito intestinal.
- Cambio en la microbiota del colon, lo que contribuye a la consistencia normal de las heces, prevención de la diarrea y el estreñimiento.
- Eliminación de las sustancias en exceso tal como la glucosa y el colesterol, lo que favorece únicamente la absorción de las sustancias necesarias.
- Estimulación del crecimiento de bacterias consideradas beneficiosas, por ejemplo, *Bifidobacterias*.
- Estimulación de la absorción y la producción de vitaminas del grupo B (B1, B2, B3, B6, B9, B12).
- Fortalecimiento del sistema inmune.
- Contribución al control de la obesidad.
- Disminución de los riesgos de osteoporosis (Sousa y Garbieri, 2011; Brownawe *et al.*, 2012).

Hoy en día, hay evidencia de que el comer estos alimentos funcionales dan beneficios para la salud, siendo ahora el reto el desarrollo eficaz de sinergias entre la ciencia y la tecnología de alimentos para el desarrollo de productos alimenticios que tengan un beneficio para el consumidor (Arabbi, 2001; Brown *et al.*, 2015).

B. El nopal

El uso del nopal se remonta a la época prehispánica. Se cultiva en varios estados del centro del país como Morelos, Tlaxcala, Distrito Federal y el estado de México. La planta del nopal tiene gran resistencia a la sequía y a las fluctuaciones extremas de temperaturas, así como su notable adaptabilidad a los suelos calcáreos y porosos (Malainine *et al.*, 2003). De hecho todo puede aprovecharse del nopal y sin embargo poca atención realmente se ha prestado a su cultivo y desarrollo a gran escala, su consumo se ha limitado a su distribución y consumo en fresco (Vázquez, 2006). El cultivo comercial se exporta en Italia, España, Brasil, Chile, Argentina y California. Los cladodios, es decir el tallo aplanado, con apariencia de hoja, han servido como forraje, fuentes de frutos, vegetales y de colores naturales y se emplean para cosméticos y medicamentos (Stintzing y Carle, 2005).

Los nopales se agrupan en dos géneros: *Nopalea* constituido por plantas que tienen los estambres más grandes que el perianto y *Opuntia* en el que los estambres son más cortos (Bravo-Hollins, 1978). Son arbustos de unos 5 m de altura, con tallo cilíndrico ramificado de color verde; su tronco está formado por pencas aplanadas. Las flores varían del amarillo al rojo, tienen frutos de color verde, rojo o púrpura, llamadas comúnmente tunas. Crece en climas seco, semiseco y templado. Se cultiva en zonas áridas y semiáridas, se encuentra asociada con matorral xerófilo y bosques de encino y pino. En su fase inmadura se presentan hojas pequeñas cilíndricas y curvas, en las pencas hay espinas y aguates (gloquidias) localizadas en las áreas llamadas areolas. Los aguates o gloquidias son 100% celulosa cristalina y las espinas están constituidas por 96% polisacáridos, de los cuales 49.7% corresponde a celulosa y 50.3% a arabinosa (Malainine *et al.*, 2003). Las espinas miden 1-3 cm de largo y corresponden al 8.4% del peso total del cladodio y tienen como función la protección mecánica contra depredadores, producen sombra y protegen al tallo reflejando los rayos solares, condensan la humedad ambiental y la dirigen hacia

las raíces donde es absorbida y de esta forma reduce la pérdida de agua en la planta. Los frutos son bayas ovoides y carnosas de 3 a 12 cm de longitud de colores verde, amarillo, rojo, anaranjado, púrpura, conocidas comúnmente como tunas o xoconostles (Ben Salem-Fnayou *et al.*, 2014).

Los nopales que consumimos en México, pertenecen al género *Opuntia* de la familia de las Cactáceas. Son plantas suculentas y perennes, con tallos espinosos aplanados o cilíndricos. Existen más de 107 especies en México. El origen de su cultivo no se conoce bien, pero se sabe que fueron semicultivadas, desde épocas remotas, seleccionando las mejores variedades. En la tabla 1, se presenta la clasificación taxonómica de este alimento (Bravo-Hollins, 1978).

TABLA1. Clasificación taxonómica del nopal	
Reino	Vegetal
Subreino	Embryophyta
División	Angioserma
Clase	Dicotiledoneae
Subclase	Dialipetalas
Orden	Opuntiales
Familia	Cactaceae
Tribu	Opuntiae
Subfamilia	Opuntioideae
Género	Opuntia
Subgénero	Platyopuntia
Especie	varios nombres

Fuente: BravoHollis, 1978.

El género *Opuntia* está formado por dos subgéneros, uno representado por las *Opuntias* de forma cilíndrica, mejor conocidas como cactus y clasificados como *Opuntia cylindropuntia* y el otro subgénero de forma aplanada a la cual pertenecen los verdaderos nopales cuyos frutos se conocen como “tuna” si tiene sabor dulce “xoconostle” si tiene un sabor ácido y se les clasifica como *Opuntia platyopuntia* (Bravo-Hollins, 1978).

La composición de los cladodios varía por factores como el lugar de cultivo, la estación y la edad de la planta. Los cladodios jóvenes presentan altos contenidos de carbohidratos, proteína y agua. Dentro de la composición química del nopal existe un alto contenido de agua, del orden de 90- 92.5%. Entre los minerales que contiene, por cada 100g de nopal b.s, los principales son el calcio (18-57 mg) y el potasio (50 mg) además de magnesio (11-17mg) y pequeñas cantidades de hierro y aluminio, entre otros. El nopal contiene también, en varias proporciones diferentes carbohidratos y compuestos nitrogenados. (Stintzing y Carle, 2005). El contenido de flavonoides en el nopal, varían de acuerdo a la variedad, tipo de tejido y estado de madurez. Los fenoles totales (97.6 - 109.76 mg / 100g b.s.) están constituidos por los flavonoides, flavonoles, ácidos fenólicos y otros ácidos orgánicos. Se ha encontrado que estas cactáceas producen flavonol 3-oglicosidos (quercetina, kaempferol e Isorhamnetina), mirecitina, vitexina y orientina. Entre otros compuestos se encuentran diversos ácidos orgánicos de los cuales se tienen reportes de que el ácido malónico y el ácido cítrico se encuentra en concentraciones de 36 mg y 178 mg / 100g de peso fresco respectivamente. En contraste los cladodios viejos de *Opuntia ficus* indica no contienen ácido malónico y presentan una disminución de ácido cítrico a 31mg/ 100 g peso fresco. Existen otros ácidos tales como el ácido fórbico, piscidico y eucomico se han detectado cualitativamente pero no han sido cuantificados (Stintzing y Carle, 2005). En cuanto a la fibra dietética se ha reportado que se encuentran 18 g / 100 g b.s. en el nopal fresco (Stintzing y Carle, 2005).pero en estudios más recientes se determinó en nopal deshidratado a 60°C, donde se encontró que la fibra dietética total (FD) corresponde a 45.99 g / 100 g b.s., de los cuales 5.01 g /

100 g b.s. corresponden a fibra dietética soluble (FS) y 40.98g/100g b.s. a fibra dietética insoluble (FI), guardando una proporción FI/FS de 6-8, la cual se ha comprobado que en el intervalo de 1.0-2.3 brinda un efecto fisiológico asociado con ambas fracciones de fibra (Malainine, 2003; Cadena Santos, 2006). Dentro de los compuestos encontrados en menor cantidad se tienen los carotenos (22.9 mg/100g b.s.), de los cuales el 36% corresponden a β -caroteno, 46% luteína y 18% α -criptoxantina. El ácido ascórbico (vitamina C) se encontró en una concentración 268.3mg/100g b.s; los esteroides (0.8-3.2g/100g b.s.) de los cuales el 86.7% corresponden a β -sitosterol y por último la clorofila total (152.44mg/100g b.s.), de la cual 115.85mg corresponden a clorofila a y 36.58mg corresponden a clorofila b (Stintzing y Carle, 2005). En la tabla 2 se resume la composición química del nopal en 100g del mismo en base seca.

TABLA 2. Composición química del nopal en base seca	
Compuesto	En 100 g de nopal b.s.
Calcio	18-57 mg
Potasio	50 mg
Magnesio	11-17 mg
Hierro, Aluminio y otros	Pequeñas cantidades
Fenoles	97.6-109.76 mg
Ácido malónico	36 mg
Ácido cítrico	178 mg
Fibra Soluble	40.98 g
Fibra Insoluble	6-8 g
β-caroteno	8.24 mg
Luteína	10.53 mg
α-criptoxantina	4.12 mg
Vitamina C	268.3 mg
Esteroides	0.8-3.2 g
Clorofila a	115.85 mg
Clorofila b	36.58 mg

El nopal se vende principalmente en fresco en diferentes presentaciones; sin desespinar, desespinado entero y en cuadritos. En segundo término y en menor proporción el nopal se comercializa enlatado en escabeche y en salmuera, seguido de otro grupo de productores que lo deshidratan para obtener polvo para formar tabletas o capsulas, o en su defecto harina de nopal para diferentes usos (Vázquez, 2006). En México existen varios informes sobre el uso de las pencas de nopal para mitigar el dolor y curar inflamaciones, por ejemplo, gastritis, úlceras pépticas, fatiga y disnea, glaucoma, congestión e hipertrofia hepática alcohólica. Los cladodios desprovistos de sus espinas se parten a la mitad, se calientan y se utilizan para el tratamiento tópico de los dolores reumáticos, heridas recientes, las quemaduras, zonas inflamadas y las úlceras de piel crónicas (Peña, 2006; Mazza, 2000). Los nopales en polvo particularmente en cápsulas son usados para regular el peso corporal, la glucosa en sangre, colesterol, triglicéridos y como fuente de fibra. También se ha demostrado que al consumir nopales los niveles de glucosa e insulina se normalizan rápidamente y después de 10 días de su consumo antes de la cena hay una disminución significativa en los niveles de glucosa sérica. El jugo obtenido de los nopales puede ser usado en shampoo, acondicionadores, lociones, jabones y protectores solares. Finalmente en periodos de sequía especialmente, el nopal silvestre sirve como suplemento forrajero para vacas, ovejas, chivos y entre otros, debido a que cubren una cantidad considerable del agua que requieren los animales así como de minerales y la proteína recomendada (Stintzing y Carle, 2005).

C. Microbiota

El tubo digestivo alberga un ecosistema bacteriano complejo cercano a los 100 billones (10^{14}) de microorganismos que forman la microbiota intestinal. Esta microbiota intestinal ha evolucionado junto con el ser humano, adaptándose y conviviendo con él en una estrecha relación simbiótica (Turnbaugh *et al.*, 2008). La microbiota ejerce funciones nutricionales, metabólicas y protectoras que la vuelven indispensable para el huésped mientras que este le entrega nutrientes y condiciones adecuadas para su crecimiento (Gordon *et al.*, 2012; Ussar *et al.*, 2015). La presencia de la microbiota intestinal, de hecho, impacta en la expresión de genes en la mucosa intestinal del huésped: por ejemplo la colonización de ratones axénicos (sin microbiota) por *Bacteroides thetaiotaomicron* (un microorganismo común en la microbiota intestinal) induce la expresión de genes implicados tanto en la defensa del organismo y la regulación de la función intestinal de barrera como en la vascularización del epitelio y la digestión/absorción de nutrientes, principalmente *susA-susG* (Hooper *et al.*, 2001; Backhed *et al.*, 2007).

La microbiota no se distribuye en forma homogénea en el tracto digestivo; más de 99,9% se encuentra en el colon, con concentraciones que alcanzan los 10^9 a 10^{11} CFU / g y con un fuerte predominio de anaerobios estrictos. El ciego y el colon ascendente son sede de procesos intensos de fermentación y sus poblaciones bacterianas están en continuo crecimiento, produciendo concentraciones altas de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, short chain fatty acids) que llevan a un pH bajo (5,4 - 5,9), mientras que en el colon descendente estos procesos son menos intensos por lo cual la concentración de SCFA en su lumen es menor y el pH más alto (6,6 - 6,9) (Cummings *et al.*, 1987). En la microbiota intestinal existe un equilibrio entre las poblaciones bacterianas dominantes y aquellas subdominantes, presentes en menor cantidad. Cuando este equilibrio es adecuado, la microbiota actúa como una barrera que impide la multiplicación de patógenos y por ende el desarrollo de patologías gastrointestinales (Dalby *et al.*, 2006).

La complejidad del ecosistema microbiano intestinal ha sido estudiada y revisada extensamente durante estos últimos años. Se dispone de datos sólidos a favor de que en el tubo digestivo humano están representados cuatro Phylum bacterianos dominantes: *Firmicutes* (grampositivos), *Bacteroidetes* (gramnegativos), *Actinobacterias* (grampositivas) y *Proteobacterias* (gramnegativas) (Gerard, 2015). Los hongos y *Archaea* pueden ser también residentes, pero comprenden menos del 1% de la población total, lo que ilustra que el ecosistema intestinal está dominado claramente por las bacterias, en particular las correspondientes a los tipos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, las cuales serán distribuidas de diferente manera de acuerdo al estado de salud del individuo, siendo aproximadamente 1024 especies las que existen en el intestino humano (Everard y Cani, 2013)

La principal manifestación del mutualismo entre la microbiota intestinal y su huésped es que la primera es capaz de extraer energía provenientes del almidón resistente y de los poli- y oligosacáridos que forman la mayoría de la fibra dietética soluble, haciéndola disponible para el huésped y evitando de esta forma su pérdida en las deposiciones. *Bacillus thetaiotaomicron*, por ejemplo, puede expresar 175 hidrolasas distintas, lo que le otorga plasticidad para adaptarse tanto a los diversos polisacáridos de la dieta como a los endógenos presentes en el glicocalix del ribete estriado y en las mucinas (Sonnenburg *et al.*, 2006). La fermentación de estos sustratos libera agua, gases (CO₂, H₂, CH₄) y ácidos grasos de cadena corta (SCFA), principalmente acetato, propionato y butirato en una proporción aproximada de 60%, 20%, 20%, dependiendo de la naturaleza de la fibra; estos SCFA son absorbidos y oxidados, permitiendo una mayor obtención de energía (Wong *et al.*, 2006). La importancia de este fenómeno es ilustrada por los ratones axénicos que, al carecer de microbiota intestinal, deben consumir 20 a 30% más de alimento que los animales convencionales (con microbiota) para lograr crecimientos comparables (Hooper *et al.*, 2001; Backhed *et al.*, 2004)

En el ser humano se estima que alrededor de 7 a 10% de las calorías absorbidas provienen diariamente de este proceso de extracción de energía por medio de la microbiota intestinal. Mientras que el butirato es metabolizado principalmente por los colonocitos, el acetato y el propionato son absorbidos, alcanzando concentraciones de 300 a 450 μM en la sangre portal y de 50 y 100 μM en la sangre periférica (Cummings *et al.*, 1987). Una vez captado por el hígado, el acetato sirve de sustrato preferencial para la gluconeogénesis y la síntesis de colesterol y de triglicéridos, mientras que el propionato inhibe la expresión génica de las enzimas hepáticas involucradas en esta lipogénesis de novo (Wong *et al.*, 2006). El reconocimiento del rescate colónico como una fuente regular y significativa de calorías para el organismo hace que en la actualidad las instancias responsables (Codex) están discutiendo la posibilidad de atribuir un cierto valor energético (2 Kcal/g) a la fibra soluble presente en alimento (Jumpertz *et al.*, 2011)

La obesidad puede definirse como un "balance de energía positivo", dando a entender que el consumo calórico total es mayor que el gasto total de energía durante un período relativamente largo de tiempo. Además, la dieta "obesogénica" suele ser rica en grasas y pobre en fibras dietéticas y de carbohidratos con un índice glucémico bajo (Druart *et al.*, 2014a). El incremento de la prevalencia de obesidad durante las últimas décadas es alarmante y no puede ser atribuido únicamente a factores genéticos. La investigación está señalando actualmente a la microbiota intestinal como factor ambiental que afecta a la obesidad, ya que la microbiota intestinal contribuye al metabolismo energético y al desarrollo de obesidad en el hospedero (Gerard, 2015). Las investigaciones revelan que cambios inadecuados de composición y / o actividad de la microbiota intestinal, están relacionados con diversas enfermedades del hospedero (Wu *et al.*, 2010). Esta disbiosis caracteriza a las personas con sobrepeso u obesas o con diabetes (Ley *et al.*, 2006), inicialmente por un cambio en la relación Bacteroides/Firmicutes (Turnbaugh *et al.*, 2006). Estas modificaciones cuantitativas de los *Phylum* microbianos podrían estar asociadas con las modificaciones de la expresión génica microbiana y por lo tanto con la

modulación de las funciones metabólicas de la microbiota intestinal, generando obesidad y algunas enfermedades metabólicas relacionadas (Turnbaugh *et al.*, 2009a)

El papel de la microbiota en el desarrollo de obesidad se comenzó a observar mediante su análisis en ratones obesos *ob/ob* (causada por una mutación del gen de la leptina) los cuales revelaron que las concentraciones colónicas de Firmicutes aumentan más de 50% mientras que las de Bacteroidetes disminuyen correlativamente, comparado con los ratones de peso normal (Ley *et al.*, 2005). A pesar de que las concentraciones de SCFA en el ciego de los ratones obesos son mayores que en los normopeso, la cantidad de energía excretada en sus heces es menor, indicando que el proceso de extracción y absorción de energía a partir de los alimentos es más eficiente en el animal obeso (Turnbaugh *et al.*, 2006). Esto se explica por el hecho que el número de genes dedicados a la hidrólisis de polisacáridos es mucho mayor en la comunidad bacteriana de los animales obesos que en la de los normopeso. Cabe destacar que los ratones axénicos normopesos que fueron inoculados con la microbiota intestinal de ratones obesos almacenan más grasa corporal y ganan más peso que aquellos animales inoculados con la flora de ratones normopeso (Turnbaugh *et al.*, 2008). Esto nos indica que la mayor capacidad de extracción de energía y de almacenamiento de grasa es una característica transmisible en la cual participa la microbiota (Barlow *et al.*, 2015; Jumpertz *et al.*, 2011)

Estudios realizados en los últimos años indican que la microbiota es un actor importante en la regulación del metabolismo energético del organismo. Además de su papel en el rescate colónico de energía, participa en el almacenamiento de grasa en los adipocitos (Bakker *et al.*, 2015). La microbiota intestinal de los obesos está alterada, comparada con aquella de los de peso normal, lo que podría explicar su mayor eficiencia en la extracción de energía a partir de los alimentos (Turnbaugh *et al.*, 2008). El contenido en grasa de la dieta también es un factor que puede alterar la composición de la microbiota intestinal, a través del aumento de las concentraciones plasmáticas de LPS y el consiguiente desarrollo

de un estado pro-inflamatorio que facilita la aparición de resistencia insulínica, resultando en una endotoxemia metabólica (Cani *et al.*, 2007). La mejor comprensión de la composición y funcionamiento de la microbiota intestinal ha permitido el desarrollo de los conceptos de prebióticos y probióticos. Los primeros son principalmente hidratos de carbono no-digestibles (fibras dietéticas solubles) cuya fermentación en el colon estimula el crecimiento de microorganismos (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) beneficiosos para la salud del huésped mientras que los segundos son microorganismos inocuos que pueden sobrevivir su pasaje por el tracto gastrointestinal, donde ejercen actividades saludables (Brunser y Gotteland, 2010; Cani *et al.*, 2008). Tanto los prebióticos como los probióticos pueden ser considerados como herramientas útiles para mantener el equilibrio armonioso de la microbiota intestinal a través del manejo de la dieta del individuo (Gibson y Roberfroid, 1995; Petschow *et al.*, 2013). Se ha descrito que el consumo de prebióticos o de probióticos podría ayudar a mantener la homeostasis de la microbiota, previniendo las alteraciones anteriormente descritas y estimulando mecanismos implicados en la sensación de saciedad, por lo que es interesante conocer el efecto del consumo de un alimento funcional como lo es el nopal sobre la composición de la microbiota intestinal en un modelo de obesidad inducido por el consumo de una dieta alta en grasa (Delzenne y Cani, 2011; Everard *et al.*, 2011)

Teniendo en cuenta que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo con respecto a la aparición de diabetes de tipo 2, varios grupos han especulado con la idea de que la microbiota intestinal podría ejercer un impacto sobre la diabetes más allá de la manipulación del peso (Cani y Delzenne, 2009). Además, es importante considerar que la resistencia a la insulina es una patología concomitante con la obesidad y se correlaciona con inflamación crónica de baja intensidad (Delzenne y Cani, 2011a). Basándose en datos experimentales sobre el impacto que ejerce la microbiota intestinal sobre la obesidad, algunos autores han propuesto que la microbiota intestinal pudiera contribuir al inicio de la resistencia a la insulina y al estado inflamatorio del hospedero (Delzenne *et al.*, 2011).

D. Funciones de la microbiota intestinal

Se conoce como microbiota normal a todas aquellas especies de microorganismos que se encuentran en el intestino de individuos sanos y que poseen una o varias funciones que pueden ser beneficiosas o perjudiciales para la salud del huésped (Bengmark, 2000). Estas funciones se dividen en metabólicas, tróficas y de protección

1. Funciones metabólicas. El metabolismo microbiano es responsable de la conversión de muchas sustancias energéticas en nutrientes que pueden ser absorbidos y utilizados por el huésped (Hooper *et al.*, 2002). La microbiota del intestino grueso juega un papel importante en los procesos digestivos del huésped, generando energía de los residuos alimentarios no absorbidos, de las células de descamación intestinal y de las secreciones a través de la fermentación de los hidratos de carbono y proteínas, así como de la absorción de los ácidos grasos de cadena corta y otros productos metabólicos (Inoue y Ushida, 2003), que son utilizados por el huésped para suplir parte de su requerimiento de energía y por la microbiota para mantener su crecimiento y proliferación (Guarner y Malagelada, 2003). Esta función es tan importante que los roedores libres de gérmenes, para mantener su peso, necesitan ingerir 30% más de energía que los animales con microbiota, lo que prueba que las bacterias intestinales ayudan al huésped a extraer el máximo valor energético de los alimentos (Hooper *et al.*, 2002; Inoue y Ushida, 2003). Se calcula que el epitelio colónico obtiene entre el 60 y el 70% de las necesidades energéticas, a través de la microbiota intestinal (Hooper *et al.*, 2002).

La microbiota también contribuye a la homeostasis de los aminoácidos en el huésped. En aquellos animales no rumiantes ni coprófagos la proteína microbiana no se utiliza en gran medida por el huésped sin embargo, una pequeña cantidad de los requerimientos de ciertos aminoácidos es proporcionado por la síntesis bacteriana. Este hecho fue observado al marcar aminoácidos con N₁₅ y encontrar que entre el 1 y 20% de la lisina y la treonina

circulantes de estos animales derivó de las bacterias intestinales (Holzapfel *et al.*, 1998; Metges, 2001). También se ha descrito que algunas bifidobacterias marcadas con N₁₅ y administradas por vía bucal, al ser destruidas en el lumen, aproximadamente el 90% de las proteínas liberadas son absorbidas por el intestino y el 70% se retienen en el organismo (Metges, 2001). Los productos de la fermentación bacteriana han sido implicados en la motilidad, la circulación y la estimulación del flujo intestinal y viceral que modulan la maquinaria metabólica intrínseca de las células del huésped, resultando en una absorción más eficiente del agua, calcio, magnesio y hierro (Guarner y Malagelada, 2003; Hooper *et al.*, 2002; Holzapfel *et al.*, 1998). Además de su capacidad para metabolizar numerosos polisacáridos de plantas, también degradan una gran variedad de glicoconjugados derivados del huésped (condroitín sulfato, mucina, hialuronato y heparina) (Hooper *et al.*, 2002). Finalmente, los microorganismos colónicos también producen vitaminas (Younes *et al.*, 2001) por lo que los ratones libres de gérmenes necesitan suplementos de vitaminas K, B y folato, que son producidas por los *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Fusobacterium* (Holzapfel *et al.*, 1998; Gorbach, 2000).

2. Funciones tróficas. Posiblemente el papel más importante de la microbiota intestinal sobre la fisiología colónica es su efecto trófico en el epitelio intestinal (Guarner y Malagelada, 2003). La diferenciación de las células epiteliales está afectada en gran medida por la interacción con los microorganismos residentes (Hooper *et al.*, 2002) y sus productos metabólicos, principalmente por los ácidos grasos de cadena corta (butirato, acetato y propionato) que estimulan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales en el intestino humano (Bezirtzoglou, 1997). Además, el acetato es utilizado por los músculos esquelético y cardíaco para obtener energía y por los adipocitos para la lipogénesis (Hooper *et al.*, 2002).

3. Funciones protectoras. Es conocido que la microbiota intestinal propia representa una barrera formidable para el establecimiento de poblaciones patógenas en el huésped. Este fenómeno es conocido como “interferencia bacteriana”, e incluye la producción de bacteriolisinas, productos metabólicos y otras condiciones inhibitorias como disminución del pH y depleción de los nutrientes requeridos para la multiplicación de los patógenos. A todos estos mecanismos se les conoce como efecto mucoso de barrera (Falk *et al.*, 1998)

E. Polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)

El siglo pasado, algunos fisiólogos sugirieron la existencia de una sustancia humoral presente en el intestino que se liberaba en respuesta a la administración de glucosa la cual era capaz de estimular la liberación de insulina, estudios subsecuentes revelaron que al administrarse una carga de glucosa oral y una intravenosa, ambas producían una misma elevación de glucosa en plasma, sin embargo la respuesta secretora de insulina era mayor con la carga de glucosa oral, fenómeno al que se le denominó efecto incretínico (Elrick *et al.*, 1964; Perley y Kipnis, 1967). El conocimiento de este efecto estableció la estrecha relación entre el tracto gastrointestinal y el páncreas endocrino, incorporándose así el concepto del eje enteroinsular (Unger RH, 1969) y dio inicio a la búsqueda de las hormonas gastrointestinales responsables de dicho efecto incretínico. Diversos estudios concluyeron que el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido semejante al glucagon tipo 1 (GLP-1) eran los principales responsables de la secreción de insulina posterior a la ingesta de nutrientes (Dupre *et al.*, 1973; Schmidt *et al.*, 1985).

El GIP se descubrió en 1973 por su capacidad de inhibir la secreción de ácido en bolsas gástricas denervadas por lo cual se le denominó polipéptido inhibidor gástrico (GIP); poco tiempo después, se identificaron sus propiedades insulínótropas dependientes de glucosa, conociéndosele a partir de entonces como polipéptido insulínótropo dependiente de glucosa (GIP) (Schmidt *et al.*, 1985). El GIP es un péptido de 42 aminoácidos perteneciente a la familia peptídica glucagon-secretina y se origina del Pro-GIP constituido por 153 aminoácidos (Fehmann *et al.*, 1995). Esta incretina es secretada por células enteroendocrinas específicas, las células K, localizadas principalmente en el duodeno pero presentes a lo largo de toda la mucosa del intestino delgado (Mortensen *et al.*, 2000). Su secreción es estimulada por la ingestión de alimentos ricos en carbohidratos y grasas que producen un incremento de 10 a 20 veces en su concentración plasmática (Deacon *et al.*, 2005). Las concentraciones plasmáticas en ayuno son muy bajas, incrementándose rápidamente posterior a la ingesta de nutrientes. Se han observado concentraciones de GIP en plasma hasta de 100 pmol/L (Vilsboll *et al.*, 2003). Además a vida media circulante es muy corta (7-8 min) (Deacon *et al.*, 2000), esto se debe a que el GIP, al igual que GLP-1, es degradado por la enzima dipeptidil-peptidasa tipo IV (DPP-IV), también conocida como CD26, la cual se encuentra en forma soluble en plasma así como unida a las superficies endoteliales (Vilsboll *et al.*, 2001). La DPP-IV corta a las hormonas a nivel del aminoácido alanina situado en posición 2 del extremo amino, convirtiéndolas en fragmentos peptídicos inactivos o inclusive con débil actividad antagónica (Mentlein, 1999).

Los receptores de GIP pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G y son expresados en células de los islotes del páncreas, principalmente en las células, intestino, tejido adiposo, hueso, corazón, hipófisis, corteza adrenal y diversas regiones del cerebro (Mayo *et al.*, 2003). La unión de GIP con sus receptores causa una activación de la adenilato ciclasa a través de la proteína G, produciendo un incremento intracelular del AMP cíclico lo cual activa a la proteína kinasa-A (PKA) y al factor tipo II de intercambio del nucleótido de guanina regulado por AMPc. Ambas proteínas generan una plétora de

eventos intracelulares que involucran el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (K-ATP), despolarización de la célula, elevación del calcio intracelular, inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje y exocitosis de los gránulos de insulina (Holst y Gromada, 2004). Sin embargo, el GIP no estimula a somatostatina ni tiene efecto inhibitorio sobre el glucagon.

Evidencias experimentales indican que esta incretina regula el metabolismo de las grasas en los adipocitos, incluyendo un incremento de la incorporación de los ácidos grasos a triglicéridos inducida por insulina, estimulación de la actividad de la lipasa de lipoproteínas y de la síntesis de ácidos grasos (Yip *et al.*, 2000). En los adipocitos, el GIP incrementa de manera significativa la reesterificación, estimula la lipólisis y atenúa la respuesta lipolítica al isoproterenol. Estas propiedades fueron similares a las presentadas por insulina *in vitro*, sugiriendo que en el adipocito, el GIP posee efectos lipogénicos semejantes a la insulina (Getty-Kaushik *et al.*, 2006)

OBJETIVOS

Principal

Determinar el efecto del nopal sobre el metabolismo y su impacto en la composición de la microbiota intestinal en un modelo animal de obesidad inducido por dieta.

Específicos

- Evaluar el efecto del consumo del nopal en un modelo animal de obesidad inducido por dieta (OID) sobre diferentes descriptores como ganancia de peso, concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e insulina.

- Establecer el comportamiento metabólico de un modelo animal de obesidad inducido por dieta (OID), previa y posteriormente al tratamiento con nopal mediante la evaluación del gasto calórico y el cociente respiratorio así como la curva de tolerancia a la glucosa.

- Estudiar el cambio en los principales *Phyla* de microorganismos que conforman la microbiota intestinal en un modelo de obesidad inducido por dieta antes y después del consumo del nopal.

- Evaluar el metabolismo de lípidos mediante la determinación de la abundancia de mRNA involucrados en la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos como SREBP-1, PPAR- α y CPT-1.

HIPÓTESIS

Debido a la presencia de fibra soluble e insoluble, flavonoides, fitoesteroles, clorofilas, polifenoles y β -carotenos en el nopal, su consumo tendrá un efecto benéfico en la composición de la microbiota intestinal, además de ejercer una mejora en parámetros bioquímicos asociados a obesidad, debido a la mejora del metabolismo de lípidos

JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos funcionales, como lo es el nopal que contiene diferentes tipos de polisacáridos, así como su actividad antioxidante podría jugar un papel importante como prebiótico en la modificación de la microbiota intestinal y en la reducción de especies reactivas de oxígeno debido a su actividad antioxidante en un modelo de obesidad inducido por la dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua.

METODOLOGÍA

A. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar machos del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Dichos animales se mantuvieron en cajas de plástico con cubiertas de acero inoxidable y fondo de aserrín estéril. Para la ingesta de agua se utilizaron botellas de vidrio con tapones de polietileno y tubos bebederos de metal. Los animales se alimentaron *ad libitum* con el tratamiento correspondiente (dieta control o dieta alta en grasa). La dieta control se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la American Institute Nutrition (AIN-93), mientras que a los animales con obesidad se les alimentó con una dieta alta en grasa, a base de manteca de cerdo y sacarosa al 5% en el agua de bebida. En la tabla 3 se presenta la composición de la dieta control (AIN-93) y de la dieta alta en grasa saturada y colesterol (HFD).

TABLA 3. Composición de las dietas		
Dieta	AIN-93	HFD
Ingrediente	%	%
Almidón	39.749	23.903
Caseína	20	24
Maltodextrina	13.2	10.267
Sacarosa	10	7.778
Aceite de soya	7	7
Celulosa	5	5
Mineral mix	3.5	3.5
Vitaminas mix	1	1
L-Cistina	0.3	0.3
Colina	0.25	0.25
TBHQ	0.0013	0.00133
Manteca	-	17

B. Modificación de la dieta

Los animales que consumieron dieta control, continuaron consumiendo esta dieta hasta finalizar el experimento, sin embargo, los animales a los que se les indujo obesidad por un periodo de 7 meses se dividieron en 4 grupos (n=5) y a cada uno de estos grupos se les dio una nueva dieta, por un periodo de un mes, las dietas usadas fueron:

- **Grupo 1:** OID (7 meses) – Control (AIN-93, 1 mes)
- **Grupo 2:** OID (7 meses) – HFD + 5%S (1 mes)
- **Grupo 3:** OID (7 meses) – Control + 5% Nopal (AIN-93+5%N, 1 mes)
- **Grupo 4:** OID (7 meses) - HFD+5%S + 5% Nopal (1 mes)

C. Determinación de la curva de crecimiento e ingesta de los animales de experimentación

Se llevó a cabo el registro del crecimiento de los animales de experimentación para ello se registraron los pesos de los animales dos veces a la semana para obtener un promedio de los datos por tratamiento para realizar una curva de cambio en el peso corporal. Para determinar la ingesta se pesaron cada tercer día los comederos de los animales y se midió el volumen de agua consumido en el caso de los que consumieron sacarosa en el agua de bebida, esto para determinar la ingesta calórica, considerando la composición de la dieta y que cada gramo de carbohidratos o proteína equivale a 4 cal, mientras que un gramo de grasa representan 9 cal.

D. Cuantificación de parámetros bioquímicos

Se tomó una pequeña muestra de sangre (200µL) antes del cambio de dieta (7 meses) mediante vía senoretroorbital y durante la eutanasia, posterior al consumo del nopal durante un mes (8 meses), las muestras se centrifugaron a 5500g durante 10 minutos para la obtención del suero, en el cual se cuantificó glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y HDL por métodos enzimáticos colorimétricos mediante el uso del autoanalizador cobas c111 de Roche®. La insulina se determinó por RIA (Millipore). Finalmente mediante ELISA se determinó GIP (Rayboitech--Cloud-Clone Corp, Houston, TX).

E. Medición de la curva de tolerancia a la glucosa (CTGO) de los animales de experimentación

Se mantuvieron a los animales en periodo de ayuno durante 7 horas, previas a la prueba, se pesaron y se les hizo un pequeño corte en la punta de la cola de cada animal y se tomó una muestra de sangre en la cual se cuantificó el nivel basal de glucosa, con el uso de tiras reactivas para el glucómetro FreeStyle Optium (Abbot Laboratories, AbbotPark, IL, EUA); posteriormente se administró por vía intraperitoneal una solución de glucosa al 35%, previamente preparada y filtrada a una dosis de 2 g/kg y se tomaron muestras y se cuantificó la glucosa sanguínea a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración. Se graficó la CTGO por grupo y se determinó el área bajo la curva por el método de los trapezoide. Finalmente se analizaron los resultados con la prueba de ANOVA seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni. Esta prueba se realizó previo al cambio de dieta (7 meses) y posterior al consumo de nopal (1 mes)

F. Determinación del gasto calórico y coeficiente respiratorio

Se realizó mediante el uso de una calorimetría indirecta, mediante el uso del equipo Oxymax-CLAMS Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA), se colocaron los animales en jaulas individuales cerradas herméticamente y conectadas a un sistema de flujo de aire, después de un periodo de 12 h de aclimatación, se evaluaron en los diferentes grupos experimentales durante los periodos de ayuno y postprandiales, el consumo de O₂ (VO₂, mL/kg/h) y la producción de CO₂ (VCO₂, mL/kg/h), dichos parámetros se midieron durante un lapso de 90s, repitiendo la medición cada 22 min. El coeficiente respiratorio (RER) fue calculado como la relación entre el CO₂ producido respecto al O₂ consumido (VCO₂/VO₂) (Arch et al., 2006)

$$RER = \frac{CO_2_{\text{producido}}}{O_2_{\text{consumido}}} = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}$$

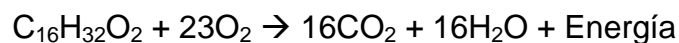
De este modo se determinó que fuente de carbono se estaba oxidando

- Carbohidratos (glucosa)



$$RER = 6CO_2 / 6O_2 = \underline{1.00}$$

- Lípidos (ácido palmítico)



$$RER = 16CO_2 / 23O_2 = \underline{0.70}$$

G. Evaluación de factores de transcripción y genes involucrados en el metabolismo de lípidos: SREBP-1, ACC, PPAR- α y CPT-1

Se cuantificó la expresión relativa del Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 (SREBP-1), el cual es un factor transcripcional involucrado en la lipogénesis, también se evaluó a su gen blanco, la Acetil-CoA Carboxilasa (ACC) la cual convierte la Co-A a palmitato. También se estudiaron genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos: el Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR- α) y la Carnitina Palmitoil Transferasa-1(CPT-1). Para ello se obtuvo RNA a partir de muestras de hígados de ratas, del grupo control (8 meses de consumo de dieta AIN-93) o del grupo inducido a obesidad (7 meses, HFD+5%S) que consumió diferentes dietas, para ello se colocaron aproximadamente 100 mg de tejido (hígado) en un tubo para homogenizar en Tissue Lyser con 1 mL de trizol y se agregó el balín, se mezcló e incubó por 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 13000 g por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a nuevo tubo para adicionar 200 μ L de cloroformo, se sometió a vortex y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13000 g por 15 min a 4°C y se transfirieron 600 μ L de sobrenadante a un nuevo tubo, adicionándole 500 μ L de isopropanol, se homogenizo incubó por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 13000 g por 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante por inversión. Para lavar el producto se adiciono 1 mL de etanol frío al 75% y se se sometio a vortéx para despegar la pastilla, se centrifugó a 13000 g por 10 min a 4°C y se eliminó el etanol para repetir el lavado. Finalmente se dejó el tubo abierto por 20 min a temperatura ambiente para evaporar el etanol y se resuspendió el producto (RNA) en 200 μ L de agua libre de nucleasas y se incubó por 5 min a 65 °C, se cuantificó y almacenó a –70°C. A partir de RNA ya cuantificado se obtuvo cDNA mediante el uso de un RT, finalmente para evaluar la expresión génica se realizó mediante qPCR, usando como gen estructural ciclofilina y una concentración de DNA de 200 ng/ μ L, determinada mediante el uso de rangos dinámicos

H. Evaluación de genes involucrados en el estrés de retículo endoplásmico

Se cuantifico la expresión relativa de la X-box Binding Protein 1 (XBP-1), la Binding Immunoglobulin Protein (BiP) y el Activating Transcription Factor 6 (ATF-6), dichos factores están involucrados en el estrés del retículo endoplásmico (RE). Se ha demostrado que RE es el sitio clave donde las señales metabólicas son procesadas, integradas y transmitidas en forma de señales de sobrecarga o estrés, que dan lugar a la activación de JNK, IKK y, posiblemente, otros mecanismos inflamatorios (Jovaisaite *et al.*, 2014). La eliminación de las proteínas mal ensambladas en el retículo endoplásmico, por retrotranslocación es una adaptación fisiológica importante para corregir la sobrecarga o congestión (estrés) del retículo endoplásmico, en esta respuesta participan XBP-1 y ATF-6, mediados por la chaperona BiP, por lo que su medición nos habla del estrés del retículo endoplásmico. Para ello a partir de RNA (extraído de hígado) ya cuantificado se obtuvo cDNA mediante el uso de un RT, finalmente para evaluar la expresión génica se realizó mediante qPCR, usando como gen estructural ciclofilina y una concentración de DNA de 312.5 ng/μL, determinada mediante el uso de rangos dinámicos

I. Estudio de factores involucrados en el metabolismo de lípidos e inflamación en tejido adiposo

El exceso de almacenamiento de lípidos parece causar alteraciones funcionales que son fundamentales para los efectos fisiopatológicos de la obesidad, generando una disfunción en el metabolismo de carbohidratos y lípidos así como una inflamación crónica (Itoh *et al.*, 2011), por lo que se midió la expresión relativa de la adiponectina, leptina, Tumoral Necrosis Factor alpha (TNF-α), NADPH oxidasa (NOX) y Amiloid Precursor Protein (APP) en tejido adiposo visceral, para ello se obtuvo RNA a partir de muestras de tejido adiposo visceral, del grupo control (8 meses de consumo de dieta AIN-93) o del grupo

inducido a obesidad (7 meses, HFD+5%S) que consumió diferentes dietas, siguiendo la técnica descrita en el apartado G de métodos, solo que adicionando un paso de quitar el sobrenadante de grasa. Posteriormente, se realizó un RT-qPCR, usando como gen de referencia ciclofilina y con una concentración de 200 ng/ μ L, determinada en los rangos dinámicos

J. Análisis histológico e inmunohistoquímico del hígado y tejido adiposo

Se tomaron segmentos de diversos tejidos (hígado, tejido adiposo y colon) fijaron en formol-fosfato, para después incluirlos en bloques de parafina, para ello las muestras se deshidrataron en baños sucesivos de soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico de la siguiente manera:

- 1) Alcohol etílico al 70%, 12 horas.
- 2) Alcohol etílico al 70%, 12 horas.
- 3) Alcohol etílico al 95%, 1 hora.
- 4) Alcohol etílico al 100% (absoluto), 1 hora.
- 5) Alcohol etílico al 100% (absoluto), 1.5 horas.

Una vez que las muestras se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto, se procede a la diafanización ya que la parafina no es soluble en alcohol. La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes. El procedimiento de diafanización se realizó de la siguiente manera:

- 1) Alcohol absoluto 50% - xilol 50%, 1 hora.
- 2) Xilol, 1 hora.
- 3) Xilol, 1 hora.

Para poder realizar los cortes, las muestras se incluyeron en parafina, para lo cual la parafina se disolvió usando una estufa y se colocaron en 3

recipientes, el primero recibió las muestras embebidas en xilol. El último de los recipientes contenía a las muestras antes del proceso de formación de los “bloques” de parafina, los tiempos de este proceso fueron: primer baño 1.5 h, segundo baño 1 h y tercer baño 30 min. La inclusión de parafina se efectuó empleando moldes de metal, con orientación de las muestras adecuada, para facilitar los cortes. Para la inclusión el molde elegido se llenó con parafina caliente pura; con una pinza calentada en un mechero se tomó una pieza de tejido del tercer recipiente y se orientó una de sus se sumergió al interior del molde, una vez que la parafina empezó a solidificarse los moldes se enfriaron de inmediato para que la parafina se solidificara de manera homogénea.

Una vez obtenidos los bloques de parafina, se realizaron cortes con un grosor de 4 micras para hígado y 6 micras para tejido adiposo de manera seriada. Las secciones se extendieron y se recogieron al adherirse al portaobjetos. Sobre dichas laminillas se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina, finalmente se montaron y observaron al microscopio (Leica DM750 Wetzlar, Alemania), los cortes se fotografiaron con una cámara digital (Leica DMC2900, Wetzlar, Alemania), y se procesaron con el software de imágenes Leica LAS Core V4.5.

Respecto al análisis inmunohistoquímico se desparafinaron las secciones de tejido y se bloquearon con metanol/peroxidasa (10%) durante 10 min, se lavaron con PBS-Tween 0.05% y se bloquearon durante 30 min en una solución de fondo (Biocare Medical, Concord, CA). Para la tinción inmunohistoquímica de TNF- α , las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-TNF- α (EMD Millipore, Temecula, CA) (1:200) a 4 °C durante la noche. Los portaobjetos se incubaron a continuación durante 30 min con el ratón Immuno Detector Biotina Link (Bio SB, Goleta, CA, EUA), se incubaron durante 30 min con la etiqueta HRP con inmunodetector de ratón (Bio SB, Goleta, CA, EUA) y se incubaron durante 1 min con diaminobenzidina (DAKO, Glostrup, Dinamarca) se lavaron las laminillas con PBS-Tween 0,05% y se tiñeron con hematoxilina. Todas las muestras se observaron bajo el

microscopio (Leica DM750 Wetzlar, Alemania), los cortes se fotografiaron con una cámara digital (Leica DMC2900, Wetzlar, Alemania), y se procesaron con el software de imágenes Leica LAS Core V4.5.

K. Caracterización de las poblaciones microbianas en el intestino de ratas que consumieron diferentes tipos de dietas

Se tomaron muestras de heces fecales antes y después del cambio de dieta, en tubos eppendorf de 1.5 mL, de dichas muestras se realizaron las extracciones de DNA mediante el QIAamp DNA Mini Kit Stool con número de catálogo 51504, para ello se pesaron de 180-220 mg heces en un tubo eppendorf de 2 mL, se le añadieron 1.6mL de buffer ASL a cada muestra y se sometió a vortéx de forma continua hasta homogenizar. Centrifugar a 13000 g durante 1 min. Se tomó 1.4 mL del sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL y se adicionó una tableta InhibitEX a cada muestra, agitando hasta suspender para eliminar impurezas; se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifugó a 13000 g durante 3 min. Se tomaron 700 µl del sobrenadante y se colocaron en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL para centrifugarse a 13000 g por 3 min. Por otro lado se colocó en un tubo eppendorf de 2 mL, 25 µl de proteinasa K, más 600 µl del sobrenadante del paso anterior y se añadieron 600 µl de buffer AL, dicha mezcla se incubó a 70°C por 10 min, se dio un spin para bajar las gotas formadas y se adicionaron 600 µl de etanol al 100% frío. Se transfirieron 600 µl del lisado del paso anterior a la columna QIAamp y se centrifugo a 13000 g durante 1 min, se colocar el mini spin column QIAamp en un nuevo tubo colector de 2 ml y se adicionar una segunda alícuota de 600µl del lisado, se centrifugo a 13000 g por 1 min y se repitió el paso anterior con una tercera alícuota del lisado. Se adicionaron 500 µl de buffer AW1 se centrifugó a 13000 g durante 1 min. Se colocó el mini spin column QIAamp en un nuevo tubo colector y se añadieron 500 µl de buffer AW2, se centrifugó a 13000 g por 3 min. Se transfirió la columna mini spin QIAamp a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL

y se adicionaron 200 μ l de buffer AE. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 13000 g durante 1 min. Posteriormente se cuantificó el DNA obtenido mediante NanoDrop 2000, también se verificó la integridad mediante electroforesis, para después realizar la caracterización de los *Phylum* microbianos mediante qPCR y secuenciación masiva en la plataforma de MiSeq.

Para determinar los *Phyla* de interés mediante la técnica de PCR en tiempo real se usó una concentración de 1 ng/ μ L, la cual se determinó previamente, mediante el uso de rangos dinámicos. Los ensayos de qPCR se realizaron en el termociclador Light Cycler 480 II de Roche®, para normalizar se usó la parte conservada del gen 16S, conocida como primer universal. En la tabla 4 se presentan las secuencias de los primers utilizados para los diferentes *Phyla* a evaluar, basados en las regiones V3 Y V5 del gen 16S, así como su Tm.

TABLA 4. Primers usados para la determinación de la microbiota intestinal en ratas Wistar antes y después del consumo del nopal por qPCR

Phyla	Secuencia	Tm
<i>Bacteroidetes</i>	F: 5'-AACGCTAGCTACAGGCTTAACA-3'	61.8
	R: 5'-ACGCTACTTGGCTGGTTCA-3'	63.5
<i>Firmicutes</i>	F: 5'-GCGTGAGTGAAGAAGT-3'	50.9
	R: 5'-CTACGCTCCCTTTACAC-3'	52.0
<i>Actinobacterias</i>	F: 5'-AGAGTGCGGTAGGGGAGATT-3'	60.03
	R: 5'-AAGCCCAAGACATAAGGGGC-3'	60.12
<i>Verrucomicrobia</i>	F: 5'-CGGYCCAGACACCTACGGGT-3'	64.7
	R: 5'-TACGGGTGGCAGCAGTCGAGAA-3'	65.3
<i>Prevotella</i>	F: 5'-GGTGTGCGCTTAAGTGCCAT-3'	66.1
	R: 5'-CGGAYGTAAGGGCCGTGC-3'	68.7
<i>Bacillus Tethaiotamicron</i>	F: 5'-TACAATTGCCACAGTACGGAACA-3'	66.1
	R: 5'-GCGATGCGAATTTCTATTATT-3'	66
<i>Lactobacillus</i>	F: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'	59.8
	R: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'	60.8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F: 5'-GCGATGCGAATTTCTATTATT-3'	59.6
	R: 5'-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3'	58.5
<i>Lactobacillus mucosae</i>	F: 5'-GCGATGCGAATTTCTTTTTC-3'	60.4
	R: 5'-CAGACTGAAAGTCTGACGG--3'	59.5
<i>Bifidobacterium</i>	F: 5'-TCGCGTCYGGTGTGAAAG-3'	66.7
	R: 5'-CCACATCCAGCRTCCAC-3'	67.8
<i>Akkermansia muciniphila</i>	F: 5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'	70.3
	R: 5'-CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'	68.5
Universal	F: 5'-AAACTCAAAGKAATTGACGG-3'	61.2
	R: 5'-CTCACRRRCACGAGCTGAC-3'	59.6

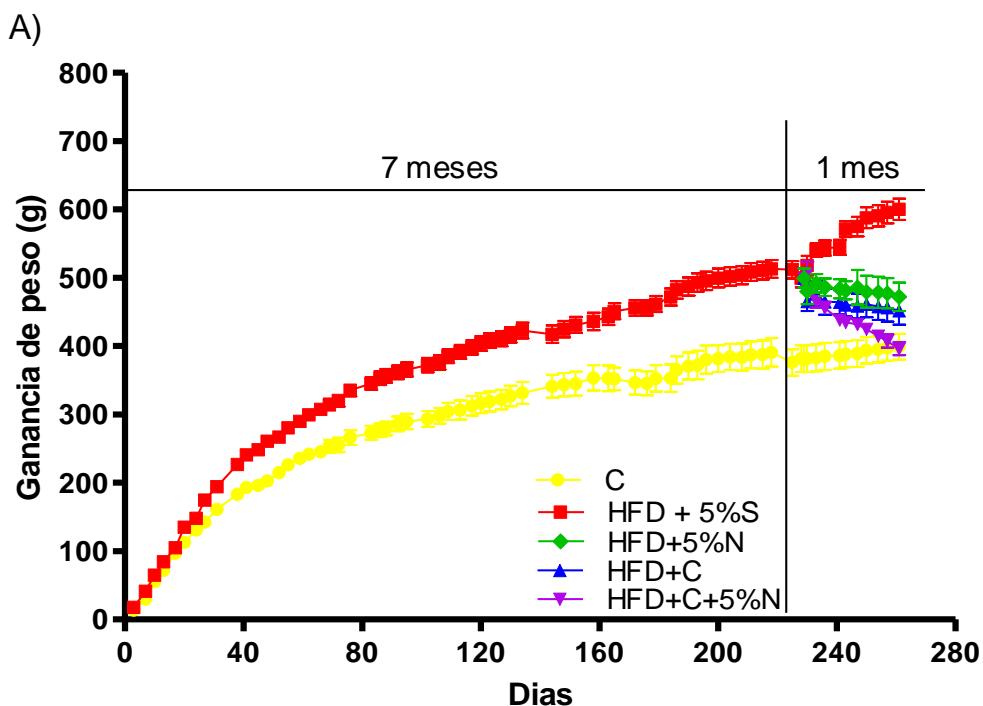
Por otra parte, se usó la plataforma de MiSeq para el secuenciamiento de las muestras obtenidas, dicha plataforma se basa en secuenciación por síntesis, para ello se generaron bibliotecas genómicas de las regiones V3 y V4 del gen 16S, usando primers para dichas regiones que además contenían un adaptador overhang, propio de Illumina (F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' y R: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3').

Los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron mediante reacciones de PCR con un volumen total de 25 μ L, de los cuales 2.5 μ L fueron de DNA genómico (5 ng/ μ L en 10 mM Tris pH 8.5), 12.5 μ L de High Fidelity DNA polymerase 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 μ L de cada primer (1 μ M). Esta mezcla se metió al termociclador y se corrió mediante el siguiente programa: 3 min a 95 °C, seguido de 25 ciclos amplificación los cuales consistían desnaturalización (30s a 95 °C), alineamiento (30s a 55 °C) y extensión (30s a 72 °C). La extensión final consistió en 5 min a 72 °C. Los amplicones fueron purificados mediante el uso de perlas magnéticas AMPure XP beads y se verifico su tamaño en una electroforesis capilar en el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), el tamaño aproximado fue de 550pb. Una vez pasado el control de calidad se procedió a indexar las muestras usando los adaptadores de Illumina Nextera XT Index Kit (v.2, Set A). Para este proceso se tomaron 5 μ L del primer producto de PCR, 25 μ L de High Fidelity DNA polymerase 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 μ L de cada primer (Índice), teniendo un volumen total de 50 μ L los cuales se mezclaron y se metieron de nuevo al termociclador, corriendo el siguiente programa 3 min a 95 °C, seguido de 8 ciclos amplificación los cuales consistían desnaturalización (30s a 95°C), alineamiento (30s a 55 °C) y extensión (30s a 72 °C). La extensión final consistió en 5 min a 72 °C. Este producto se purifico y analizo su integridad como el anterior, estos amplicones tuvieron un tamaño aproximado de 610 pb. Se determinó la concentración de DNA de doble hebra con fluorometria (fluorometer Qubit 3.0, high sensitive kit). La librería final se mezcló de manera equimolar y se secuencio en la plataforma de Illumina MiSeq (MiSeq Reagent Kit V.3, 600 cycles) siguiendo las instrucciones del proveedor, generando lecturas de 300 bases en cada dirección. Finalmente los datos obtenidos, se analizaron usando QIIME v.1.9, las lecturas fueron asignados a los niveles de phylum, clase, orden, familia y género, usando la comparación de las OTUs con QIIME contra la base de datos Greengenes. Respecto a las abundancias de OTUs, se calcularon incluyen matrices de abundancia en diferentes niveles taxonómicos. Para comparar las diferentes muestras se hizo el corte en 3 875 lecturas, basándose en el mínimo de la suma de las abundancias de los taxones en RV.3.0.1.

RESULTADOS

I. Curva de crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar en un modelo de obesidad inducida por dieta (OID)

A continuación se muestra la ganancia de peso de los grupos alimentados con una dieta alta en grasa saturada y colesterol + 5% sacarosa en el agua (HFD+5%S) o con una dieta control de caseína al 20% como lo recomienda el AIN 93 (C) por un periodo de 7 meses. Como se puede observar en la Figura 1 durante el periodo de inducción a obesidad (7 meses), el grupo alimentado con la HFD+5%S tuvo un incremento en la ganancia de peso de 30.9% respecto al grupo control. Posterior al consumo de diferentes dietas por 1 mes, el grupo obeso continuo ganando peso aproximadamente por un 17.3% debido al consumo de una HFD+5%S en el agua respecto a la ganancia de peso a la inicial. Los animales obesos que consumieron 5% de nopal en la dieta, a pesar de continuar consumiendo una dieta alta en grasa disminuyeron 7.6% respecto a su ganancia de peso inicial. Respecto a los grupos que consumieron dieta control con y sin nopal, mostraron una disminución de 22.7% y 11.5% respectivamente



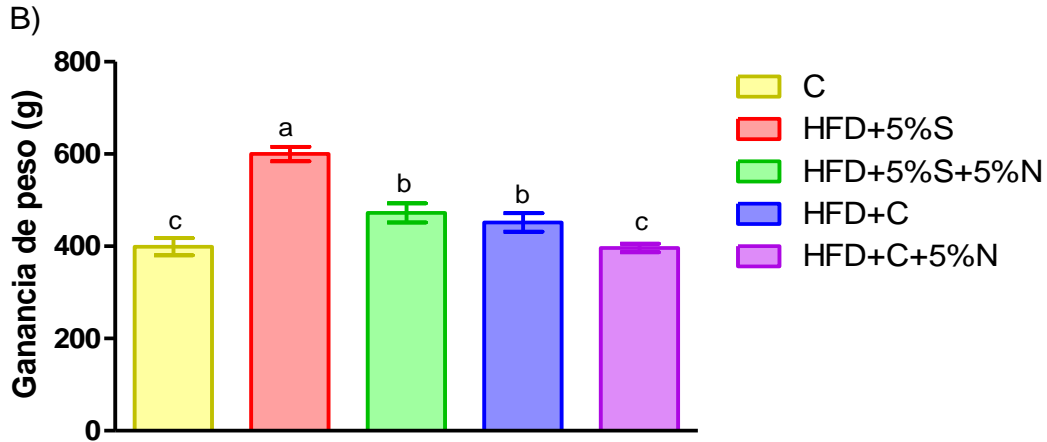
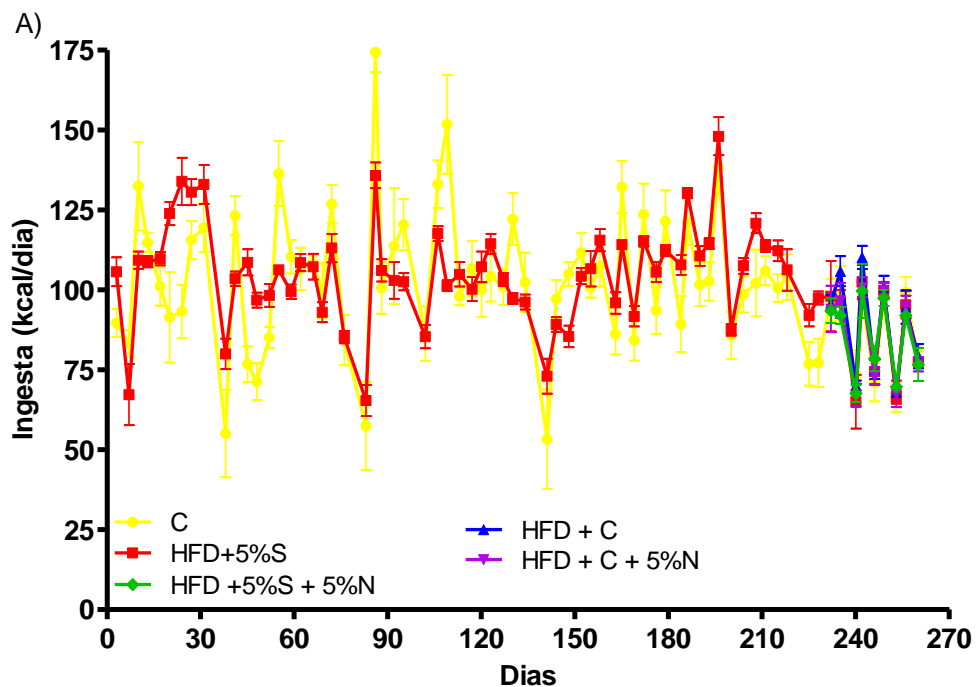


Figura 1. Ganancia de peso. A) Curvas de crecimiento de ratas Wistar alimentadas con una dieta al 20% de caseína (dieta control) y con una dieta alta en grasa saturada y sacarosa (5%) en el agua con y sin nopal B) Ganancia de peso promedio de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se muestran en promedio \pm SEM, n=5

Respecto al consumo de alimento, como se puede apreciar en la Figura 2 se observa que el consumo calórico de alimentos en el grupo control y en grupo que consumió una HFD+5%S, antes y después del cambio de dieta es el mismo, por lo que las variaciones en el peso no se deben a una diferencia en la ingesta calórica, sino que se debe a la fuente de energía



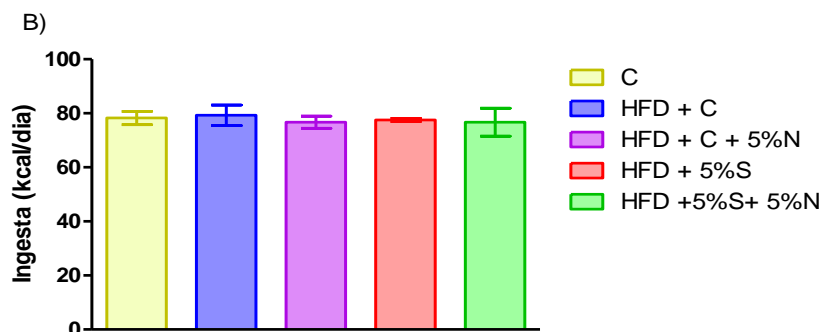


Figura 2. Ingesta de alimento. A) Determinación de la ingesta de alimento en ratas Wistar alimentadas con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua con o sin nopal. B) Ingesta calórica promedio de los diferentes grupos de animales experimentales. Los resultados se muestran en promedio \pm SEM, n=5

II. Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)

Esta prueba se realizó después de 7 meses del consumo de dieta control o la HFD+5%S y después de la inclusión del nopal en la dieta por 1 mes (8 meses de experimentación). Para ello se mantuvieron a los animales en ayuno durante 7 horas, se midió el nivel basal de glucosa sanguínea y se administró vía i.p. una solución de glucosa a una dosis de 2g/kg y se cuantificó la glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración. Se obtuvo la gráfica de la CTG por grupo y se determinó el área bajo la curva. En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos. En el panel A se observa que el grupo control tiene una CTG normal, incrementando los niveles séricos de glucosa entre los 15 y 30 min después de la administración y disminuyendo de manera gradual hasta regresar a los niveles basales a los 120 min posteriores a la administración, por el contrario el grupo obeso muestra un incremento en la glucosa sérica pero sin poder retornar a los niveles basales aun después de un periodo de 2 horas posteriores a la administración lo que sugiere una resistencia a la insulina. En la Figura 3B se muestra el área bajo la curva de los grupos experimentales antes del consumo del nopal y se observa que el grupo alimentado con HFD+5%S, tiene un ABC mucho mayor que el grupo control, siendo un incremento del 32.8% respecto al grupo control. Posterior al cambio de dieta, los animales que consumieron dieta control con o sin nopal así como los que

continuaron consumiendo una HFD+5%S pero con nopal mostraron una mejora en su CTG, mostrando un comportamiento similar al grupo control (Figura 3C), al calcular el área bajo la curva después del cambio de dieta (Figura 3D) se puede observar que el grupo obeso, tiene un área mucho mayor respecto al control (incremento del 57.3%), mientras que el grupo que consumió HFD e incluyó el 5% de nopal muestra una disminución del 26.5% del ABC respecto al grupo obeso. En el caso de los animales obesos que consumieron dieta control muestran una disminución del 28.4% respecto al grupo obeso y aquellos que consumieron una dieta control y nopal en la dieta muestran una disminución en el ABC del 43.8%. Por lo anterior podemos decir que el consumo del nopal en la dieta tiene un efecto positivo al mejorar la tolerancia a la glucosa, promoviendo su aprovechamiento, mediante la disminución de la resistencia a la insulina

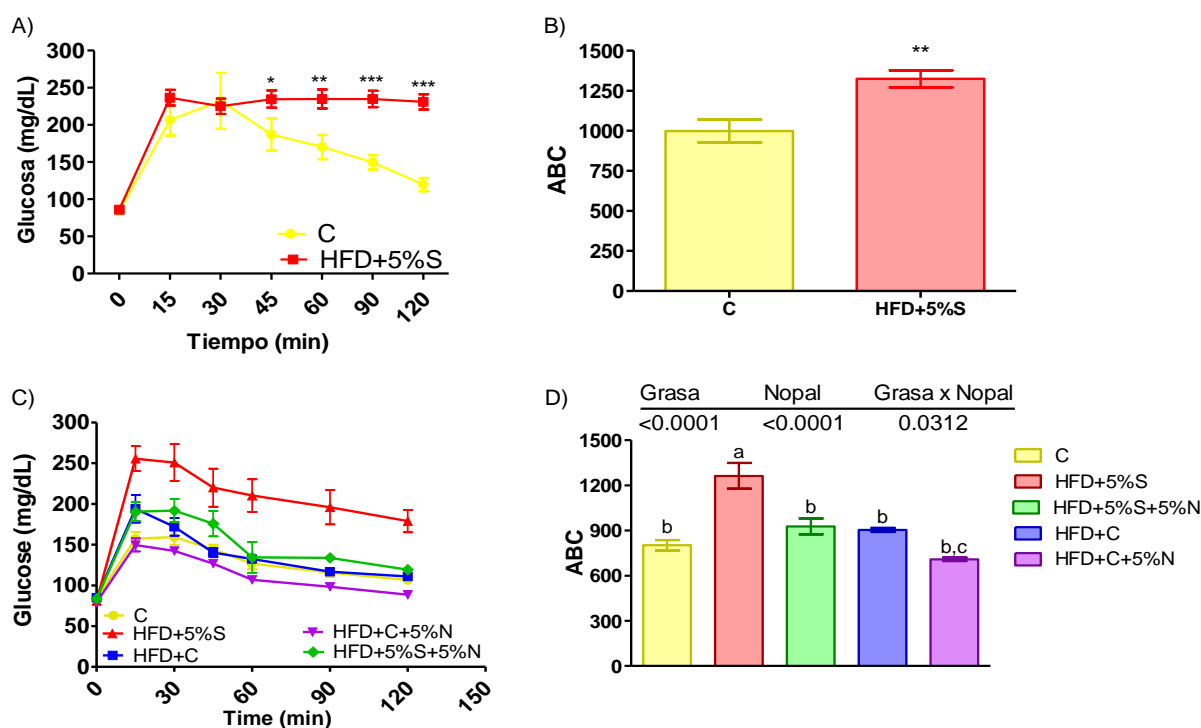


Figura 3. Curva de tolerancia a la glucosa. A) Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar alimentadas con una dieta control o una dieta alta en grasa y 5% de sacarosa en el agua de bebida. B) Área bajo la curva de una curva de tolerancia a la glucosa, determinada después del 7 meses de consumo de una dieta control o una dieta alta en grasa. C) Curva de tolerancia a la glucosa de ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 20% o una dieta alta en grasa y sacarosa al 5% en el agua después del consumo del nopal. D) Área bajo la curva de una curva de tolerancia a la glucosa, determinada después de un mes del consumo de nopal en ratas Wistar con OID.

III. Parámetros bioquímicos en suero en los diferentes grupos experimentales

Se determinaron los parámetros bioquímicos de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL después de inducir la obesidad a los animales por un periodo de 7 meses de tratamiento (dieta control o dieta alta en grasa más sacarosa) y posterior al consumo de nopal, esta determinación se realizó mediante el autoanalizador cobas 111 de Roche® y en el caso de la insulina por RIA. En las tablas 5 y 6 se presentan los resultados obtenidos.

En la primer etapa del experimento (Tabla 5), el grupo que consumió HFD+5%S muestra un incremento respecto al grupo control de la glucosa sérica del 50.2%, del 111.4% para insulina, para triglicéridos el aumento es del 55.2%, en el caso del colesterol total es del 46.3% mientras que del colesterol LDL es de 123.5% y del HDL es del 0.5%, siendo esta última no significativa estadísticamente.

TABLA 5. Parámetros bioquímicos en ratas Wistar que consumieron dieta control (C) o dieta alta en grasa (HFD) por 7 meses

Parámetro	C	HFD	p-value
Glucosa (mg/dL)	85.2 ± 6	128 ± 6	0.0009
Insulina (ng/mL)	0.35 ± 0.1	0.74 ± 0.2	0.0003
Triglicéridos (mg/dL)	67.3 ± 6.4	104.4 ± 4.6	0.0004
Colesterol total (mg/dL)	65.4 ± 7.6	95.7 ± 3.7	0.0007
Colesterol LDL (mg/dL)	12.9 ± 1.4	27.5 ± 0.4	<0.0001

Valores promedio ± SEM, n=5

Posterior al cambio de dieta, se observaron mejorías en todos los tratamientos, siendo el tratamiento más efectivo el del grupo que consumió una dieta control con 5% de nopal (HFD+ C +5%N) el cual tuvo una disminución del 37.7% en la glucosa sérica, del 77.5% en la insulina, en el caso de los triglicéridos esta disminución fue del 64.2%, mientras que en el colesterol total y LDL fue del 49% y 52.9%, respectivamente (tabla 6).

TABLA 6. Parámetros bioquímicos séricos de ratas Wistar que consumieron una dieta control o alta en grasa con o sin la inclusión de 5% de nopal durante un mes

Pretratamiento (7mo)	C	HFD	HFD	HFD	HFD	P-value		
Tratamiento (1mo)	C	HFD	C	C+N	HFD+N	Grasa	Nopal	G x N
Glucosa (mg/dL)	97.5 ± 1.4 ^d	156 ± 1.4 ^a	110 ± 4.3 ^c	97.2 ± 1.8 ^d	129 ± 0.6 ^b	<0.0001	<0.0001	0.0105
Insulina (ng/mL)	0.32 ± 0.03 ^b	4.4 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.4 ^b	0.99 ± 0.08 ^b	1.5 ± 0.22 ^b	<0.0001	<0.0001	0.0003
Triglicéridos (mg/dL)	95.3 ± 2.9 ^b	203 ± 5 ^a	115 ± 6 ^b	72.6 ± 7.4 ^c	98.7 ± 3.3 ^b	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Colesterol total (mg/dL)	65 ± 1 ^c	123 ± 1 ^a	83.7 ± 4 ^b	62.7 ± 0.7 ^c	67.1 ± 1.8 ^c	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Colesterol LDL (mg/dL)	14.2 ± 1.6 ^b	25.3 ± 2 ^a	14.7 ± 1.9 ^b	11.9 ± 0.6 ^b	12.3 ± 0.7 ^b	0.0016	<0.0001	0.0029

Valores promedio ± SEM, n=5

Nota: Las ratas que consumieron la HFD también incluyeron el 5% de sacarosa en el agua de bebida

Determinación del péptido gastrointestinal dependiente de glucosa (GIP)

Dicha determinación se realizó en suero y antes y después de consumo de nopal. Durante la obesidad se observó un incremento significativo de dicha incretina, lo que correlaciona con el estado de hiperinsulinemia que presentaron los animales que consumieron una HFD+5%S. El aumento en GIP después de desarrollar OID fue de 9.33 veces respecto al control. Sin embargo, al incluir el 5% de nopal en la dieta, a pesar de continuar consumiendo la HFD+5%S en el agua (HFD+5%S+5%N) la incretina en suero disminuyó un 61.8% respecto al grupo obeso, esta disminución es aún mayor que la que mostro el grupo HFD+C el cual presento un decremento del 34.6%, mientras que el grupo que consumió una dieta control y 5% de nopal, después de la obesidad tuvo una disminución del 67.8%, lo cual significa que los niveles séricos de esta incretina están aun ligeramente debajo del grupo control.

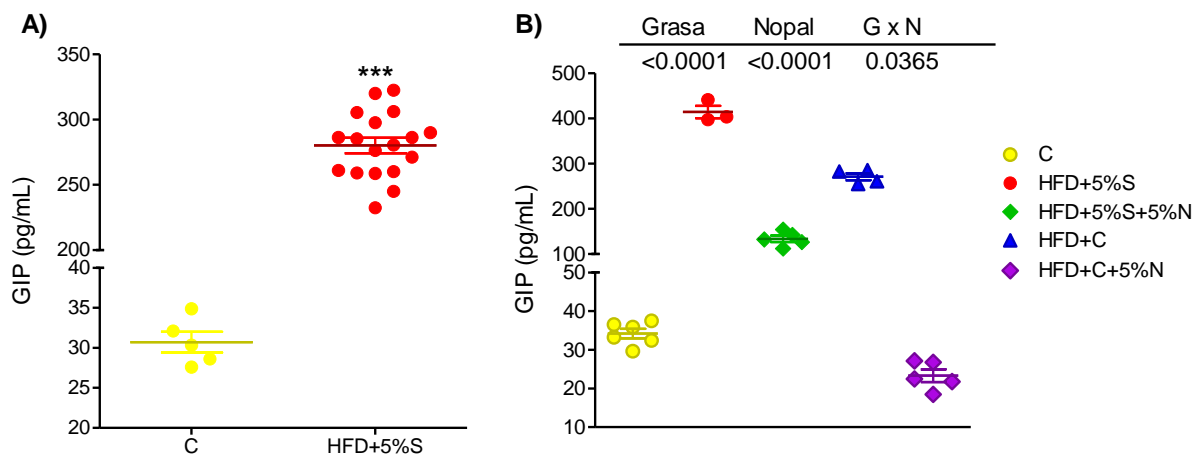


Figura 4. Determinación de GIP. A) GIP en suero de ratas Wistar que consumieron durante 7 meses una dieta control o una dieta alta en grasa saturada y colesterol+5% de sacarosa en el agua B) GIP sérico de ratas Wistar con OID después de la inclusión de 5% de nopal en la dieta durante un mes

Determinación del lipopolisacárido (LPS)

Este factor que nos ayuda a establecer la condición de endotoxemia se determinó en suero, mediante el uso de ELISA. Los resultados obtenidos sugieren que el grupo con OID presenta una endotoxemia metabólica ya que los niveles de LPS fueron 6 708.5 veces mayores a los observados en el grupo control (Figura 5A), sin embargo al cambiar durante un mes la dieta, consumiendo una dieta control se observó una disminución del 96.6% respecto el grupo obeso, aunque esto continua representando que el nivel de LPS es 378.3 veces respecto al grupo control (Figura 5B). Al incluir el 5% de nopal en la dieta (HFD+5%S+5%N) estos niveles disminuyeron de manera similar al grupo HFD+C, que representaría tener 289.86 veces más LPS en suero que el grupo control. Finalmente, como se puede apreciar en la Figura 5B al combinar una dieta control y 5% de nopal en la misma el decremento en el LPS es mucho mayor, representando una disminución del 99.6% respecto al grupo control, es decir, esta aumentado únicamente 44.2 veces en relación con el grupo control, lo cual representa una mejora muy significativa al disminuir en gran medida la endotoxemia metabólica generada por la obesidad

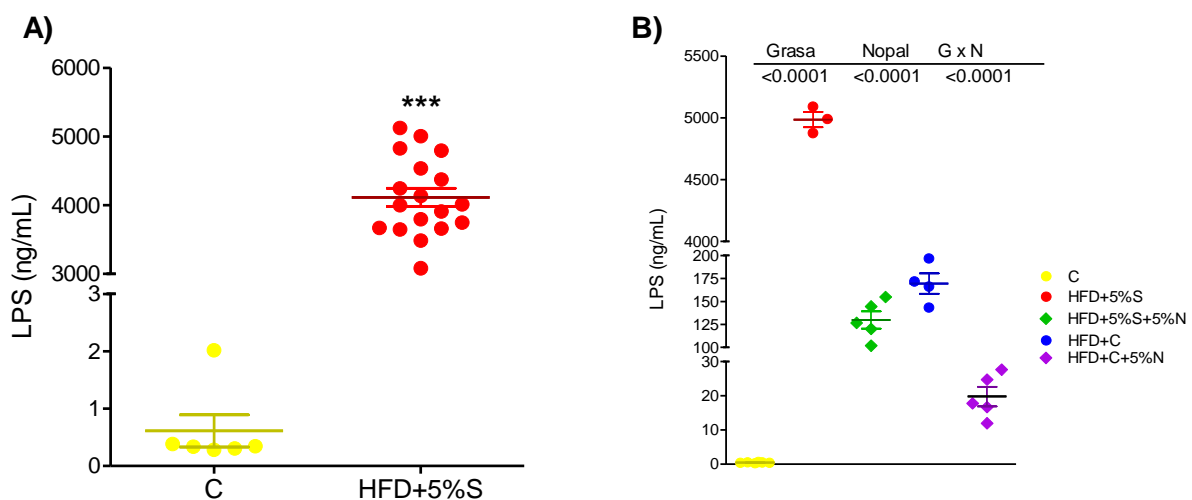


Figura 5. Determinación del lipopolisacárido en suero. A) LPS en suero de ratas Wistar que consumieron durante 7 meses una dieta control o una dieta alta en grasa saturada y colesterol+5% de sacarosa en el agua. B) LPS sérico de ratas Wistar con OID después de la inclusión de 5% de nopal en la dieta durante un mes

IV. Evaluación del gasto calórico y coeficiente respiratorio

Coeficiente de intercambio respiratorio (RER)

Se determinó coeficiente de intercambio respiratorio (RER) de los grupos después de la inducción de la obesidad (7 meses) y después de la inclusión del nopal (1 mes) en la dieta por medio de calorimetría indirecta determinando el volumen de oxígeno. En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos para el RER. En los paneles A y B se muestra el RER en ratas Wistar después de 7 meses bajo una dieta control o HFD+5%S. En la Figura 6A se muestra dicho coeficiente en intervalos de 22 min, y el área sombreada representa la noche es decir cuando la ingesta de alimento es mayor en los roedores mientras que en la gráfica 6B se presentan los promedios de todos los puntos en periodos de ayuno (día) y postprandio (noche). Durante el periodo de ayuno tanto el grupo control tiene un RER de 0.8077 mientras que el grupo obeso muestra un RER de 0.7785, debido a que ambos oxidan proteínas y ácidos grasos, sin embargo, durante la noche (postprandial) el del grupo control sube el RER a 0.9799 mientras que el obeso se queda en 0.7995, esta diferencia muestra que el grupo obeso tiene una inflexibilidad metabólica es decir a no puede cambiar tan rápidamente de sustrato a oxidar para la obtención de energía, por lo que aunque este consumiendo carbohidratos sigue oxidando lípidos. En el caso de las Figuras 6C y 6D se muestran los resultados obtenidos después del consumo del nopal, en la figura 6C se observa como en el periodo de ayuno todos tienen un RER cercano a 0.7, pero en el periodo postprandial, el grupo que continuo consumiendo HFD+5%S en ausencia de nopal muestra una inflexibilidad metabólica (RER= 0.7659), sin embargo, al incluir el 5% de nopal en la dieta aumenta el RER a un valor intermedio (0.8410), lo que indica que el animal comienza a recuperar la capacidad de oxidar carbohidratos como fuente de energía, mientras que los animales obesos que consumieron dieta control con o sin nopal muestran un RER postprandial de 0.9303 y 0.9262 respectivamente, los cuales muestran que los animales recuperaron esa flexibilidad metabólica. Los datos se analizaron con ANOVA, seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni.

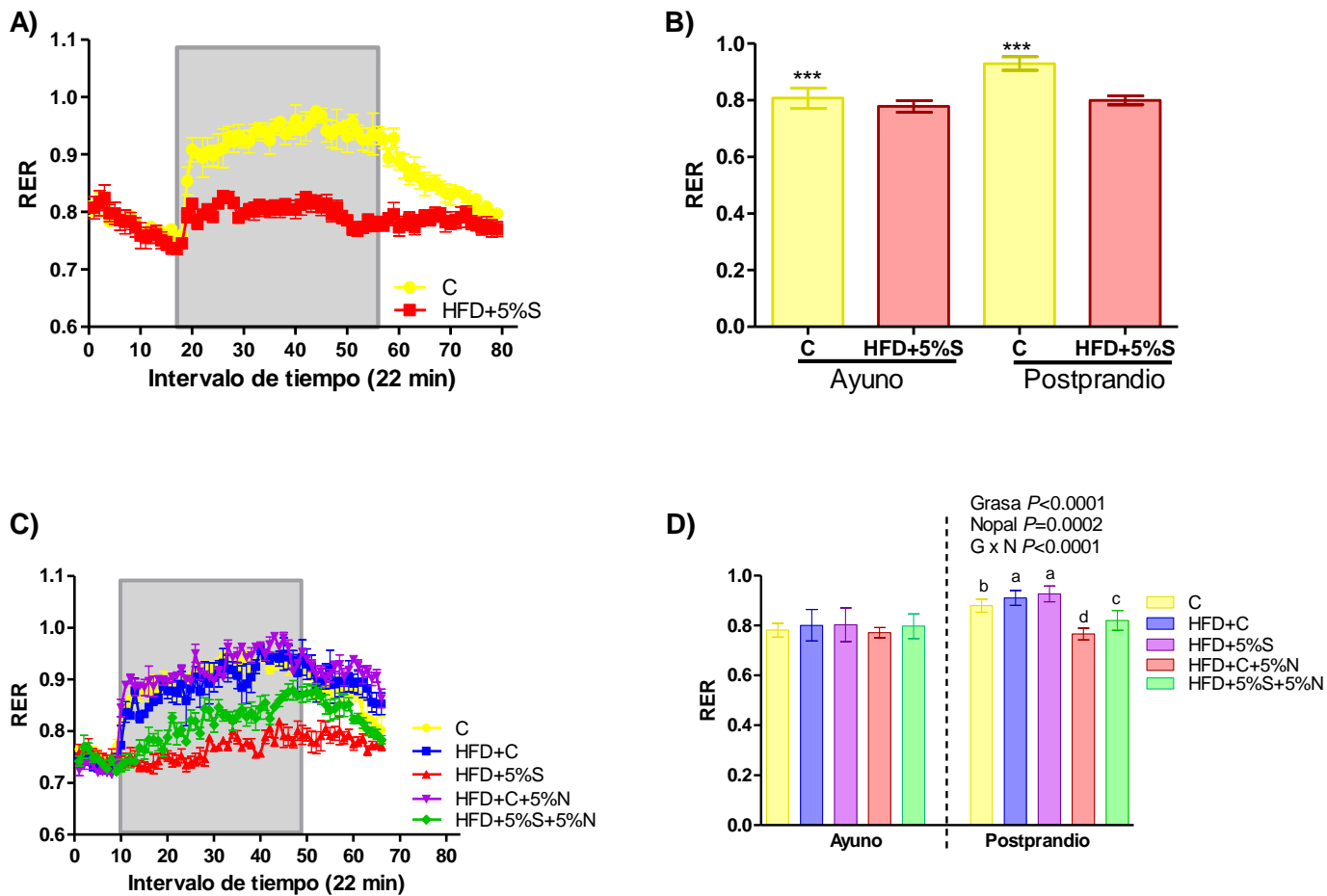


Figura 6. Determinación de coeficiente respiratorio. A) RER del grupo control y del grupo alimento con una dieta alta en grasa saturada y colesterol+5% de sacarosa en el agua durante 7 meses. B) RER promedio durante los periodos de ayuno y postprandio determinado en ratas Wistar que consumieron dieta control o alta en grasa por 7 meses. C) RER de ratas Wistar que consumieron nopal durante un mes. D) RER promedio durante los periodos de ayuno y postprandio determinado en ratas Wistar que consumieron nopal por durante un mes

Volumen de oxígeno (VO₂)

También se determinó el volumen de oxígeno en ratas Wistar con OID antes y después de un mes de tratamiento con nopal, posterior al periodo de inducción a obesidad, estos resultados se observan en la figura 7. En la gráfica 7A se presentan todos los datos en intervalos de 22 min, y el área sombreada representa la noche es decir la ingesta de alimento, dicha prueba se realizó antes del consumo del nopal. En la gráfica 7B se presentan los promedios de todos los puntos en periodos de ayuno y postprandiales, y se observa una clara disminución en el VO₂ en el grupo obeso respecto al control tanto en

ayuno como en el postprandio. Este resultado sugiere que el grupo obeso es incapaz de oxidar adecuadamente los sustratos para la obtención de energía, es decir, es menos funcional metabólicamente. En los paneles 7C y 7D se aprecia la medición del VO_2 posterior al cambio de dieta durante un mes y se aprecia que a pesar de que los que todos los grupos tuvieron una inducción a obesidad su VO_2 es menor, aumento aquellos que consumieron nopal respecto a aquellos que no consumieron nopal, lo cual muestra una mejoría parcial, lo cual correlaciona con la mejoría en la recuperación de la flexibilidad metabólica.

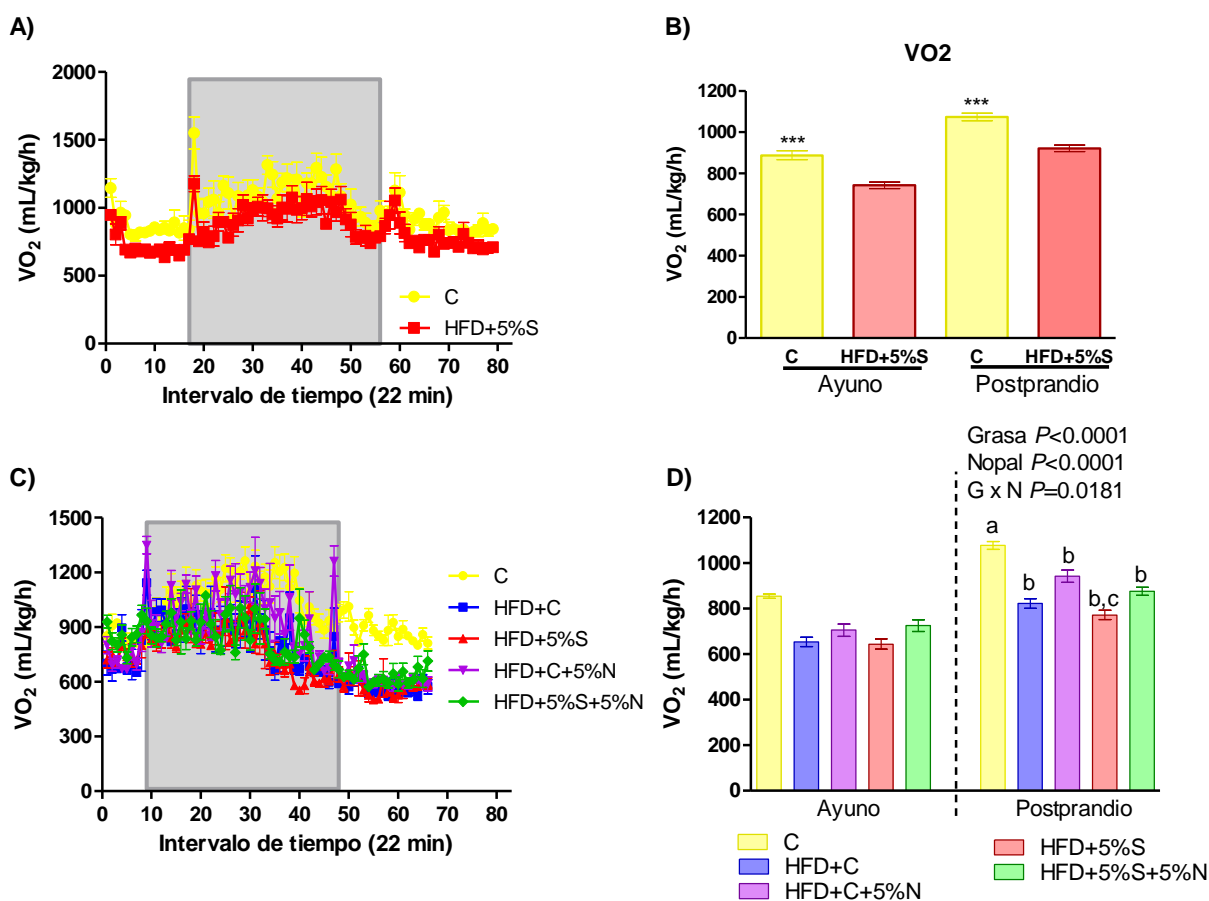


Figura 7. Determinación del volumen de oxígeno. A) VO_2 del grupo control y en el grupo alimento con una dieta alta en grasa saturada y colesterol+5% de sacarosa en el agua durante 7 meses. B) VO_2 promedio durante los periodos de ayuno y postprandio determinado en ratas Wistar que consumieron dieta control o alta en grasa por 7 meses. C) Determinación del VO_2 en ratas Wistar que consumieron nopal durante un mes. D) VO_2 promedio durante los periodos de ayuno y postprandio determinado en ratas Wistar que consumieron nopal por durante un mes

Gasto calórico

Se determinó el gasto calórico en ratas Wistar con obesidad inducida por dieta (Figura 8). En los paneles A y B se presentan los resultados previos al cambio de dieta, en la Figura 8A se presentan todos los datos en intervalos de 22 min, y el área sombreada representa la noche (ingesta de alimento). En la gráfica 8B se presentan los promedios de todos los puntos en periodos de ayuno y postprandiales, aumentando durante este periodo, se puede apreciar que el calor es mayor en animales con OID. En las figuras 8C y 8D se presentan los resultados después del cambio de dieta tanto por intervalos (8C) y los valores promedio (8D) se puede apreciar que los animales que dejaron de consumir una HFD+5%S disminuyeron su calor, este aumenta de nuevo en el postprandio, siendo mayor en aquellos animales que no consumieron el nopal, en comparación con los que sí lo consumieron lo que muestra correlación con el RER y el VO_2 .

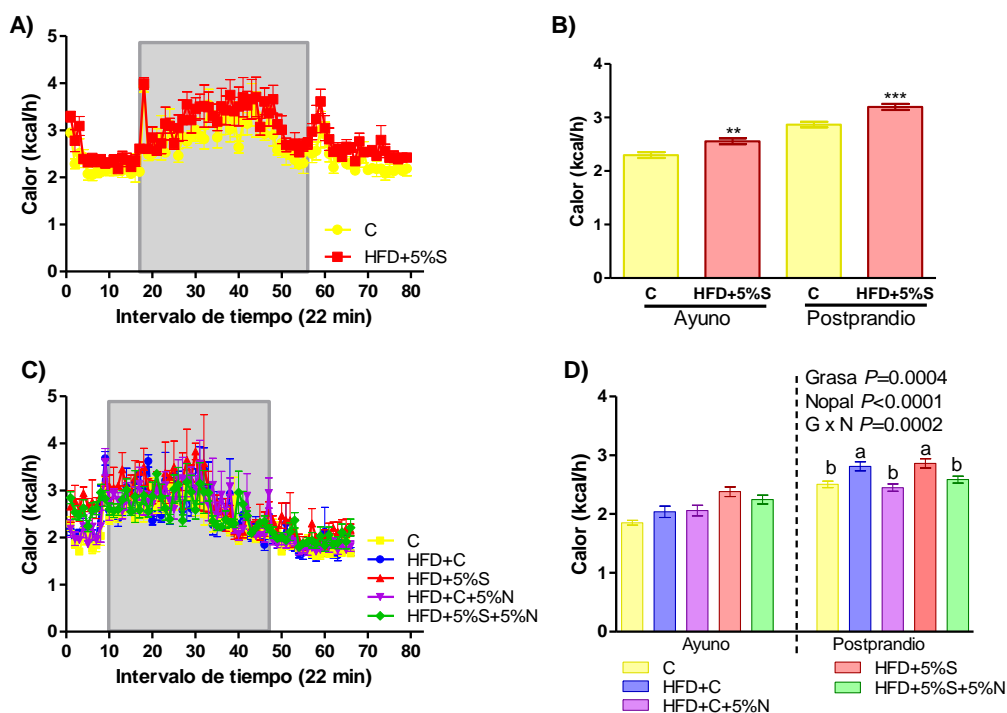


Figura 8. Determinación del gasto calórico A) Gasto calórico del grupo control y el grupo alimento con una dieta alta en grasa saturada y colesterol+5% de sacarosa en el agua durante 7 meses. B) Gasto calórico promedio durante los periodos de ayuno y postprandio determinado en ratas Wistar que consumieron dieta control o alta en grasa por 7 meses. C) Determinación del gasto calórico en ratas Wistar que consumieron nopal durante un mes. D) Gasto calórico promedio durante los periodos de ayuno y postprandio determinado en ratas Wistar que consumieron nopal por durante un mes

V. Estudio de factores involucrados en el metabolismo de lípidos

Una vez realizada la eutanasia (posterior a 7 meses de inducción a obesidad y un mes del consumo del nopal) se obtuvo el hígado, del cual se extrajo el RNA, mediante el uso de trizol. A continuación se muestra los RNA obtenidos por grupo de tratamiento. En la figura 9 se observa una mayor absorbancia de todas las muestras a una longitud de onda de 260 nm. Además las absorbancias a 230 y 280 nm son muy bajas lo que se refleja en el cociente 260/280 y 260/230, los cuales son altos, indicándonos que las muestras aisladas presentan un alto grado de pureza y pueden ser empleadas en técnicas de biología molecular como qPCR.

TABLA 7. Concentraciones y pureza del RNA aislado a partir de hígado, posterior a siete meses de inducción a obesidad y al consumo de nopal durante un mes			
Grupo	C (ng/μL)	260/280	260/230
Control (AIN-93)	5983.67	2.03667	1.65333
OID - AIN-93	6029.93	2.03667	1.68667
OID – DAGS	5011.8	2.03667	1.62
OID - AIN-93 + 5% nopal	6220.07	2.03333	1.65667
OID - DAGS + 5% nopal	5968.8	2.03333	1.6

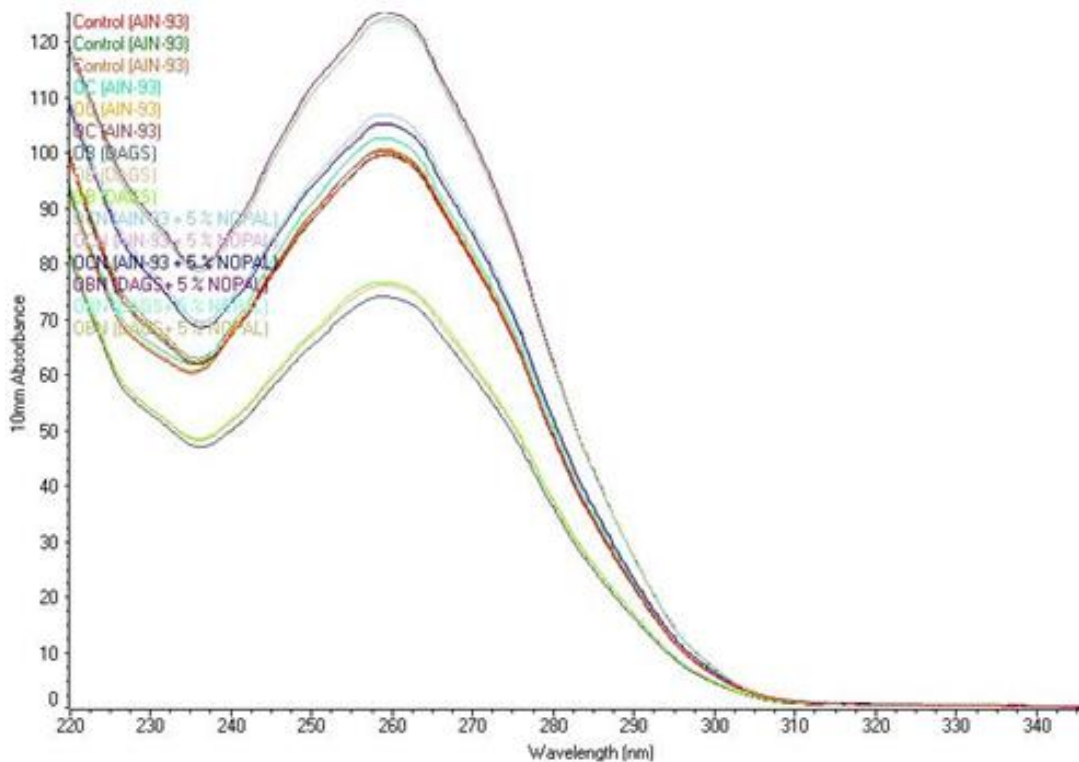


Figura 9. Determinación de la concentración y pureza del RNA aislado a partir de hígados de ratas Wistar con 7 meses de inducción a obesidad antes y después del consumo del nopal.

Una vez obtenido el RNA del hígado se generó cDNA a una concentración de 5000 ng/ μ L mediante el uso de la técnica de RT. Para determinar la concentración de cDNA a emplear se realizaron los rangos dinámicos, usando diluciones del cDNA con concentraciones de 250, 50, 10, 2, 0.4 y 0.08 ng/ μ L para los genes a estudiar (SREBP-1, FAS, ACC, PPAR- α y CPT-1) así como para los genes usados como estructurales (ciclofilina y HPRT).

Posteriormente se realizó una dilución para obtener una concentración de DNA de 10 ng/ μ L para analizar por qPCR en el termociclador Ligth Cycler 480 II de Roche $\text{\textcircled{R}}$, usando como gen estructural ciclofilina. En la figura 10 se muestra la expresión relativa de SREBP-1, ACC, FAS, PPAR α y CPT-1. Se observa un claro incremento de estos factores involucrados en la lipogénesis al consumir una dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua, sin embargo al incluir el

consumo del nopal en la dieta esta expresión disminuye. Mientras que la expresión de PPAR- α , involucrado en la oxidación de ácidos grasos, se reprime su expresión en el grupo obeso, sin embargo, al consumir nopal en la dieta, su expresión aumenta, aun respecto al grupo control; este mismo comportamiento se observa en el gen blanco de PPAR- α , CPT-1

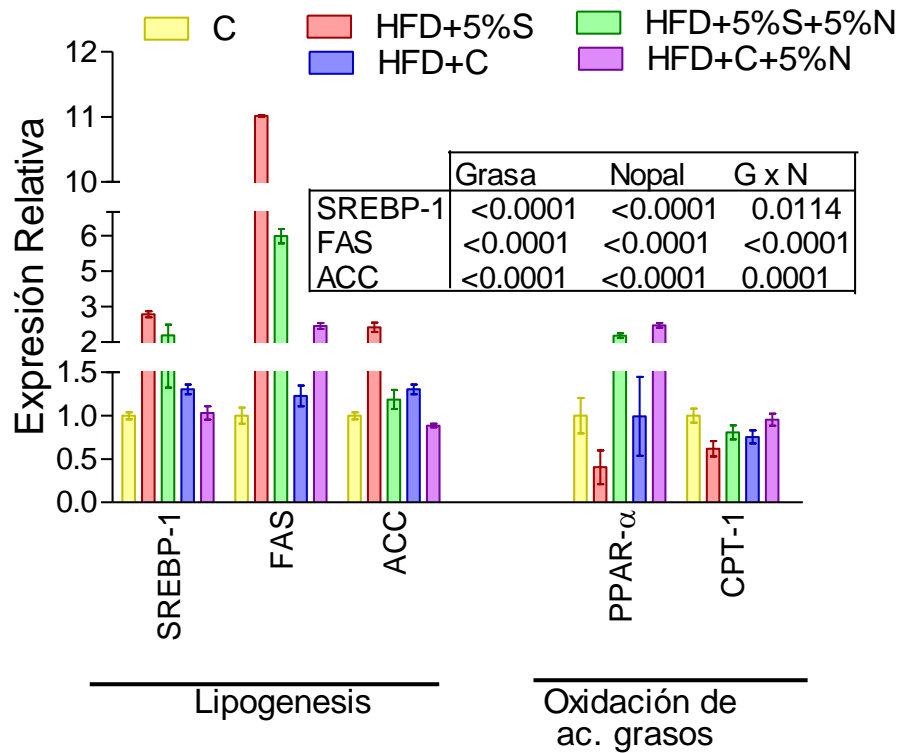


Figura 10. Cuantificación de la expresión génica relativa de genes involucrados en el metabolismo de lípidos.

VI. Evaluación de factores involucrados en el estrés del retículo endoplásmico

A partir del RNA extraído de hígado, se obtuvo cDNA mediante un RT y se realizaron los rangos dinámicos correspondientes para el estudio de la expresión relativa de XBP-1, BiP y ATF-6 mediante el uso de qPCR. En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos. Durante la obesidad hubo un incremento de la expresión de XBP-1 y BiP del 50.8% y 86.8%, respecto al grupo control, respectivamente. Sin embargo, al incluir el nopal en la dieta durante un mes, a pesar de continuar consumiendo grasa (HFD+5%S+5%N), la expresión de estos factores involucrados en el estrés de retículo endoplásmico se vio disminuida en un 42.5% y 33.41%; mientras que al hacer el cambio a la dieta control con 5% de nopal (HFD+C+5%N) la expresión de XBP-1 disminuye 50.8% respecto al grupo obeso y la expresión del mRNA de BiP es 47.7% menor respecto al grupo que consume una dieta alta en grasa y 5% de sacarosa en el agua de bebida. Finalmente, no se observaron cambios significativos en ATF-6. Estos resultados sugieren que el consumo de una dieta alta en grasa incrementa el estrés de retículo endoplásmico, pero que este se ve disminuido al incluir nopal en la dieta, ya sea con o sin grasa.

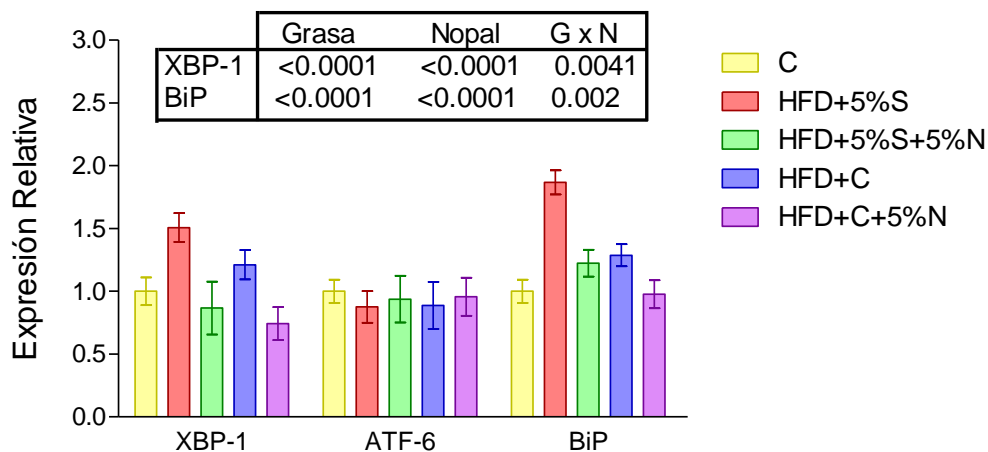


Figura 11. Cuantificación de la expresión génica relativa de genes involucrados en el estrés del retículo endoplásmico en hígado

VII. Evaluación factores involucrados en diferenciación celular, inflamación, estrés oxidante y hormonas en tejido adiposo

Como ya se mencionó, se hizo mediante RT-qPCR y se estudió la expresión relativa de leptina, adiponectina, TNF- α , NOX y APP, usando como genes de referencia a actina y ciclofilina. En la figura 12 se presentan los resultados obtenidos

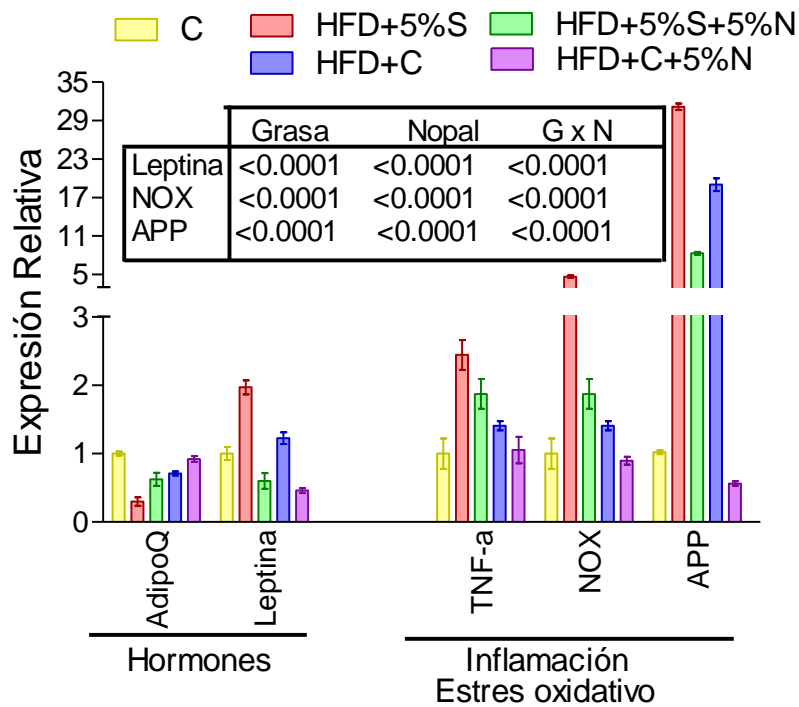


Figura 12. Cuantificación de la expresión génica relativa de genes involucrados en el metabolismo de lípidos e inflamación en tejido adiposo

Como se puede apreciar en el estado de obesidad hay un aumento importante en la expresión de la leptina, NOX, APP y TNF- α , lo que nos habla de una inflamación y aumento del estrés oxidante, la cual disminuye con el consumo del nopal, mientras que por el contrario disminuye la expresión de la adiponectina durante la obesidad y aumenta, reestableciendo su expresión con el consumo del nopal.

VIII. Estudio histológico del impacto del consumo de nopal en la obesidad

Se realizaron cortes con un grosor de 4 micras y tinciones de hematoxilina-eosina después de la eutanasia (8 meses). A continuación se presentan los resultados obtenidos. También se realizó una inmunohistoquímica versus TNF- α (EMD Millipore, Temecula, CA, EUA). En la Figura 13 se observan cortes de hígado teñidos con HE como se puede observar en la Figura 13A se ven los hepatocitos sanos y sin fibrosis, en la Figura 13B, que corresponde al grupo que consumió una dieta alta en grasa durante 8 meses, se observa una acumulación micro y macro vesicular de grasa en el tejido aunque no se observa fibrosis. En los paneles 13C y 13D se observa una disminución muy significativa de las vacuolas lipídicas, siendo prácticamente nulas, mientras que en el panel E podemos observar que el tamaño de estas gotas de grasa disminuyen, a pesar de que todavía hay una cantidad apreciable de las mismas. En la figura 14B se observa una extrema inflamación, la cual disminuye al consumir una dieta C después de un periodo de OID (Figura 14C), o bien al consumir 5% de nopal en la dieta (Figura 14E) se observa una respuesta similar. Sin embargo, al combinar una dieta balanceada con 5% de nopal en la misma (Figura 14D) se desaparece prácticamente por completo la inflamación del hígado causada por una HFD+5%S consumida durante un largo periodo. Este resultado es interesante ya que se puede inferir que el consumo de alimentos funcionales como el nopal en la dieta puede disminuir de manera considerable la esteatosis hepática. Con relación al tejido adiposo visceral (Figura 15), se observa que el grupo obeso presenta una hipertrofia e hiperplasia respecto al grupo control, mientras que con el cambio de dieta, disminuye el tamaño de los adipocitos y este cambio es similar entre los grupos de ratas con OID que consumieron la dieta control o que continuaron el consumo de una HFD+5% de sacarosa y 5% de nopal, mientras que en el caso de las ratas con OID que consumieron la dieta control con 5% de nopal, son muy similares al grupo control, es decir, el consumo del nopal revierte significativamente la hipertrofia del tejido adiposo. Este comportamiento es similar en el tejido adiposo subcutáneo (Figura 16), sin embargo, en este tejido la hipertrofia no es tan evidente como en el caso del visceral.

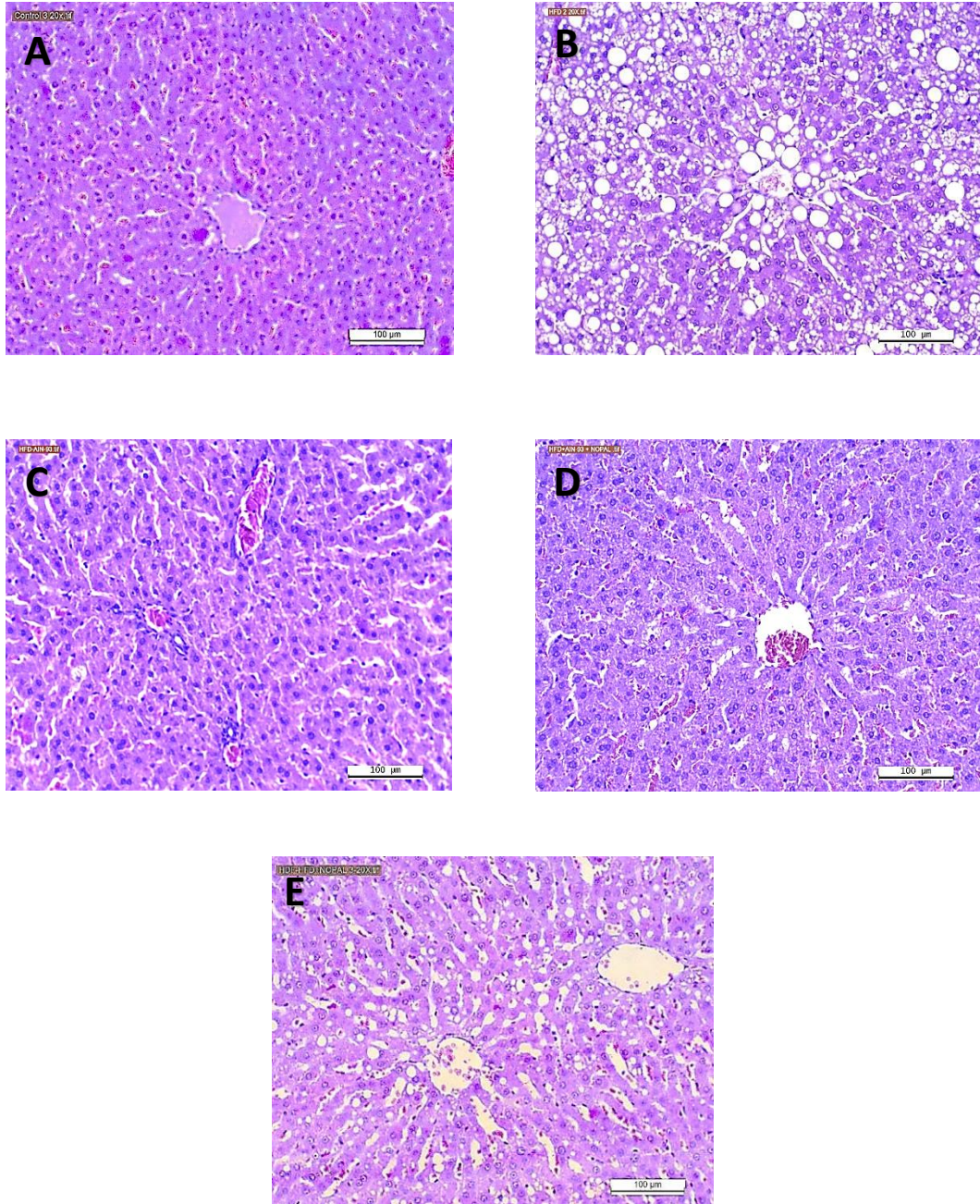


Figura 13. Cortes histológicos de hígado, con un aumento de 20X, tinción HE .A) C (AIN-93), B) HFD+ 5%S, C) HFD+C, D) HFD+C+5%N y E) HFD+5%S+5%N

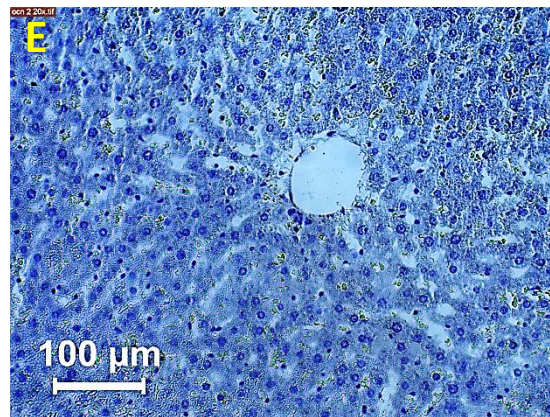
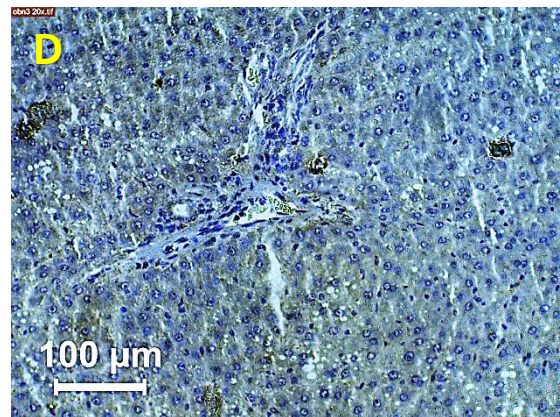
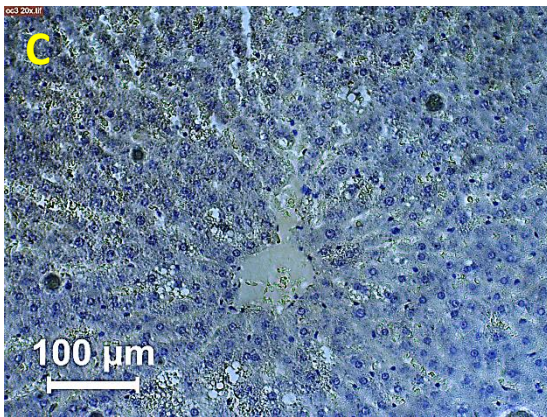
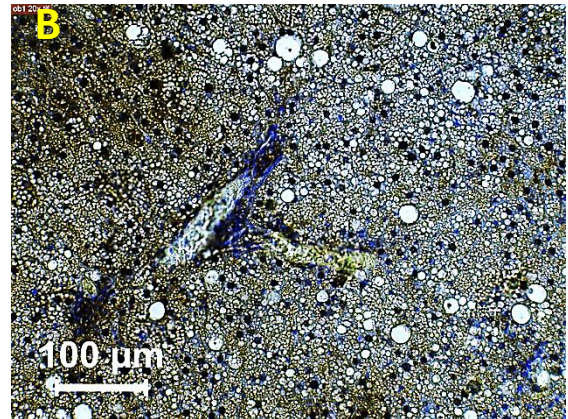
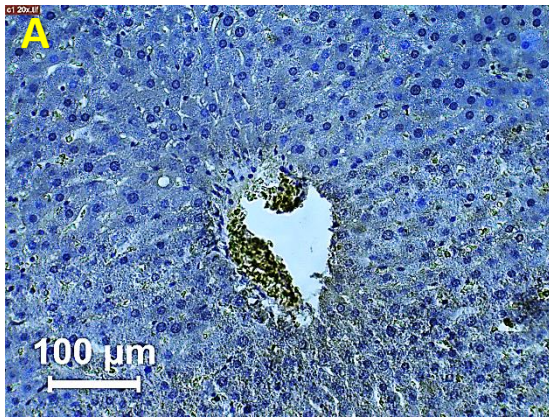


Figura 14. Inmunohistoquímica de hígado vs TNF- α , con un aumento de 20X.
A) C (AIN-93), B) HFD+ 5%S, C) HFD+C, D) HFD+C+5%N y E) HFD+5%S+5%N

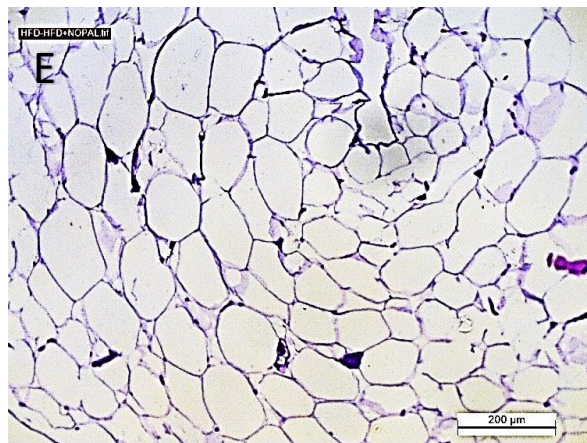
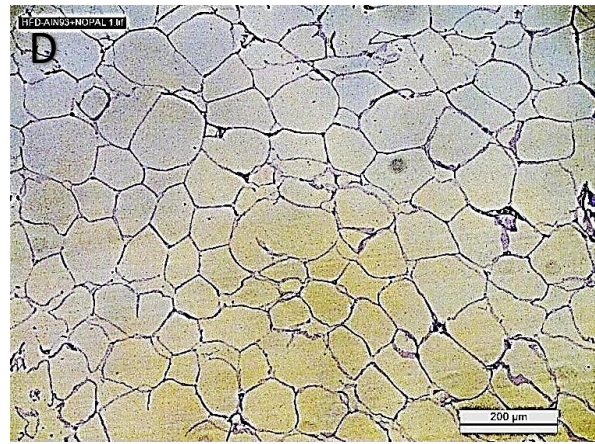
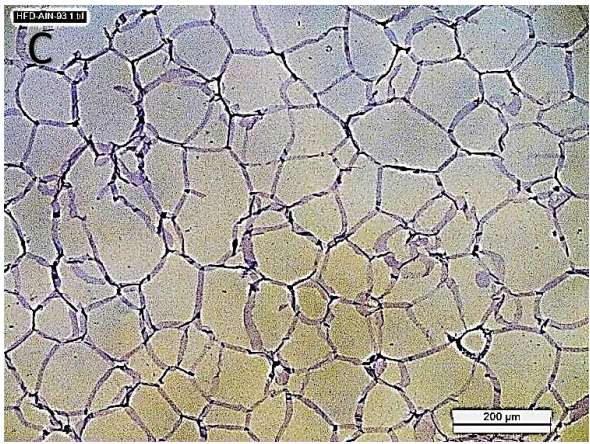
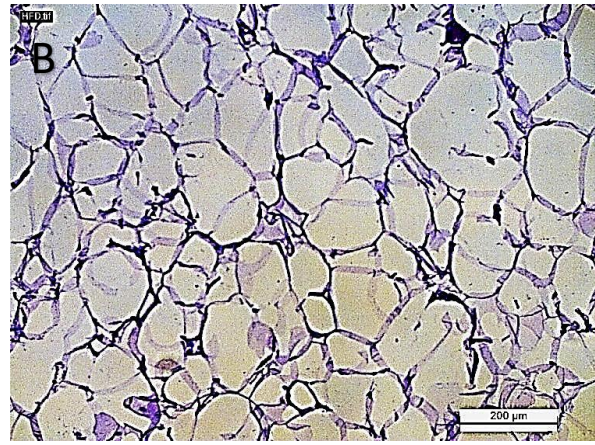
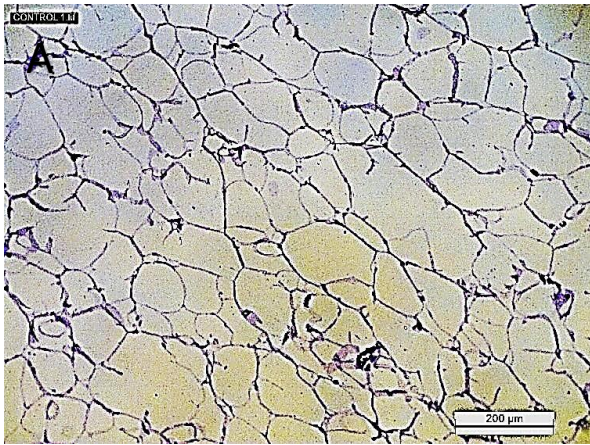


Figura 15 A-E. Cortes histológicos de tejido adiposo visceral, con un aumento de 20X.
A) C (AIN-93), B) HFD+ 5%S, C) HFD+C, D) HFD+C+5%N y E) HFD+5%S+5%N

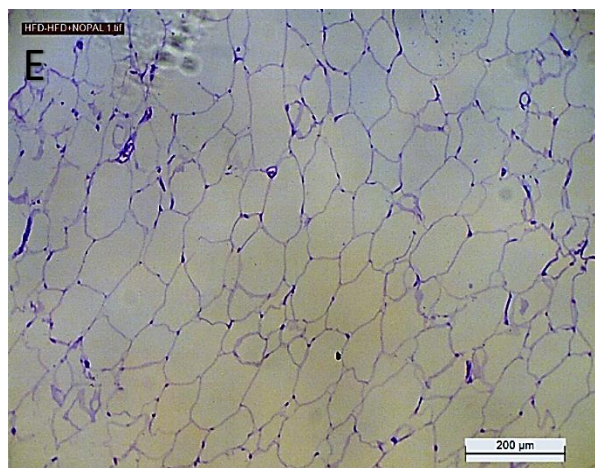
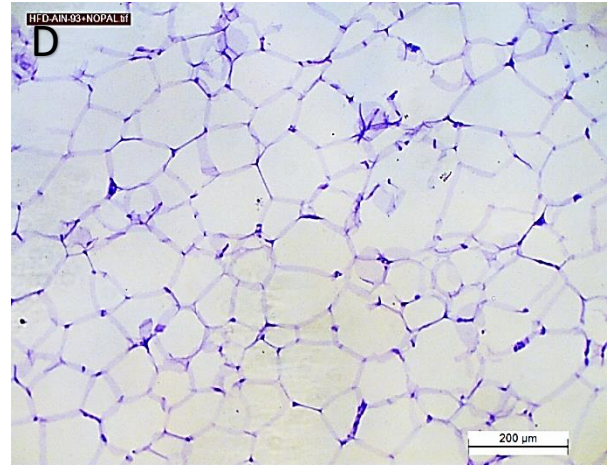
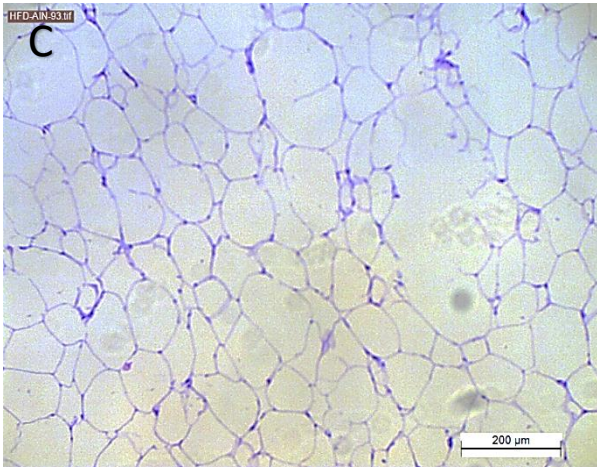
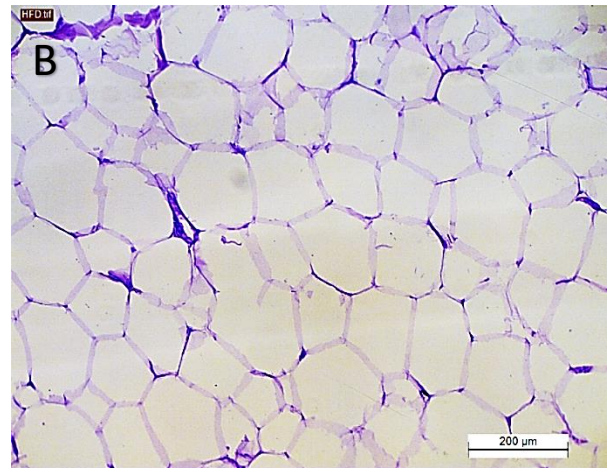
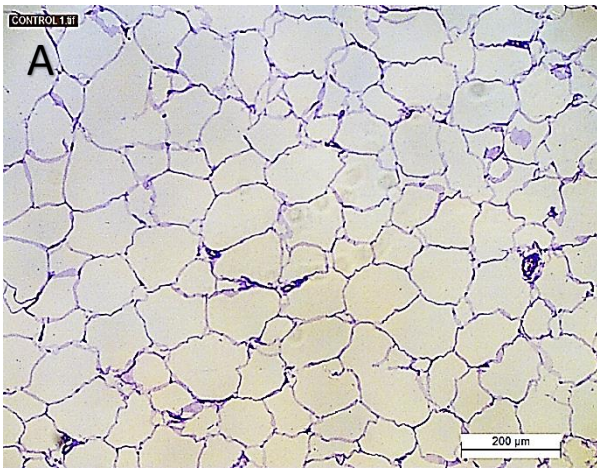


Figura 16 A-E. Cortes histológicos de tejido adiposo subcutáneo, con un aumento de 20X. A) C (AIN-93), B) HFD+ 5%S, C) HFD+C, D) HFD+C+5%N y E) HFD+5%S+5%N

IX. Caracterización de la microbiota intestinal

A. Extracción de DNA a partir de muestras fecales

Se tomaron dos muestras de heces a las ratas Wistar después de ser alimentadas con dieta control (AIN-93) o dieta alta en grasa saturada y sacarosa en el agua de bebida al 5% (7 meses de inducción a obesidad) y otra muestra posterior al consumo de las dietas con o sin nopal durante un mes. La extracción se realizó mediante el uso de columnas de QIAGEN® usando el QIAamp DNA Mini Kit Stool con número de catálogo 51504. Se verificó las relaciones 260/280 y 260/230 en nanodrop, para asegurar la ausencia de contaminación con proteínas o sales, dichas relaciones fueron altas lo cual nos indica que las muestras aisladas presentan un alto grado de pureza y pueden ser empleadas en técnicas como qPCR o secuenciación masiva. Por otro lado se verificó la integridad del DNA obtenido para asegurar que este no estuviera degradado

B. Determinación de la composición de la microbiota intestinal, antes y después del consumo de nopal en un modelo de OID por qPCR

Después de realizar los rangos dinámicos de cada uno de los primers y verificar que el primer universal (basado en la región constante del gen 16S rRNA) era óptimo para ser usado como referencia. Se preparó una dilución con una concentración de 1.2 ng/μL para analizar las muestras por qPCR y se hicieron tres ensayos independientes y en cada uno se analizaron las muestras por triplicado. Se determinó la abundancia relativa los diferentes *Phyla* así como de los diferentes microorganismos de interés con el método de Paffal, posterior a un periodo de inducción a obesidad de 7 meses (figura 17) y se aprecia una disbiosis en el grupo obeso, ya que existe una disminución de

los *Bacteroidetes* (38.4%), *Verrucomicrobia* (4.3%) y *Actinobacteria* (5.3%), en contraste con un aumento en los *Firmicutes* (52%), en comparación con el grupo control, cuya composición es de *Bacteroidetes* (56%), *Verrucomicrobia* (7.1%), *Actinobacteria* (8.1%) y *Firmicutes* (29.4%).

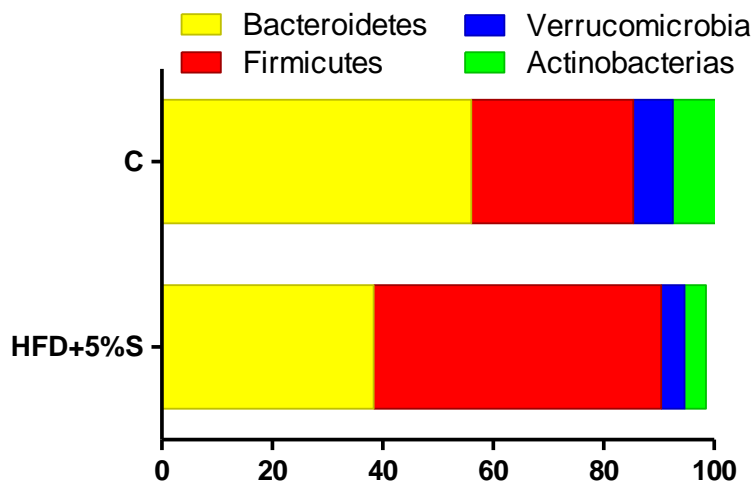


Figura 17. Determinación de los principales *Phylum* de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 20% (control) o una dieta alta en grasa y azúcar en el agua, durante 7 meses.

Por otro lado, también se determinaron algunos géneros o especies en específico, considerando la composición química del nopal. En la figura 18 se presentan los resultados obtenidos (Figura 18), en la que se puede apreciar que durante la obesidad hay un decremento importante en la abundancia de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como en las especies *Akkermancia muciniphila* y *Bacillus tethaiotaomicron*

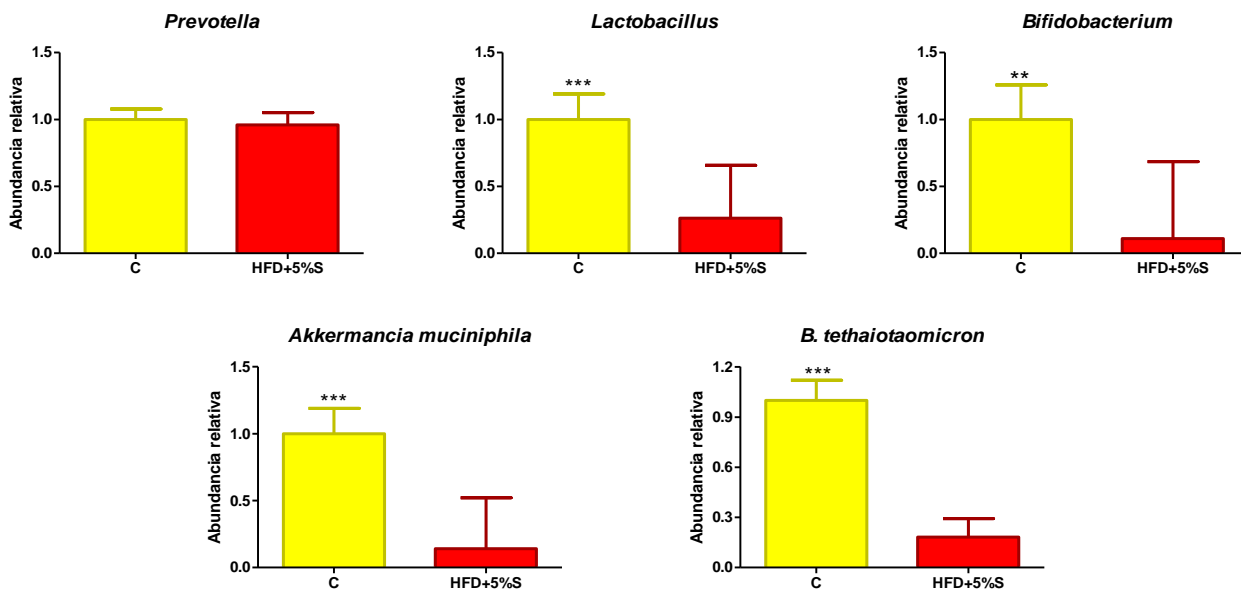


Figura 18. Determinación de algunos géneros y especies de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta control o una HFD+5%S, durante 7 meses.

También se determinó la abundancia relativa de los diferentes *Phylum* y microorganismos de interés en los grupos experimentales con el método de Paffal, posterior a un mes de la inclusión de nopal en la dieta. En las figuras 19 y 20 se observan los resultados obtenidos, como se puede apreciar el grupo obeso continua teniendo el mismo patrón descrito en la gráfica anterior, sin embargo, el grupo que complemento con 5% de nopal en la dieta (HFD+5%S+5%N), se ve modificada la composición por *Phylum* de la microbiota intestinal, conteniendo un 42.2% de *Bacteroidetes*, 29.2% de *Firmicutes*, 14.4% de *Actinobacterias* y 14.2% de *Verrucomicrobia* (Figura 19). Mientras que con el consumo de una dieta control lo porcentajes de los principales *Phylum* son 45.5% de *Bacteroidetes*, 43.5% de *Firmicutes*, 7% de *Actinobacterias* y 4.4% de *Verrucomicrobia*. Finalmente, al combinar una dieta control con 5% de nopal en la dieta el porcentaje de *Bacteroidetes* es similar al control (58%), los *Firmicutes* se ven notoriamente disminuidos, hasta el 12.3%, mientras que hay un incremento importante en las *Actinobacterias* y *Verrucomicrobia*, 14.1% y 15.8%, respectivamente

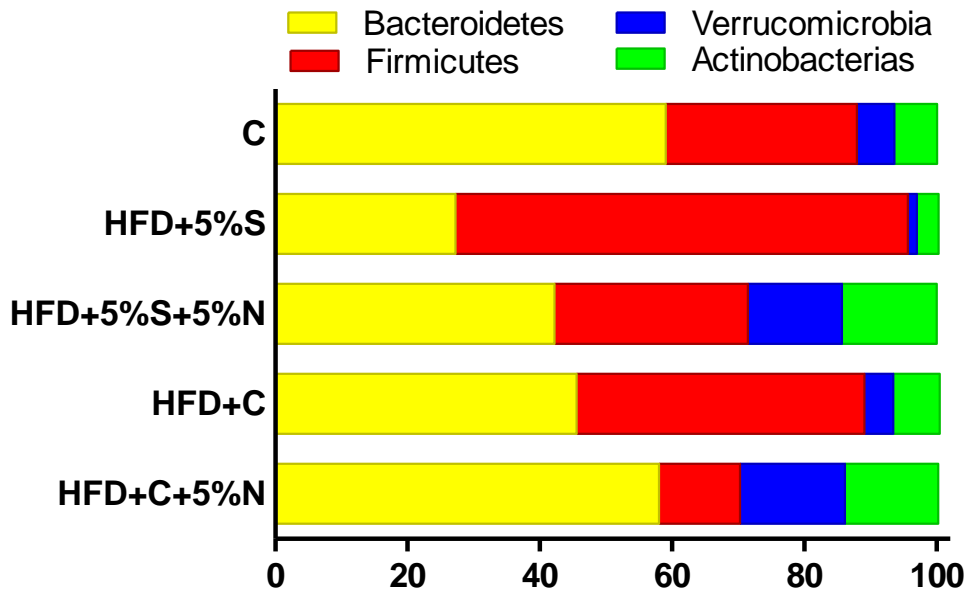


Figura 19. Determinación de los principales *Phylum* de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin nopal (5%) durante un mes usando qPCR.

Se determinaron algunos géneros o especies, a continuación se presentan los resultados obtenidos (Figura 20), donde se puede apreciar que con el consumo de 5% de nopal genera un incremento importante en la abundancia de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como en las especies *Akkermancia muciniphila* y *B. tethaiotaomicron*, siendo este aun mayor al combinar una dieta control con el nopal

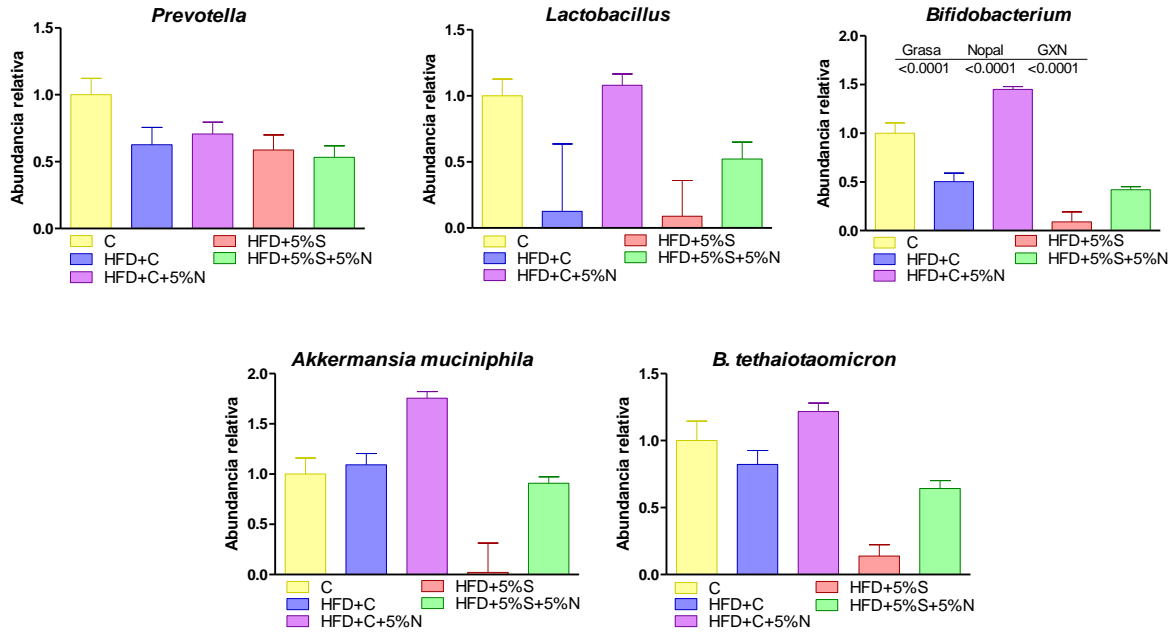


Figura 20. Determinación de algunos géneros y especies mediante qPCR de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes

C. Secuenciamiento por síntesis de la microbiota intestinal utilizando la plataforma MiSeq de Illumina

De la secuenciación por síntesis en la plataforma MiSeq Illumina se obtuvieron 350 787 secuencias (25056 ± 16977 por muestra) con una longitud media de 459 ± 1 pb. Las lecturas fueron asignadas a las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de novo con la paquetería de QIIME V.1.9. De esta manera, usando la comparación de las OTUs con QIIME contra la base de datos Greengenes, el 95.7% de las lecturas fueron asignadas al nivel de *phylum*, 90.3% a clase, 84.0% a orden, 79.1% a familia y 59.1% a género. Respecto a las abundancias de OTUs, que se calcularon, incluyen matrices de abundancia en diferentes niveles taxonómicos. Para comparar las diferentes muestras, se hizo el corte en 3 875 lecturas basándose en el mínimo de la suma de las abundancias de los taxones en RV.3.0.1. La diversidad alfa sirve para estimar la riqueza de especies y para ello se determinó el índice chao-1, el cual sugiere que existe una mayor alfa diversidad en el grupo HFD+C+5%N, ya que el número de

OTUs observado fue mayor (492 ± 88.7), mientras que el grupo HFD+5%S tuvo menor alfa diversidad ($363 \pm 0,43$). Sin embargo, estos valores no fueron significativos estadísticamente (Figura 21). También se realizó el análisis de la curva de rarefacción que indica mayor riqueza de especies en el grupo que consumió una dieta control con 5% de nopal con respecto a demás grupos. Para análisis de la composición de la microbiota, basado por secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA, se hizo un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac unweighted, el cual mostro que el consumo de nopal cambia la composición de la microbiota, respecto a los animales que fueron alimentados con HFD+5%S o con dieta control (ANOSIM $r=0.38$, $p=0.009$) lo que sugiere una diferencia de la distribución de las poblaciones microbianas (Figura 22). A nivel *Phylum*, la proporción de *Bacteroidetes/Firmicutes* tuvo un modesto cambio en las ratas obesas con respecto a los alimentados con la dieta C. A nivel de género, las ratas alimentadas con HFD+5%S tuvieron una disminución de la abundancia relativa de *Streptococcus* ($0.003 \pm 0.002\%$) comparándolas con el grupo C ($0.18 \pm 0.04\%$) ($p < 0.001$). Además, hubo un aumento significativo en la abundancia relativa de *Faecalibacterium* en el grupo HFD+5%S ($4.40 \pm 0.85\%$) en comparación con el grupo C ($0.03 \pm 0.02\%$) ($p = 0.001$).

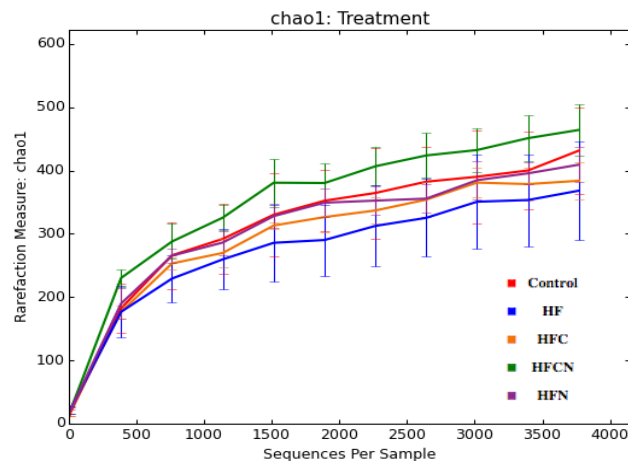


Figura 21. Determinación de la alfa diversidad mediante el índice chao1 de la microbiota intestinal de ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes, secuenciadas en la plataforma MiSeq

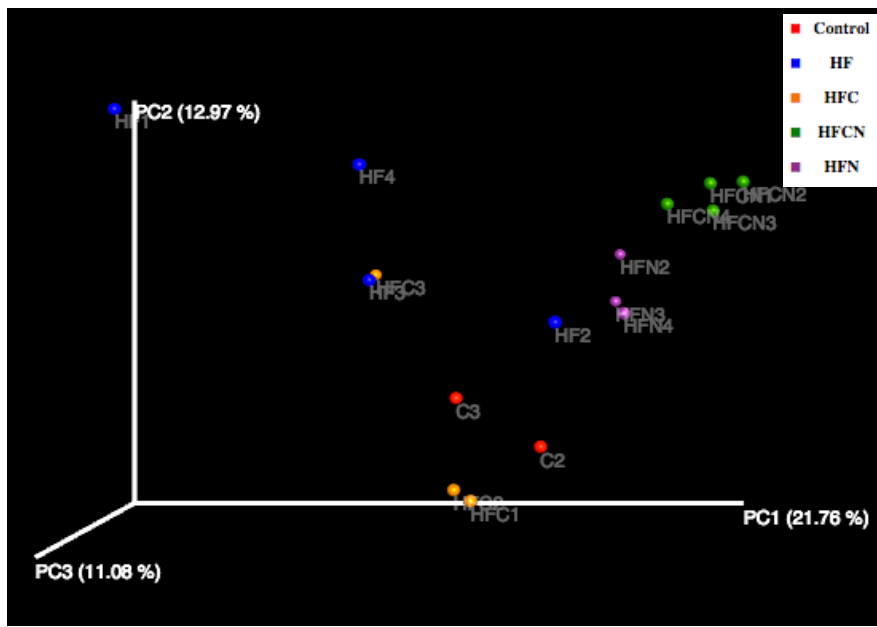


Figura 22. Determinación de la beta diversidad, mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes

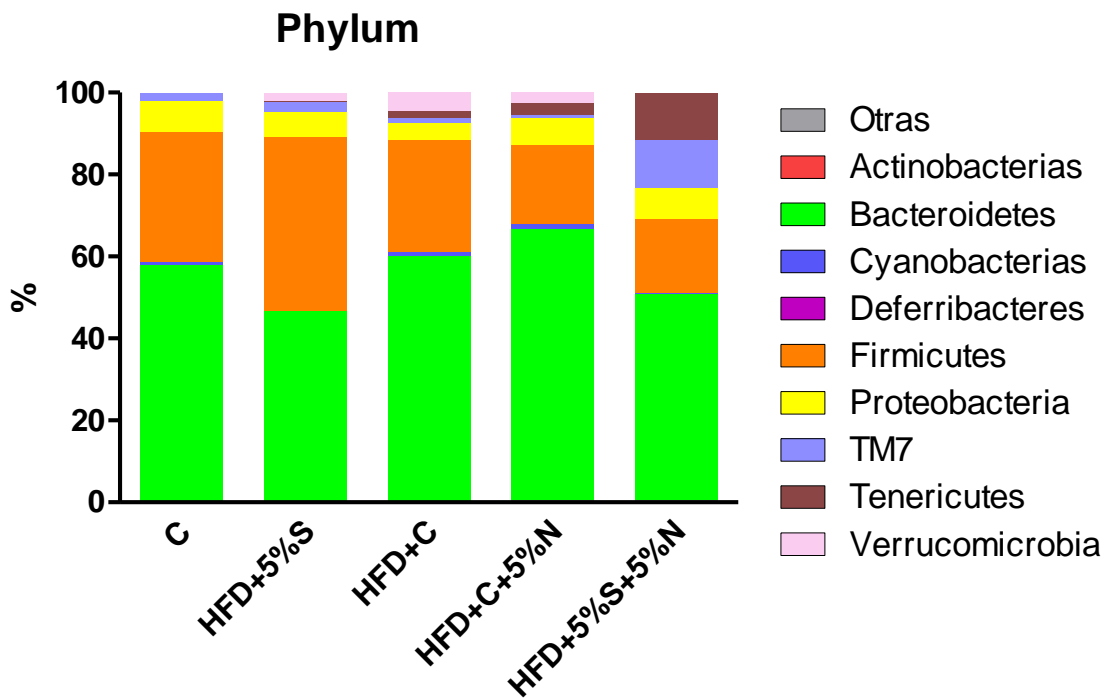


Figura 23. Determinación de los Phylum mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes

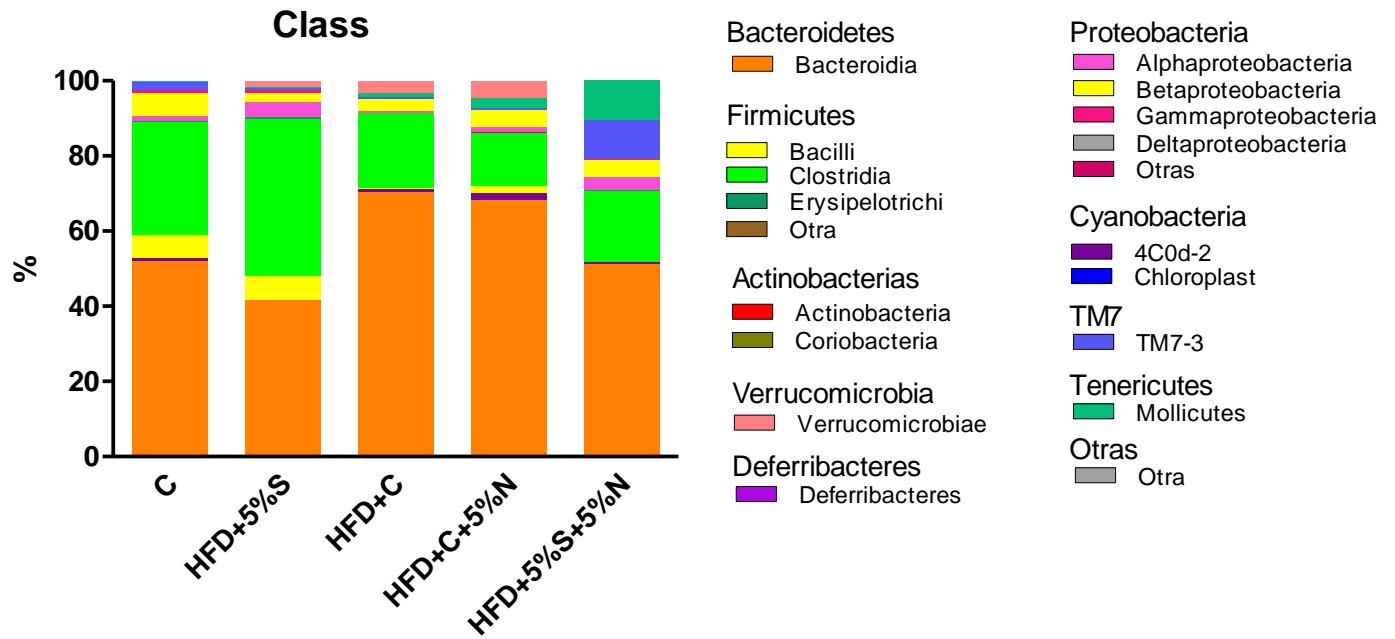


Figura 24. Determinación de las clases mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes

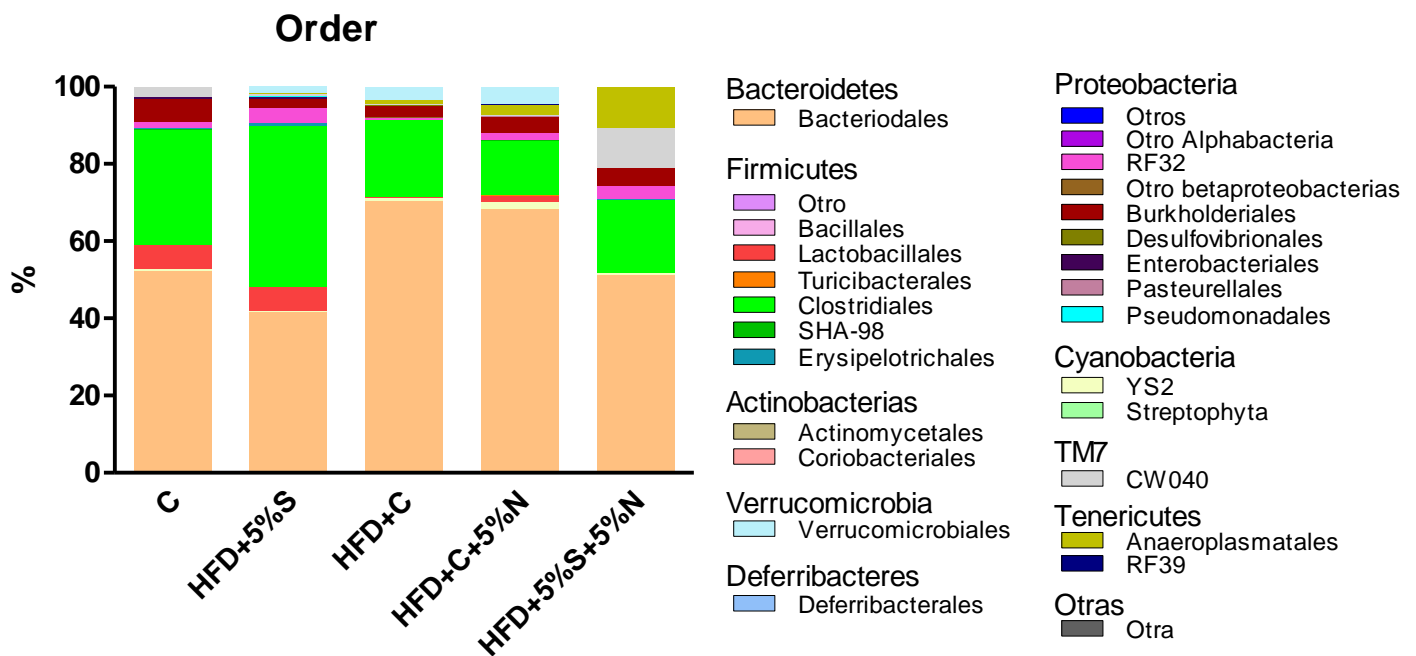


Figura 25. Determinación de los órdenes mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes

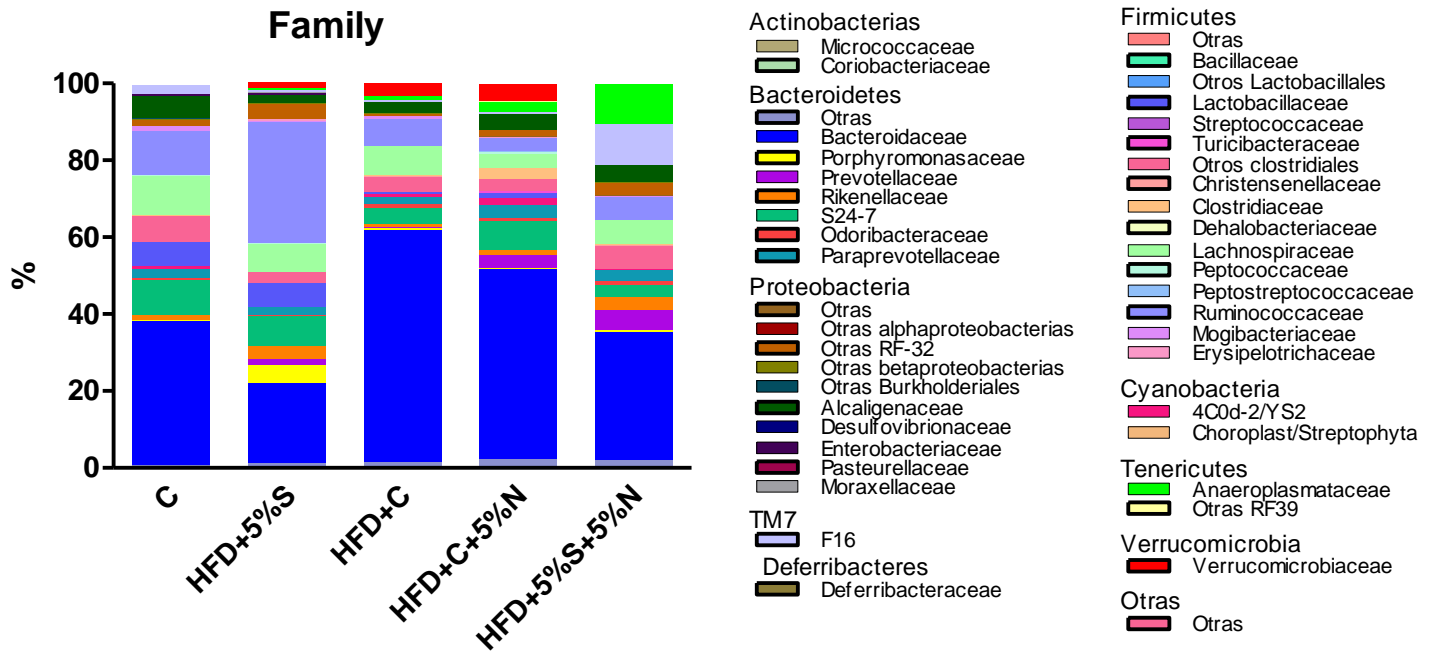


Figura 26. Determinación de las principales familias mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes

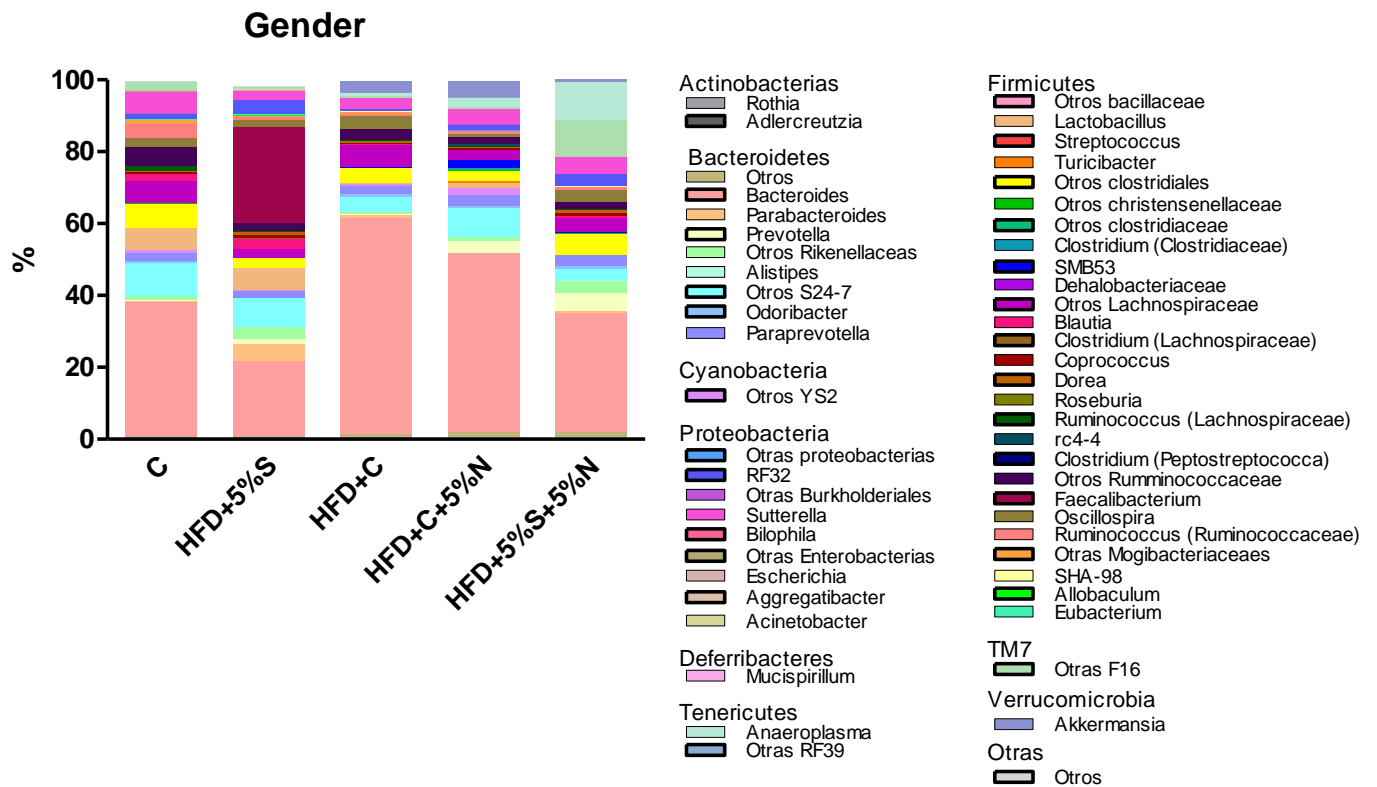


Figura 27. Determinación de los generos mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con o sin 5% de nopal durante un mes

DISCUSIÓN

En las últimas décadas estamos viviendo un incremento espectacular de la prevalencia de enfermedades metabólicas en los países desarrollados o en vías de desarrollo, la obesidad está a la cabeza de este incremento. Factores ambientales como el alza de la ingesta calórica y la reducción de la actividad física han sido considerados las causas de la alza en la prevalencia de obesidad y enfermedades metabólicas, sin embargo no parece que desde el año 1990 a la actualidad se haya seguido incrementando la ingesta calórica y sin embargo el crecimiento de la prevalencia de obesidad sigue siendo exponencial, por tanto se ha pensado en otros factores ambientales que puedan explicar este incremento y entre estas causas se encuentra la microbiota intestinal (Ussar *et al.*, 2015).

Actualmente, la microbiota se define como un ecosistema abierto que comprende una amplia variedad de poblaciones microbianas metabólicamente activas que coexisten en una región espacio temporal definida y que juegan un papel en la salud del huésped (Markowitz y Bengmark, 2002). Estas bacterias en conjunto pueden ser consideradas como un órgano metabólico con una actividad semejante a la del hígado y que además, tiene las propiedades de ser adaptable y rápidamente renovable (Kinross *et al.*, 2008). La microbiota, tiene una gran cantidad de células, la cual es aproximadamente diez veces mayor que las que están presentes en los seres humanos y su genoma, es decir, el microbioma, es aproximadamente 100 veces el genoma humano.

En el nacimiento, el microbioma está implicado en la programación y control de muchas funciones fisiológicas como el desarrollo del epitelio intestinal, la circulación de sangre vascular, los mecanismos innatos y adaptativos, entre otros. Por consiguiente, los ratones libres de gérmenes (ratones axénicos) son caracterizados por tener muchos rasgos fisiológicos anómalos (Turnbaugh *et al.*, 2006). Hoy en día se plantea que la microbiota puede contribuir a la regulación de la homeostasis energética. Junto con las vulnerabilidades ambientales, la microbiota intestinal podría provocar el desarrollo de una discapacidad en la homeostasis energética causando enfermedades metabólicas. Se ha asociado la patología de la obesidad con una disbiosis intestinal, es decir, un desbalance en la composición de la microbiota (Backhed *et al.*, 2004). Estudios

recientes, en los cuales se han realizado análisis metagenómicos, han determinado que existen notables diferencias entre la microbiota de individuos delgados y obesos, dichas diferencias se asocian a una menor diversidad microbiológica intestinal en los sujetos obesos. Además, estos individuos poseen una microbiota con mayor capacidad para recuperar energía de la dieta y/o que participa en el desarrollo de un estado de inflamación crónica de grado bajo en el organismo (Blaut, 2015). Por lo que se sugiere que el empleo de prebióticos y probióticos podría ser una estrategia eficaz para la modulación de la microbiota intestinal, con el fin de reducir factores asociados a obesidad y otras enfermedades crónico-degenerativas (Brownawell *et al.*, 2012; Kolida *et al.* 2011).

Por otro lado se ha demostrado que existen alimentos denominados funcionales, que pueden conferir beneficios a la salud, dentro de estos alimentos se encuentran los prebióticos (Arai, 1996; Alvidrez *et al.*, 2002; Shi y Mazza, 2002) que son definidos como ingredientes selectivamente fermentados que resultan en cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal y que confiere beneficios para el huésped (Gibson *et al.*, 2011), por su composición química (Medina-Torres *et al.*, 2011) y estudios previos en el laboratorio han demostrado que el nopal puede ser considerado un alimento funcional (Moran-Ramos *et al.*, 2012; Lopez-Romero *et al.*, 2014); por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del consumo de nopal sobre la composición de la microbiota intestinal en un modelo de obesidad inducido por dieta. Para ello se usaron ratas Wistar macho, para evitar interferencia del ciclo estral y debido a que esta cepa no presenta resistencia a la obesidad, a diferencia de la cepa Sprague Dawley (Mercer y Archer, 2005). El modelo fue de obesidad inducida por dieta, ya que es más parecido a lo que sucede en la actualidad, un consumo excesivo de calorías provenientes de grasas saturadas y carbohidratos, por esto último, se decidió agregar el 5% de sacarosa en el agua de bebida.

En el presente estudio, para determinar que se logró establecer un modelo animal de obesidad inducida por dieta, después del periodo de inducción a obesidad (7 meses) el grupo alimentado con una dieta alta en grasa sacarosa al 5% en el agua de bebida, se hicieron diferentes pruebas de descriptores bioquímicos y metabólicos, en ellos el grupo HFD+5%S mostro alteraciones severas en glucosa, triglicéridos, colesterol total y

colesterol LDL, medidos en suero. Además el grupo obeso mostró un incremento en la ganancia del peso corporal del 30.9% respecto al grupo control, siendo este incremento no relacionado con la cantidad de calorías consumidas, es decir, que tiene un mayor impacto el origen de las calorías que la cantidad de calorías en sí. Por otro lado se evaluó la tolerancia a la glucosa, la cual se vio seriamente afectada en el grupo obeso, resultado que concuerda con lo encontrado al evaluar el cociente respiratorio. Estos resultados sugieren que el modelo usado es un modelo de obesidad y síndrome metabólico eficiente.

En diversos estudios se ha demostrado que el consumo de fibra soluble e insoluble, fitoesteroles, antioxidantes y otros compuestos bioactivos, pueden mejorar diversos parámetros bioquímicos asociados a enfermedades crónico-degenerativas como diabetes, dislipidemias, problemas cardiovasculares, neuropatías y trastornos renales (Bravo, 1998; Brown *et al.*, 2015), en el presente estudio se observó una disminución significativa en suero en glucosa, triglicéridos y colesterol total y LDL con el consumo de nopal (HFD+5%S+5%N), siendo aun mayor esta disminución al consumir una dieta balanceada y nopal (HFD+C+5%N) logrando reestablecer los valores de dichos parámetros a los valores cercanos a los normales y con ello disminuir el riesgo de enfermedades asociadas a estos marcadores bioquímicos (Neyrinck *et al.*, 2013).

Por otro lado, la intolerancia a la glucosa también es conocida como pre-diabetes ya que produce un trastorno que afecta a la producción y el abastecimiento de insulina por lo que la glucosa que hay en la sangre no se absorbe correctamente y los niveles de azúcar permanecen muy por encima de lo que deberían estar, esto se puede evaluar con una curva de tolerancia a la glucosa, el modelo de obesidad establecido muestra esta condición de intolerancia a la glucosa que correlaciona con los niveles séricos de glucosa e insulina, sin embargo, el consumo de alimentos funcionales como el nopal que tiene una propiedad antihiper glucemiente, es capaz de mejorar dicha condición, aun cuando existe un consumo de una dieta alta en grasa (HFD+5%S+5%N) y si el consumo del nopal se conjunta con un dieta balanceada (HFD+C+5%N) se puede lograr retornar a una CTG normal o por debajo de la normal, es decir recuperar la tolerancia a la glucosa. Estos resultados en conjunto con lo encontrado en la calorimetría indirecta, donde se midió el cociente respiratorio y se observó que el grupo

obeso (HFD+5%S) muestra una inflexibilidad metabólica, es decir, es incapaz de hacer un recambio de sustrato y todo el tiempo oxida lípidos, sin embargo, cuando se cambia a una dieta balanceada con o sin nopal (HFD+C o HFD+C+5%N), se recupera esta flexibilidad metabólica, volviendo a oxidar lípidos durante el ayuno y carbohidratos después de la ingesta de alimentos; sin embargo el hallazgo más interesante está en el grupo HFD+5%S+5%N, ya que este grupo, a pesar de que continua consumiendo grasa y azúcar en el agua de bebida, muestra una mejoría en la flexibilidad metabólica, ya que aunque no la recupera 100% el RER sube de manera tardía alrededor de 0.85, lo que sugiere que se está usando una mezcla de sustratos (carbohidratos y lípidos), estos resultados son corroborados con lo obtenido al medir el VO_2 , en este parámetro, se puede apreciar como los grupos que incluyeron nopal en la dieta (HFD+5%S+5%N y HFD+C+5%N), tienen mayor capacidad de oxidación, siendo metabólicamente más eficientes, estos resultados son importantes ya que con la inclusión del nopal en la dieta, los sujetos obesos podrían utilizar de manera adecuada los carbohidratos de la dieta y no se almacenarían en tejido adiposo, disminuyendo la obesidad

Para evaluar de manera más profunda el metabolismo de lípidos se estudiaron en el hígado genes involucrados en la lipogénesis (SREBP-1, ACC y FAS) y genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos (PPAR- α y CPT-1). Respecto a la lipogénesis, se observó una sobreexpresión de estos genes durante la obesidad, sin embargo al incluir el nopal en la dieta esta expresión se ve disminuida significativamente, lo cual puede deberse al alto contenido en fibra de este alimento, dicha disminución fue significativa estadísticamente, tanto en SREBP-1 como en sus genes blanco ACC y FAS. Por otro lado, los genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos PPAR- α y CPT-1 tendieron a disminuir durante la obesidad y al incluir al nopal en la dieta estos aumentaron su expresión, aunque esto no fue significativo estadísticamente aunque la tendencia es bastante clara que sugiere que los animales que consumieron nopal tienen una mayor capacidad de oxidar lípidos (Michalik *et al.*, 2002). Estos resultados en conjunto sugieren que el consumo de nopal en la dieta, mejora de manera importante el metabolismo de lípidos en el hígado, de este modo, como se observa en los cortes histológicos hay una disminución en la acumulación de lípidos en el hígado, al disminuir el número y el tamaño de estas vacuolas de grasa, así

como la inflamación del hígado (inmunohistoquímica vs TNF- α), lo cual representa un beneficio importante al disminuir la esteatosis en un modelo de obesidad inducida por dieta (Moran-Ramos *et al.*, 2012) y las posibles complicaciones que esto conlleva como lo son el desarrollo de NASH, cirrosis e incluso hepatocarcinoma. Estos resultados pueden ser producto de una disbiosis, ya que se ha relacionado a una mayor acumulación de colesterol y una alteración en el metabolismo de lípidos en el hígado (Hu *et al.*, 2015)

En lo que respecta al estrés del RE, el exceso de almacenamiento de lípidos parece causar alteraciones funcionales del retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, que son fundamentales para los efectos fisiopatológicos de la obesidad. El RE es responsable de la síntesis de proteínas, la formación de gotas de lípidos y la detección y regulación de colesterol; las tres vías responden a cambios en la oferta nutricional. Siguiendo la traducción de proteínas de mRNA en el RE, cada proteína naciente debe ser plegada en su correcta configuración funcional y empaquetada en el aparato de Golgi para su uso en procesos celulares metabólicos y de regulación. Las proteínas "chaperonas" guían a las nuevas proteínas sintetizadas y son esenciales para la correcta síntesis, plegamiento y empaquetado. El RE también regula activamente el almacenamiento de lípidos, incluyendo la modulación de la absorción de ácidos grasos, almacenaje de ácidos grasos como triglicéridos, y la agrupación de triglicéridos en gotas de lípidos que sirven como almacén de energía para la síntesis de fosfolípidos. El RE está también relacionado con la detección de colesterol. Por ejemplo, el RE libera las proteínas enlazantes de elementos de regulación de esterol (SREBPs) en respuesta a las concentraciones de insulina y bajo esterol; las SREBPs activan la síntesis de colesterol y lípidos, y reducen la actividad en estados de resistencia a la insulina. En modelos animales de exceso de oferta de nutrientes e hipertrofia del adipocito, se ha descrito una situación de "estrés" del RE. El estrés del RE se refiere a una condición celular presente cuando la función del organelo es perturbada, de manera que el correcto plegamiento y modificación de proteínas, creación de gotas de lípidos y/o detección de colesterol, está inhibido. Así, en estados de desequilibrio energético y adiposidad, hay una excesiva demanda en el RE que provoca disfunción del plegamiento de proteínas, creación de gotas de lípidos y detección de colesterol. Las

manifestaciones de estrés del RE en el adipocito incluyen el incremento en las concentraciones de lactato y la producción de la proteína homóloga C/EBP (CHOP). En modelos de ratón, CHOP disminuye la producción de adiponectina e interfiere con el mRNA de CHOP que contrarresta este descenso en adiponectina. El desequilibrio energético crónico produce estrés del retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial e hipertrofia e hiperplasia del adipocito, como se observó en los cortes histológicos. Este proceso deja una liberación intracelular y sistémica incrementada de adipocinas, ácidos grasos libres y mediadores inflamatorios que causan disfunción del adipocito e inducen efectos adversos en las células hepáticas, pancreáticas y del músculo esquelético, además de los lechos cardiaco y vascular. Sin embargo, los resultados sugieren que el consumo del nopal puede impactar de manera positiva en la secreción de adiponectina, así como en la disminución del estrés del RE y finalmente hacer que se aminore de manera considerable la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos además del daño hepático se ve disminuido ya que disminuye la acumulación de vacuolas de grasa

Por otro lado, el tejido adiposo es un órgano endocrino que produce hormonas como la leptina, la adiponectina y la resistina. Durante la obesidad, existe una sobre secreción de leptina y resistina, mientras que los niveles plasmáticos de adiponectina se reducen notablemente, todos estos cambios tiene un impacto negativo sobre la señalización de la insulina (Roumaud y Martin, 2015), lo cual como ya se mencionó, se observó en la CTG. Sin embargo estos marcadores mejoran al incluir 5% de nopal en la dieta.

Todas estas mejoras metabólicas que se observan al incluir el nopal en la dieta pueden atribuirse en gran medida a que por su composición química del nopal, este sea capaz de modificar la microbiota intestinal, y al cambiar el fenotipo se mejoren las condiciones asociadas a la génesis de enfermedades metabólicas y obesidad. El primer hallazgo en relación con la microbiota, asociado a obesidad que se reporto fue el hecho de que ratones con mutación del gen leptina y por lo tanto genéticamente obesos tenían una microbiota diferentes a aquellos ratones que no tenían esa mutación. En estos modelos animales de obesidad, la interacción entre los filos intestinales dominantes, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, se modifica con una reducción significativa del primero y un correspondiente aumento del segundo (Ley *et al.*, 2005). Esta misma tendencia se observó en humanos cuando se comparan obesos con delgados, un incremento del

cociente *Firmicutes/Bacteroidetes* (Turnbaugh *et al.*, 2009). Este fenotipo también se observó en el grupo que consumió una HFD+5%S y al incluir el 5% de nopal en la dieta esta relación *Firmicutes/Bacteroidetes* disminuyó de manera significativa, lo que nos indica que el alto contenido de fibra y los polifenoles que contiene el nopal, son capaces de modificar de manera benéfica el fenotipo microbiano ya que el cambio observado en la relativa abundancia de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* da como resultado una mayor capacidad de obtener energía de los alimentos y produce inflamación de bajo grado (Turnbaugh *et al.*, 2008). El incremento de *Firmicutes* observado en animales y sujetos obesos se podría asociar con un aumento en la capacidad para digerir algunos polisacáridos indigeribles produciéndose tras su actuación monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (SCFA) capaces de ser absorbidos por el huésped obteniendo finalmente energía de sustancias que se eliminarían por las heces sin ser absorbidas (Fava *et al.*, 2013; Samuel *et al.*, 2008). Además en la digestión del almidón en el intestino se produce H₂ cuyo incremento inhibe la digestión, las *Archea* metanogénicas son capaces de transformar el hidrógeno en metano. Por lo tanto, existe una microbiota específica que es capaz de obtener más energía de la misma ingesta calórica diaria (Backhed *et al.*, 2004; Turnbaug *et al.*, 2009), lo cual concuerda con el hecho de que al aumentar los *Firmicutes* también se ve un incremento en el peso corporal, a pesar de que teóricamente consumen la misma cantidad de calorías, es decir, posiblemente, el fenotipo del grupo obeso sea capaz de extraer una mayor cantidad de energía de los alimentos, incrementando el peso corporal. Además, también se ha demostrado que la microbiota intestinal podía disminuir la producción del factor adiposo inducido por el ayuno (FIAF-FatInduced Adipocyte Factor) llevada a cabo por las células intestinales las cuales inhibieron la actividad de la lipoprotein lipasa. Estas enzimas favorecen la liberación de ácidos grasos no esterificados hacia los tejidos como el hígado y las células adiposas, lo cual también favorece la expresión de factores involucrados en lipogénesis como SREBP-1 (Goto *et al.*, 2015)

Por otro lado diversos estudios han verificado que la dieta modifica la composición de la microbiota, y también la expresión del metagenoma independientemente del genoma del huésped, como se mostró en los gemelos homocigóticos discordantes para la obesidad (Turnbaugh *et al.*, 2009) o en ratones genéticamente idénticos y alimentados con una dieta alta en grasas (Cani *et al.*, 2007). Estos cambios ocurren

fundamentalmente en la proporción *Firmicutes/Bacteroidetes* produciéndose un descenso de este cociente tras la pérdida de peso, como se observó en los animales suplementados con 5% de nopal en la dieta. Existen también numerosas publicaciones que representan de forma clara que un incremento en la ingesta de grasa produce un incremento en el cociente Gram-/Gram+ de nuestra microbiota (Hur y Lee, 2015), lo cual aunado a la disrupción de la barrera intestinal (Genton *et al.*, 2015), podría generar una endotoxemia metabólica (Cani *et al.*, 2009; Cani *et al.*, 2008; Druat *et al.*, 2014b), esto se observó al medir la concentración sérica del LPS, donde el grupo obeso mostro un incremento importante en este parámetro, sin embargo, al consumir nopal en la dieta, estas concentraciones disminuyen significativamente.

Probablemente el experimento que más solidez le ha dado a la causalidad entre microbiota y obesidad, fue el realizado por el grupo de Gordon en 2006 (Turnbaugh *et al.*, 2006) donde demostraron que el trasplante de la microbiota de ratones genéticamente obesos a ratones libres de gérmenes le provocaba un incremento de peso muy significativo comparado con los ratones libres de gérmenes que se le trasplantaba la microbiota de ratones delgados. Sorprendentemente por tanto, el fenotipo que rentabiliza más la energía es transmisible simplemente por el trasplante de la microbiota obesa en donantes sanos y normopeso (Turnbaugh *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2008; Delzenne *et al.*, 2011a). Algunos autores sugieren que un mayor aprovechamiento de energía en individuos obesos está relacionada con la transferencia de hidrógeno entre taxones ya que observaron un incremento simultáneo en *Prevotella* que produce hidrógeno y en *Archaea* metanogénica que utiliza hidrógeno (Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, en este modelo no se observó esta relación, lo que sugiere que en el modelo desarrollado existen otros taxones responsables de tener una mayor eficiencia en la extracción de energía de los alimentos.

Debemos tener muy presente que dentro de un *Phylum* no todas los géneros tienen el mismo papel, se han empezado a relacionar géneros de bacterias con las características beneficiosas o perjudiciales asociadas a ellas dentro del mismo *Phylum*, un ejemplo de ello es un estudio prospectivo en el que siguieron a 49 niños desde el nacimiento hasta los siete años de edad, donde se tomaron muestras heces a los seis y doce meses de vida y se encontró que los niños que a los siete años eran normopesos tenían en heces un mayor número de *Bifidobacterias* y menor número de

Staphylococcus aureus que los tenían sobrepeso. Concluyen que la alteración de la composición de la flora precede al sobrepeso, lo que puede tener una aplicación en prevención de la obesidad (Kalliomaki *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con lo observado, ya que en el modelo obeso existe una menor cantidad de *Bifidobacterias* y al incluir el nopal en la dieta, estas aumentan, disminuyendo el peso corporal de los animales, lo cual se ha observado con el uso de algunos prebióticos como la inulina y el FOS (Gibson *et al.*, 1995). Además publicaciones recientes asocian que no todas las *Bifidobacterias* o *Lactobacillus* son iguales y pueden tener características diferentes en función de la especie, por ejemplo dentro del género *Lactobacillus*, el *Lactobacillus plantarum* y *paracasei* se ha asociado con delgadez y por el contrario el *Lactobacillus reuteri* se asociaba a la presencia de obesidad (Karlsson, 2013; Wellen y Hotamislegil, 2005).

El incremento en la adiposidad se relaciona de forma directa con la aparición de enfermedades metabólicas. La diabetes tipo 2 es la consecuencia de un aumento de la producción de glucosa en hígado y de un déficit de la secreción y acción de la insulina. Además otras funciones fisiológicas están alteradas entre ellas una secreción deteriorada de hormonas como glucagón e incretinas (GLP-1 y GIP) (Timper, 2013; Duca *et al.*, 2015). Un rasgo común tanto en la obesidad como en la diabetes tipo 2 es la presencia de un componente inflamatorio de bajo grado que se ha descrito con precisión en tejidos directamente involucrados en la regulación del metabolismo como el hígado, el tejido adiposo y músculo (Frazier *et al.*, 2011). Esta inflamación metabólica está caracterizada por un exceso moderado en la producción de citocinas como IL-6, IL-1 o TNF- α que dificultan la interacción de la insulina con su receptor y por ello contribuye a la resistencia a la insulina y a la diabetes (Timper, 2013) . El incremento en el peso parece ser uno de los factores iniciadores de esta inflamación de bajo grado, esto también se ha asociado a la disbiosis intestinal, ya que la disrupción de la barrera en el intestino, puede generar un incremento en la endotoxemia, generando un estado de inflamación crónico (Hena-Mejia *et al.*, 2012). Cuando se produce una hipertrofia del adipocito como respuesta a un exceso en la ingesta calórica se produce un incremento en la producción de TNF- α en el tejido adiposo, como se observó en las ratas obesas, dicha producción estimula a su vez la producción de factores quimiotácticos que hacen que el tejido adiposo se infiltre de macrófagos pro-

inflamatorios que producen un incremento en la producción de IL-6 y IL-1, generando una hipertrofia y un incremento en la resistencia a la acción de la insulina (Geurts *et al.*, 2014), este fenómeno se observó en las ratas obesas; sin embargo al incluir el nopal en la dieta, esto se vio disminuido, esto sugiere que al cambiar el fenotipo microbiano y restaurar la barrera intestinal, disminuye la inflamación y con ello mejora el metabolismo de carbohidratos, lípidos lo cual se ve reflejado en diferentes parámetros bioquímicos séricos.

En experimentos en animales se ha demostrado que cambios en la microbiota son capaces de cambiar el grado de inflamación del tejido adiposo. El tratamiento con antibióticos (ampicilina+ neomicina) a ratones genéticamente obesos sometidos a una dieta rica en grasas modificaron su microbiota y redujeron la resistencia a la insulina y el peso de los animales, además los animales sometidos a tratamiento antibiótico sorprendentemente redujeron el grado inflamación de su tejido adiposo así como el estrés oxidativo y la infiltración de macrófagos del mismo. Numerosos trabajos en humanos han encontrado cambios en la microbiota de sujetos con diabetes o resistencia a la insulina comparados con sujetos sin alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado (Druart *et al.*, 2015; Qin, J., 2012). Además, tratamientos probióticos (Amar *et al.*, 2011) y prebióticos (Cani *et al.*, 2007) han demostrado modificar la microbiota intestinal y modificar el metabolismo hidrocarbonado. A continuación se explica el posible mecanismo.

Los LPS son un componente de la pared celular de las bacterias Gram⁻, se ha observado que se produce un incremento en los niveles de LPS circulantes en sujetos que tienen un incremento en la ingesta de grasas. Se encontraron resultados similares en ratones (Cani y Everard, 2015) y ratones mutantes, como los ratones deficientes en leptina, incluso alimentándose de una dieta normal, lo que sugiere que ante determinadas situaciones se produce o un cambio en la proporción de bacterias Gram negativas en el intestino o un cambio en la permeabilidad intestinal para que los LPS se incrementen en suero como se observó en el modelo desarrollado y este incremento en suero se relaciona de forma directa con el grado de resistencia a la insulina, al aumentar significativamente los niveles de glucosa e insulina en suero, así como el ABC de la CTG. Se ha demostrado que los LPS se absorben por el enterocito y son vehiculados en plasma fundamentalmente unidos a los quilomicrones (Clemente-

Postigo *et al.*, 2012). El papel causal de los LPS ha sido demostrado ya que al infundir LPS en ratones alimentados como más sólidos en la literatura, con una dieta normal se inducía resistencia a la insulina a nivel hepático, intolerancia a la glucosa, y un incremento en el peso del tejido adiposo (Yanay *et al.*, 2015). El LPS se une al receptor CD14/TLR4 presente en los macrófagos y se produce un incremento en la producción de moléculas proinflamatorias, cuando las inyecciones de LPS se administraron a ratones con ausencia genética del receptor CD14/TLR4 no provocaron estas características metabólicas y no presentaron diabetes tipo 2 y obesidad, mostrando el importante papel del mecanismo del receptor CD14/TLR4 para LPS. (Turnbaugh *et al.*, 2006; Caesar *et al.*, 2015).

Por otra parte se ha mostrado que un aumento de *Bifidobacterium* spp. modula la inflamación en ratones obesos por un incremento en la producción de péptido similar al glucagón, reduciendo también la permeabilidad intestinal (Cani *et al.*, 2009). Existe evidencia de que el incremento de *Bifidobacterium* spp que producen algunos prebióticos se acompaña de un incremento en la secreción de GLP1 y de Péptido YY por parte del intestino (Neyrinck *et al.*, 2011), estas dos moléculas tienen efectos favorables en el descenso de la resistencia a la insulina e incremento de la funcionalidad de la célula beta (Everard y Cani, 2014). Otra bacteria asociada a mejorar la barrera intestinal, así como el metabolismo de carbohidratos y lípidos es *Akkermancia muciniphila*, (Cani y Everard, 2014; Everard *et al.*, 2013) la cual se encuentra notablemente disminuida durante la obesidad, sin embargo, al incluir alimentos funcionales como el nopal en la dieta, esta bacteria incrementa su abundancia, lo cual contribuye en el mejoramiento de la señalización de insulina y el metabolismo de lípidos (Lukovac *et al.*, 2014; Dao *et al.*, 2015; Schneeberger *et al.*, 2015).

Finalmente, considerando que la microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica que le permite mantener una relación de simbiosis o comensalismo con el huésped y la actividad bioquímica microbiana actúa colectivamente como un órgano, interviniendo en la mejoría de la biodisponibilidad de nutrientes y la degradación de compuestos de la dieta no digeribles; el aporte de nuevos nutrientes, y la eliminación de compuestos perjudiciales y antinutrientes, teniendo una gran repercusión en el estado nutricional y de salud del individuo; no

obstante, depende de la composición de la flora y de sus complejas interacciones con la dieta y el individuo (Harris *et al.*, 2012; Moreno-Indias *et al.*, 2014). En este contexto, el consumo de compuestos no digeribles que favorecen el desarrollo de la flora deseable (prebióticos), en forma de alimentos o suplementos alimentarios constituyen estrategias idóneas para modular la composición de la flora y potenciar sus efectos metabólicos beneficiosos. Entre los efectos saludables puede citarse la mejoría de la absorción de minerales y su aporte, la mejoría de los síntomas de la intolerancia a los azúcares y la generación de péptidos antihipertensores. En el caso del nopal, un alimento funcional que contiene múltiples compuestos bioactivos como polifenoles, vitamina C, β -carotenos, fitoesteroles, antioxidantes y su alto contenido en fibra, le confieren propiedades antioxidantes, antihiper glucemiantes y reguladoras de las incretinas (GIP y GLP-1), lo cual además de disminuir la inflamación al secretar una menor cantidad de GIP, (Steven *et al.*, 2015) mostro un cambio importante en la composición de la microbiota intestinal incrementando la relación *Bacteroidetes/Firmicutes*, así como la abundancia de géneros considerados benéficos como lo son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Akkermancia*, por lo cual el nopal podrían ser considerado como un prebiótico

CONCLUSIONES

- Se generó un modelo animal de obesidad inducida por dieta (OID) en ratas Wistar.
- El desarrollo de obesidad trajo como consecuencia alteraciones en las concentraciones de glucosa, insulina, GIP, triglicéridos, colesterol total, y colesterol LDL. Dichos parámetros, se redujeron con el consumo del nopal.
- En la obesidad se desarrolla intolerancia a la glucosa e inflexibilidad metabólica, las cuales son revertidas mediante la inclusión de nopal en la dieta.
- La inclusión de alimentos funcionales como el nopal pueden contribuir significativamente a la disminución de las anormalidades producidas en el desarrollo de la obesidad disminuyendo la lipogénesis mediada por SREBP-1 y aumentando la oxidación de ácidos grasos mediada por PPAR- α .
- El grupo obeso desarrolló una esteatosis hepática, además de presentar una severa inflamación en el hígado; sin embargo al consumir nopal en la dieta esta condición se ve disminuida.
- Las ratas obesas presentaron un incremento en el estrés de RE, el cual fue menor al adicionar 5% de nopal a la dieta.
- Las ratas obesas presentaron una hipertrofia del tejido adiposo, misma que disminuyó al incluir nopal en la dieta.
- El nopal fue capaz de regular a la baja incretinas (GIP), mejorando la señalización para la utilización de carbohidratos.
- Existe una disbiosis entre los principales *Phylum* de microorganismos que conforman la microbiota intestinal en el modelo de obesidad inducido por dieta, sin embargo la microbiota intestinal es modificada benéficamente después del

consumo del nopal ya que es capaz de reestablecen el equilibrio de la microbiota, mejorando la relación *Bacteroidetes/Firmicutes*, asociada a desordenes metabólicos y aumentado géneros considerados benéficos como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Akkermansia muciniphila*.

- La disbiosis observada generó una endotoxemia metabólica, misma que disminuyó notoriamente disminuida al incluir nopal en la dieta.
- Los resultados sugieren que el nopal puede ser considerado como un alimento funcional prebiótico.

BIBLIOGRAFÍA

Alvidrez MA, Gonzalez MBE, Jimenez SZ. Tendencias en la Produccion de Alimentos: Alimentos Funcionales. *Revista Salud Publica y Nutricion* 2002;3(3):1-8

Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermudez-Humaran LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med.* 2011;3(9):559-72.

Arabbi PR. Alimentos Funcionais: Aspectos Gerais. *Nutrire.* 2001;21(6):87-102.

Arai S. Studies on functional foods in Japan--state of the art. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996;60(1):9-15.

Arch JR, Hislop D, Wang SJ, Speakman JR. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(9):1322-31.

Arvanitoyannis IS, Van Houwelingen-Koukaliaroglou M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(5):385-404.

Ashwell M. Concepts of Functional Foods. ILSI - International Life Sciences Institute. 2002.

Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718-23.

Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(3):979-84.

Bakker GJ, Zhao J, Herrema H, Nieuwdorp M. Gut Microbiota and Energy Expenditure in Health and Obesity. *J Clin Gastroenterol.* 2015;49 Suppl 1:S13-9.

Barlow GM, Yu A, Mathur R. Role of the Gut Microbiome in Obesity and Diabetes Mellitus. *Nutr Clin Pract*. 2015.

Ben Salem-Fnayou A, Zemni H, Nefzaoui A, Ghorbel A. Micromorphology of cactus-pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) cladodes based on scanning microscopies. *Micron*. 2014;56:68-72.

Bengmark S. Colonic food: pre- and probiotics. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(1 Suppl):S5-7.

Bezirtzoglou E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*. 1997;3(2-3):173-7.

Blaut M. Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2015;74(3):227-34.

Bravo Hollins H. *Las cactaceas de Mexico* 2a. ed. Mexico, DF.: UNAM; 1978.

Bravo L. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Revista de Nutricion* 1998;56(11):317-33.

Brown L, Poudyal H, Panchal SK. Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. *Obes Rev*. 2015.

Brownawell AM, Caers W, Gibson GR, Kendall CW, Lewis KD, Ringel Y, et al. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals. *J Nutr*. 2012;142(5):962-74.

Brunser O, Gotteland M. In: Watson RR, Preedy VR, editors. *Bioactive foods in health promotion: probiotics and prebiotic*. Kidlington, UK: Elsevier Science; 2010. p. 73-93.

Cadena Santos, Vianey. Tesis: Nopal (*Opuntia* spp.): Estudio para valorar la utilización de residuos de cladodio como fuente de fibra dietética y antioxidantes. México, DF.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.

Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Backhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 2015;22(4):658-68.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761-72.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57(6):1470-81.

Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15(13):1546-58.

Cani PD, Everard A. [Akkermansia muciniphila: a novel target controlling obesity, type 2 diabetes and inflammation?]. *Med Sci (Paris).* 2014;30(2):125-7.

Cani PD, Everard A. Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. *Mol Nutr Food Res.* 2015.

Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia.* 2007;50(11):2374-83.

Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut.* 2009;58(8):1091-103.

Cappuccio FP, Pravst I. Health claims on foods: promoting healthy food choices or high salt intake? *Br J Nutr.* 2011;106(11):1770-1.

Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuno MI, Murri M, Boto-Ordonez M, Perez-Martinez P, Andres-Lacueva C, et al. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res.* 2012;53(5):973-8.

Colombo ML. Conventional and new foods: health and nutritional claims The new functional role of food. *Agro Food Industry Hi-Tech* 2010;21(1):42-4.

Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 1987;28(10):1221-7.

Dalby AB, Frank DN, St Amand AL, Bendele AM, Pace NR. Culture-independent analysis of indomethacin-induced alterations in the rat gastrointestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(10):6707-15.

Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2015.

Deacon CF. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Pept*. 2005;128(2):117-24.

Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hucking K, Holst JJ. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3575-81.

Delzenne NM, Cani PD. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2011;31:15-31.

Delzenne NM, Cani PD. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Curr Diab Rep*. 2011;11(3):154-9.

Delzenne NM, Neyrinck AM, Backhed F, Cani PD. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(11):639-46.

Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Fact*. 2011;10 Suppl 1:S10.

Divyashri G, Krishna G, Muralidhara M, Prapulla SG. Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of probiotic *Enterococcus faecium* CFR 3003: In vitro and in vivo evidences. *J Med Microbiol*. 2015.

Druart C, Alligier M, Salazar N, Neyrinck AM, Delzenne NM. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic and probiotic properties. *Adv Nutr*. 2014a;5(5):624S-33S.

Druart C, Bindels LB, Schmaltz R, Neyrinck AM, Cani PD, Walter J, et al. Ability of the gut microbiota to produce PUFA-derived bacterial metabolites: Proof of concept in germ-free versus conventionalized mice. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(8):1603-13.

Druart C, Dewulf EM, Cani PD, Neyrinck AM, Thissen JP, Delzenne NM. Gut microbial metabolites of polyunsaturated fatty acids correlate with specific fecal bacteria and serum markers of metabolic syndrome in obese women. *Lipids*. 2014;49(4):397-402.

Duca FA, Katebzadeh S, Covasa M. Impaired GLP-1 signaling contributes to reduced sensitivity to duodenal nutrients in obesity-prone rats during high-fat feeding. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(11):2260-8.

Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973;37(5):826-8.

Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., Arai Y. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1964;24:1076-82.

Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):9066-71.

Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013;27(1):73-83.

Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(3):189-96.

Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*. 2011;60(11):2775-86.

Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1157-70.

Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(2):216-23.

Fehmann HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev*. 1995;16(3):390-410.

Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011;35(5 Suppl):14S-20S.

García Closas, R. (1995). *Historia de la Nutrición en Salud Pública* (Masson Ed.). Barcelona, España.

Genton L, Cani PD, Schrenzel J. Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. *Clin Nutr*. 2015;34(3):341-9.

Gerard P. Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci*. 2015.

Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM. Glucose-dependent insulintropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(7):1124-31.

Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef Microbes*. 2014;5(1):3-17.

Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 1995;108(4):975-82.

Gibson GR, Brummer RJ, Isolauri E, Lochs H, Morelli L, Ockhuizen T, et al. The design of probiotic studies to substantiate health claims. *Gut Microbes*. 2011;2(5):299-305.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995;125(6):1401-12.

Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(1 Suppl):S2-4.

Gordon JI, Dewey KG, Mills DA, Medzhitov RM. The human gut microbiota and undernutrition. *Sci Transl Med*. 2012;4(137):137ps12.

Goto T, Takahashi N, Kawada T. Food Components Modulate Obesity and Energy Metabolism via the Transcriptional Regulation of Lipid-Sensing Nuclear Receptors. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61(Supplement):S128-S30.

Grossklaus R. Codex recommendations on the scientific basis of health claims. *Eur J Nutr*. 2009;48 Suppl 1:S15-22.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361(9356):512-9.

Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes*. 2012;2012:879151.

Hasler CM. Functional Foods: Their Role in Disease in: *Developing New Food Products for a Changing Prevention and Health Promotion*. *Food Technology*. 1998;52(2):57-62.

Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.

Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(2):E199-206.

Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998;41(2):85-101.

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:283-307.

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science.* 2001;291(5505):881-4.

Hu X, Wang T, Liang S, Li W, Wu X, Jin F. Antibiotic-induced imbalances in gut microbiota aggravates cholesterol accumulation and liver injuries in rats fed a high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(21):9111-22.

Hur KY, Lee MS. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J.* 2015;39(3):198-203.

Hutkins RW, Krumbeck JA, Bindels LB, Cani PD, Fahey G, Jr., Goh YJ, et al. Prebiotics: why definitions matter. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;37:1-7.

Inoue R, Ushida K. Vertical and horizontal transmission of intestinal commensal bacteria in the rat model. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003;46(2):213-9.

Itoh M, Suganami T, Hachiya R, Ogawa Y. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int J Inflam.* 2011;720926.

Jovaisaite V, Mouchiroud L, Auwerx J. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J Exp Biol.* 2014;217(Pt 1):137-43.

Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(1):58-65.

Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(3):534-8.

Karlsson F. Assessing the Human Gut Microbiota in Metabolic Diseases. . *Diabetes.* 2013;62(10):3341-9.

Kinross JM, von Roon AC, Holmes E, Darzi A, Nicholson JK. The human gut microbiome: implications for future health care. *Curr Gastroenterol Rep.* 2008;10(4):396-403.

Kolida S, Gibson GR. Synbiotics in health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011;2:373-93.

Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11070-5.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022-3.

Lopez-Romero P, Pichardo-Ontiveros E, Avila-Nava A, Vazquez-Manjarrez N, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J, et al. The effect of nopal (*Opuntia ficus indica*) on postprandial blood glucose, incretins, and antioxidant activity in Mexican patients with type 2 diabetes after consumption of two different composition breakfasts. *J Acad Nutr Diet.* 2014;114(11):1811-8.

Lowenberg, M. R. W., Eva D.; Todhunter, E. Neige; Feeney, Moira C.; Savage, Jane R. (1970). *Los alimentos y el hombre* (Limusa-Wiley Ed.). Mexico

Lukovac S, Belzer C, Pellis L, Keijser BJ, de Vos WM, Montijn RC, et al. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. *MBio.* 2014;5(4).

Malainine ME, Alain D, Daniele D, Mostafa M, Goger V, Michael RV. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus indica* . Cellulose extraction and characterization. *Carbohydrate Polymers* 2003;51:77-83.

Markowitz JE, Bengmark S. Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Pediatr Clin North Am.* 2002;49(1):127-41.

Martínez Jimenez, A. (1998). *Fundamentos Teórico- Prácticos de Nutrición y Dietética.* (M.-H. Interamericana Ed.). Madrid, España.

Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Goke B, Thorens B, et al. International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):167-94.

Mazza G. *Alimentos Funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado.* España, Zaragoza2000.

Medina-Torres L, Vernon-Carter EJ, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzman NE, Herrera-Valencia EE, Calderas F, et al. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *J Sci Food Agric.* 2011;91(6):1001-5.

Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept.* 1999;85(1):9-24.

Mercer JG, Archer ZA. Diet-induced obesity in the Sprague-Dawley rat: dietary manipulations and their effect on hypothalamic neuropeptide energy balance systems. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 5):1068-72.

Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr.* 2000;130(7):1857S-64S.

Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN, Wahli W. PPAR expression and function during vertebrate development. *Int J Dev Biol.* 2002;46(1):105-14.

Morales Calatayud, F. (1999|). *Introducción al estudio de la psicología de la salud* (UniSon Ed.). México, Sonora.

Moran-Ramos S, Avila-Nava A, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J, Lopez-Romero P, Torres N. *Opuntia ficus indica* (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats. *J Nutr.* 2012;142(11):1956-63.

Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol.* 2014;5:190.

Mortensen K, Petersen LL, Orskov C. Colocalization of GLP-1 and GIP in human and porcine intestine. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;921:469-72.

Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J.* 2005;19(12):1602-16.

Neyrinck AM, Possemiers S, Druart C, Van de Wiele T, De Backer F, Cani PD, et al. Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice. *PLoS One.* 2011;6(6):e20944.

Neyrinck AM, Van Hee VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Br J Nutr.* 2013;109(5):802-9.

Peña AMB. Usos de los nopales *Opuntia* spp. Mexico, DF.: 2006.

Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest.* 1967;46(12):1954-62.

Petschow B, Dore J, Hibberd P, Dinan T, Reid G, Blaser M, et al. Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1306:1-17.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490(7418):55-60.

Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr.* 2007;137(3 Suppl 2):830S-7S.

Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* 2010;104 Suppl 2:S1-63.

Roumaud P, Martin LJ. Roles of leptin, adiponectin and resistin in the transcriptional regulation of steroidogenic genes contributing to decreased Leydig cells function in obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015.

Saier MH, Jr., Mansour NM. Probiotics and prebiotics in human health. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2005;10(1):22-5.

Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(43):16767-72.

Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 1985;28(9):704-7.

Schneeberger M, Everard A, Gomez-Valades AG, Matamoros S, Ramirez S, Delzenne NM, et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep.* 2015;5:16643.

Shi DJ, Mazza G. *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects.* United States of America.2002.

Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients.* 2013;5(4):1417-35.

Sonnenburg ED, Sonnenburg JL, Manchester JK, Hansen EE, Chiang HC, Gordon JI. A hybrid two-component system protein of a prominent human gut symbiont couples glycan sensing in vivo to carbohydrate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(23):8834-9.

Sousa VS, Garbieri V. The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice *Food and Nutrition Sciences.* 2011;2(2):133-44.

Steven S, Hausding M, Kroller-Schon S, Mader M, Mikhed Y, Stamm P, et al. Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in

animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Basic Res Cardiol.* 2015;110(2):6.

Stintzing FC, Carle R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(2):175-94.

Timper K, Grisouard J, Sauter NS, Herzog-Radimerski T, Dembinski K, Peterli R, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide induces cytokine expression, lipolysis, and insulin resistance in human adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(1):E1-13.

Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2008;3(4):213-23.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009a;457(7228):480-4.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31.

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 2009;1(6):6ra14.

Unger RH, Eisentraut AM. Entero-insular axis. *Arch Intern Med.* 1969;123:261-26.

Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, et al. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 2015;22(3):516-30.

Vázquez ARE. Comercialización deal Nopal Verdura. Mexico, DF.: 2006.

Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2001;50(3):609-13.

Vilsboll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Volund A, Juul AG, et al. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2706-13.

Vitetta L, Palacios T, Hall S, Coulson S. Gastrointestinal Tract Commensal Bacteria and Probiotics: Influence on End-Organ Physiology. *Prog Drug Res.* 2015;70:1-33.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111-9.

Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(3):235-43.

Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol.* 2010;61(1):69-78.

Yanay O, Bailey AL, Kernan K, Zimmerman JJ, Osborne WR. Effects of exendin-4, a glucagon like peptide-1 receptor agonist, on neutrophil count and inflammatory cytokines in a rat model of endotoxemia. *J Inflamm Res.* 2015;8:129-35.

Yip RG, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life Sci.* 2000;66(2):91-103.

Younes H, Coudray C, Bellanger J, Demigne C, Rayssiguier Y, Remesy C. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr.* 2001;86(4):479-85.

Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7):2365-70.

ANEXO I: ABREVIATURAS

ABC	Area bajo la curva
ACC	Acetyl-CoA carboxylasa
AIN-93	Dieta especifica de roedores diseñada por la American Institute Nutrition
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico
APP	Proteína precursora de b-amiloide
ATF-6	Factor activador de la transcripcion 6
ATP	Adenosin trifosfato
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina
b.s.	Base seca
CD26	Cluster de diferenciación 26
CFU	Unidades formadoras de colonias
CPT-1	Carnitil palmitoil trasferasa
CTG	Curva de tolerancia a la glucosa
Codex	Codigo Alimentario establecido por la FAO
DPP-IV	dipeptidil trasferasa 4
FD	Fibra dietética
FI	Fibra insoluble
FOS	fosfooligosacarido
FS	Fibra soluble
G	Grasa

GIP	Péptido insulotrópico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
HE	Hematoxilina-eosina
HFD	Dieta alta en grasa
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
IG	Índice glicémico
IKK	I κ B cinasa
IL	Interleucina
JNK	c-Jun N-terminal cinasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
N	Nopal
NASH	Hígado graso no alcohólico
NOX	NADPH oxidasa
OID	Obesidad Inducida por Dieta
PBS	Buffer de fosfatos
PKA	Proteína cinasa A
PPAR- α	receptores activados por el proliferador de peroxisomas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RE	Retículo endoplásmico
RER	Coefficiente de recambio respiratorio
RT	Retrotranscriptasa
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SREBP-1	sterol regulatory element-binding protein 1
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Tumor de necrosis tumoral alfa
VO ₂	Volumen de Oxígeno
XBP-1	Proteína de unión 1 a X-box