



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Caracterización de la microbiota intestinal de  
adultos mayores con hipertensión arterial bajo  
tratamiento farmacológico con ARA II**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA

**ARIANNA KRYSTEL GALICIA CASTAÑEDA**

ASESORA: DRA. MIRELLE VANESSA GONZÁLEZ  
COVARRUBIAS

CO – ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ – BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2020



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.

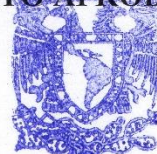


UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
**Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales**  
**de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

**Caracterización de la microbiota intestinal de adultos mayores con hipertensión arterial bajo tratamiento farmacológico con ARA II.**

Que presenta la pasante: **Arianna Krystel Galicia Castañeda**

Con número de cuenta: **312292863** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Febrero de 2020.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>VOCAL</b>	Dra. Mirelle Vanessa González Covarrubias	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Jazmín Flores Monroy	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

*“Algunas cosas del pasado desaparecieron,  
pero otras abren una brecha al futuro  
y son las que quiero rescatar”*

**Mario Benedetti**

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias a las facilidades del laboratorio de Farmacogenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica ubicado en la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. Vanessa González Covarrubias, y con el apoyo de mi co – asesora, la Dra. Sandra Díaz – Barriga Arceo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Fue financiado por el fondo FOSSIS – CONACyT 272795. Se agradece al Dr. Sergio Sánchez García, a la Dra. Dolores Mino León y al Dr. Marco Noel Gutiérrez Aguilar de la Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social por su invaluable labor en la recolección de las muestras de los pacientes y en la consolidación de la base de datos que constituyeron la base del presente estudio. A la Lic. Cintia Guzmán Cruz por su apoyo administrativo. Al M. en C. Martín Barbosa Amezcua por su ayuda a lo largo del proceso experimental. Al M. en C. Alfredo Mendoza de la Unidad de Secuenciación del Instituto por su asistencia y apoyo en la secuenciación *Illumina*. Al M. en C. Diego Corona y a la Dra. Berenice Palacios por su asistencia en el análisis bioinformático de los datos de secuenciación.

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con todo mi cariño y admiración a mi madre, Guadalupe Castañeda Hernández, a mi padre, Teodoro Galicia Pérez y a mi hermano, Erick Alejandro Galicia Castañeda. Ellos fueron mi principal soporte y motivación durante este tiempo. A la UNAM por darme la oportunidad de crecer cada día, personal y académicamente, y por permitirme añadir a mi vida a personas maravillosas. A Andrea, mi amiga de CCH quien jugó un papel fundamental en mi bienestar emocional y me ayudó a no rendirme pese a las dificultades que se presentaron. A Shanti, por haber colaborado conmigo, por enseñarme que las amistades no reconocen edad o profesión y por todos los momentos que compartimos en el desarrollo de este trabajo. A Martín, por darme su apoyo a lo largo del proyecto, por dedicar su tiempo a atender mis dudas, por brindarme sus consejos y amistad incondicional. A Taxis, por siempre motivarme, por entenderme y recordarme que pese a que el mundo se caiga debo seguir en pie y continuar hasta cumplir mis metas. A Cintia, Karla, Roberto, Helena, David, Alma y a todas aquellas personas que siempre estuvieron ahí para darme palabras de aliento y que creyeron en mí hasta el último momento, incluso cuando yo no lo hacía. A todos ustedes, gracias por compartir este logro conmigo.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	11
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO .....	14
2.1. Envejecimiento de la población o tercera transición demográfica .....	14
2.2. Hipertensión arterial.....	16
2.2.1. Definición y epidemiología.....	16
2.2.2. Sistema renina – angiotensina – aldosterona y antagonistas de los receptores AT <sub>1</sub> de la angiotensina II.....	16
2.2.3. Tratamiento y falla en el control de la tensión arterial .....	19
2.3. Microbiota humana .....	21
2.3.1. Microbiota intestinal .....	21
2.3.1.1. Microbiota intestinal en adultos mayores .....	22
2.3.1.2. Microbiota intestinal e hipertensión arterial .....	22
2.3.1.3. Microbiota intestinal y fármacos antihipertensivos .....	24
2.3.1.4. Microbiota intestinal y métodos de estudio .....	26
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN .....	30
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos particulares.....	31
4.3. Hipótesis.....	31
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
5.1. Población de estudio y consideraciones éticas .....	32
5.2. Recolección de muestras de materia fecal .....	33
5.3. Extracción de ADN .....	34
5.4. Secuenciación del gen ARNr 16S .....	34
5.4.1. PCR de amplificación .....	35
5.4.2. Primera purificación .....	36
5.4.3. PCR de indexación.....	36
5.4.4. Segunda purificación .....	37
5.4.5. Validación de bibliotecas del gen ARNr 16S .....	37
5.4.6. Cuantificación, normalización y secuenciación de bibliotecas del gen ARNr 16S .....	37
5.5. Análisis bioinformático y estadístico .....	38
5.5.1. Análisis de alfa – diversidad .....	39
5.5.2. Análisis de beta – diversidad.....	39
5.5.3. Análisis taxonómico .....	39
5.5.4. Análisis de composición funcional.....	40
CAPÍTULO 6. RESULTADOS .....	41
6.1. Extracción de ADN .....	41
6.2. Amplificación de las regiones V3 -V4 del gen ARNr 16S.....	41
6.3. Validación de bibliotecas del gen ARNr 16S .....	42
6.4. Secuenciación.....	43
6.5. Análisis de alfa – diversidad .....	45
6.6. Análisis de beta – diversidad.....	46
6.7. Análisis taxonómico .....	47

6.8. Análisis de composición funcional..... 53

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN ..... 56

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS ..... 64

REFERENCIAS ..... 65

ANEXO I. DICTAMEN DE APROBACIÓN..... 71

ANEXO II. INSTRUCTIVO DE TOMA DE MUESTRA FECAL COLABORACIÓN INMEGEN/CMN SXXI..... 72

ANEXO III. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL A NIVEL DE FILO DE UN GRUPO DE ADULTOS MAYORES MEXICANOS  
..... 74

ANEXO IV. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL A NIVEL DE GÉNERO DE UN GRUPO DE ADULTOS MAYORES MEXICANOS  
..... 75



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Población mundial por grupo de edad: 2000, 2015, 2030 y 2050.....	14
<b>Figura 2.</b> Pirámide demográfica de México: 2010 y 2050.....	15
<b>Figura 3.</b> Sistema renina – angiotensina – aldosterona y antagonistas de los receptores AT <sub>1</sub> de la angiotensina II.....	17
<b>Figura 4.</b> Representación del gen ribosomal bacteriano ARNr 16S.....	27
<b>Figura 5.</b> Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
<b>Figura 6.</b> Procedimiento para la preparación de bibliotecas del gen ARNr 16S.....	35
<b>Figura 7.</b> Evaluación de integridad de ADN.....	41
<b>Figura 8.</b> Evaluación del tamaño de los amplicones de las regiones V3 - V4 del gen ARNr 16S.....	42
<b>Figura 9.</b> Validación de bibliotecas del gen ARNr 16S mediante electroforesis automatizada.....	42
<b>Figura 10.</b> Gráfico de cajas y bigotes de la calidad de las secuencias sentido ( <i>forward</i> ) del lote 1018. ....	43
<b>Figura 11.</b> Gráfico de cajas y bigotes de la calidad de las secuencias sentido ( <i>forward</i> ) del lote 0219.....	44
<b>Figura 12.</b> Análisis de la diferencia de secuencias no quiméricas entre lotes.....	45
<b>Figura 13.</b> Análisis de alfa – diversidad en pacientes hipertensos controlados y no controlados.....	46
<b>Figura 14.</b> Análisis de beta – diversidad en pacientes hipertensos controlados y no controlados.....	47
<b>Figura 15.</b> Composición de la fracción bacteriana de la microbiota intestinal de pacientes hipertensos controlados y no controlados a nivel de filo.....	48
<b>Figura 16.</b> Comparación de la relación <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> entre pacientes hipertensos controlados y no controlados.....	49
<b>Figura 17.</b> Composición de la fracción bacteriana de la microbiota intestinal de pacientes hipertensos controlados y no controlados a nivel de género.....	50
<b>Figura 18.</b> Representación de los taxones con diferencia significativa entre pacientes hipertensos controlados y no controlados.....	52
<b>Figura 19.</b> Análisis discriminante lineal entre pacientes hipertensos controlados y no controlados mediante LEfSe.....	53
<b>Figura 20.</b> Análisis de funcionalidad basado en la predicción metagenómica a partir de MetaCyc con PICRUST.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales clases de fármacos antihipertensivos y su mecanismo de acción .....	18
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas y demográficas de la población de estudio. ....	33
<b>Tabla 3.</b> Número de secuencias remanentes tras cada proceso llevado a cabo por DADA2 .....	44
<b>Tabla 4.</b> Diferencias en alfa - diversidad entre cHTA+ y cHTA- .....	45
<b>Tabla 5.</b> Diferencias a nivel de filo y género entre pacientes hipertensos controlados y no controlados....	51

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ARA II	Antagonistas de los receptores AT <sub>1</sub> de la angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
BB	β – bloqueadores
BBC	Bloqueadores de los canales de calcio
cHTA-	Pacientes hipertensos con tensión arterial no controlada
cHTA+	Pacientes hipertensos con tensión arterial controlada
CMN SXXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
COSFAMM	Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en Adultos Mayores
dNTP	Dinucleótido trifosfatado
ECA 1	Enzima convertidora de angiotensina tipo I
ENSANUT 2016	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016
ETA	Receptor endotelial A
ETB	Receptor endotelial B
F/B	<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>
GI	Gastrointestinal
HTA	Hipertensión arterial
HTN	Hipertenso
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IHMS	<i>International Human Microbiome Consortium</i> /Consortio Internacional de Microbioma Humano
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> /Espaciador Transcrito Interno
LDL – ox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LefSe	<i>Linear discriminant analysis Effect Size</i>
NO	Óxido nítrico
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pHTN	Prehipertenso
PICRUST	<i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States</i>
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
R	Ratas Dahl resistentes
RAPGs	Receptores acoplados a proteína G
S	Ratas Dahl sensibles a la sal
SRAA	Sistema renina – angiotensina – aldosterona
TA	Tensión arterial
TAD	Tensión arterial diastólica
TAS	Tensión arterial sistólica
TMA	Trimetilamina
TMAO	N – óxido de trimetilamina
UMF	Unidad de Medicina Familiar
WKY	Wistar – Kyoto
ZIG	<i>Zero – Inflated Gaussian</i> / Modelo gaussiano de cero – inflado
ZINB	<i>Zero – Inflated Negative Binomial</i> / Modelo binomial negativo cero – inflado
ZIP	<i>Zero – Inflated Poisson</i> /Modelo de regresión de Poisson inflado con ceros

## RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es la principal causa de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, discapacidad y muertes prematuras en todo el mundo. Tiene una prevalencia del 25.5% en México y se presenta en aproximadamente el 50% de adultos mayores, de los cuales al menos la mitad no mantiene niveles adecuados de tensión arterial (TA) (<140/90 mm Hg) aun con tratamiento farmacológico. Se espera que estas cifras de prevalencia aumenten en los próximos años debido al incremento en la proporción de adultos mayores. En la actualidad existen distintos estudios encaminados a descifrar la variabilidad interindividual en esta falla al tratamiento antihipertensivo, los cuales se han centrado en la participación de factores como adherencia al tratamiento, polifarmacia, estilo de vida y sobre todo, factores genéticos y farmacogenéticos. Sin embargo, el impacto de variables como la microbiota intestinal no ha sido caracterizado a detalle. Por ello, el objetivo del presente estudio fue identificar las diferencias que existen en la fracción bacteriana de la microbiota intestinal entre adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico con TA controlada (cHTA+) y no controlada (cHTA-). Además, con este estudio se realizó la primera caracterización de la microbiota intestinal de una muestra de adultos mayores mexicanos.

En el estudio se incluyeron 69 pacientes mayores de 60 años de la Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en Adultos Mayores (COSFAMM) de la Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de los cuales el 77% mantenía niveles de TA controlados (cHTA+) y 33% no (cHTA-). A partir de muestras de heces se extrajo ADN (ácido desoxirribonucleico) y se prepararon bibliotecas de secuenciación de las regiones V3 – V4 del gen ribosomal bacteriano ARNr 16S. Los resultados del proceso de secuenciación fueron sometidos a análisis bioinformático y estadístico con QIIME2 – 2019.1, LEfSe, PICRUST y R Studio.

Los grupos cHTA+ y cHTA- no presentaron diferencia significativa en sus valores de alfa – diversidad ( $p \geq 0.05$ ), sin embargo, la representación gráfica de beta – diversidad evidenció cierta tendencia de agrupamiento de los pacientes cHTA- con respecto a los pacientes cHTA+, indicativo de que la diferencia se podría encontrar a nivel de composición de la microbiota intestinal, específicamente en las capacidades funcionales que ésta alberga. Esto se confirmó con el análisis de composición funcional realizado con PICRUST, donde se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en 13 vías metabólicas.

En cuanto al análisis taxonómico se encontró que 14 taxones, uno a nivel de filo y 13 a nivel de género variaban significativamente ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de análisis. Nueve de estos taxones eran significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores en cHTA- que en cHTA+ y se distinguían por producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC), compuestos que promueven la disminución de la TA en pacientes hipertensos. El hecho de que aun con un aumento en la proporción de estos taxones los pacientes cHTA- tuvieran una TA elevada se podría atribuir a que estos individuos presentan una baja expresión a nivel renal de receptores de AGCC, o bien, una baja expresión a nivel intestinal de transportadores de AGCC.

Las observaciones derivadas de este estudio sugieren que efectivamente la composición de la microbiota intestinal difiere entre pacientes hipertensos controlados y no controlados bajo tratamiento farmacológico. Esto marca una pauta para ampliar el presente estudio, confirmar los resultados encontrados y ahondar en el conocimiento de la asociación entre microbiota intestinal y control de la TA.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La elevación de la tensión arterial (TA) o hipertensión arterial (HTA) es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, además de que se considera una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. La TA aumenta con la edad biológica debido a la rigidez arterial, la remodelación vascular así como con los cambios a nivel renal y hormonal que ésta supone. Como consecuencia, la HTA es la enfermedad crónica más comúnmente diagnosticada entre los adultos mayores de 60 años<sup>1</sup>. Esto resulta importante, pues las estadísticas sugieren que el incremento en la población de adultos mayores, que trae consigo lo que se ha denominado la tercera transición demográfica, provocará el aumento en la prevalencia de HTA, sobre todo en países poco desarrollados o en vías de desarrollo como México<sup>2,3</sup>.

La HTA puede conducir a una serie de complicaciones cardiovasculares como derrame cerebrovascular y enfermedad coronaria<sup>3</sup>, por tanto, con el fin de evitar tales complicaciones es necesario que los pacientes hipertensos mantengan niveles de TA adecuados, lo cual se logra principalmente a través de la prescripción de fármacos antihipertensivos. No obstante, gran proporción de pacientes hipertensos aun con la ingesta de más de tres fármacos antihipertensivos no logran un control en sus cifras de TA y, en consecuencia, se encuentran en alto riesgo cardiovascular en comparación con aquellos que sí lo tienen. Hoy en día se sabe que factores como falta de adherencia al tratamiento, ingesta de múltiples fármacos, factores genéticos y factores farmacogenéticos pueden estar involucrados con dicho fenómeno, sin embargo, la causa exacta aún se desconoce<sup>4-8</sup>.

La microbiota intestinal es uno de los temas de investigación con mayor auge en los últimos años y cambios en su composición y estructura ya han sido reportados en condiciones de enfermedad como la HTA<sup>9-11</sup>. Sin embargo, no se ha elucidado su posible papel en el control de los niveles de TA en pacientes hipertensos bajo tratamiento farmacológico, por lo que ese supone el principal objetivo de la presente investigación.

Antes de proseguir es necesario hacer ciertas puntualizaciones:

1. Actualmente, aun cuando se ha definido microbiota como el conjunto de microorganismos presentes en un sitio en particular, y microbioma como el genoma que albergan dichos microorganismos<sup>9</sup>, la comunidad científica aún no ha estandarizado cuándo utilizar un término u otro a lo largo de los estudios, por lo que en el presente estudio se hará uso del término microbiota bajo la consideración de que el fin de las metodologías utilizadas hasta el momento es conocer la identidad de los microorganismos presentes en la muestra de estudio.
2. La metodología empleada en la presente investigación involucra un gen marcador: el gen ribosomal ARNr 16S. Tomando en cuenta que este gen se encuentra únicamente en bacterias<sup>12</sup>, es necesario

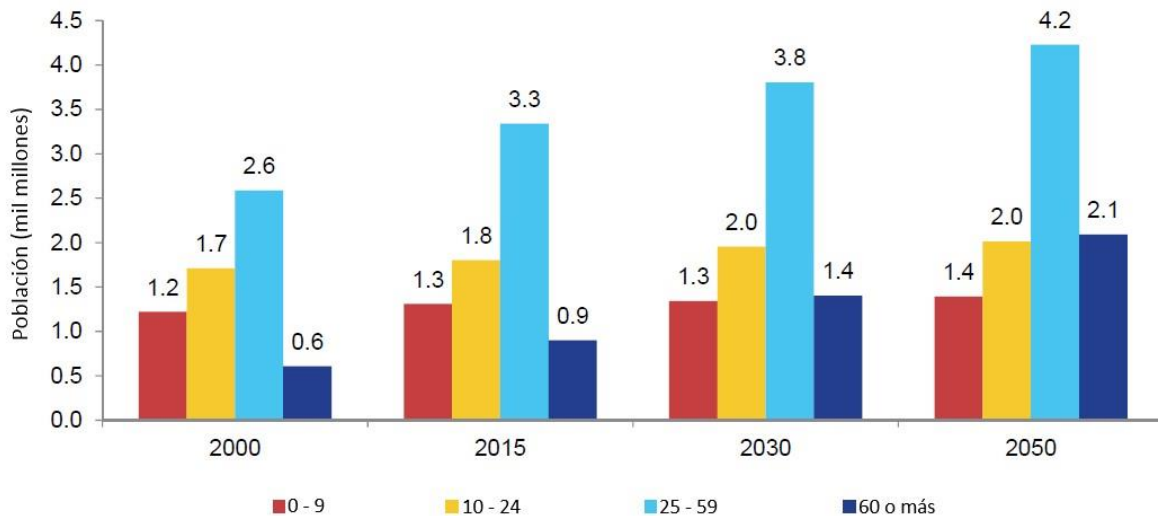
recalcar que el presente estudio se enfoca en la caracterización de la fracción bacteriana de la microbiota intestinal.

## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Envejecimiento de la población o tercera transición demográfica

Desde la segunda mitad del siglo XX la humanidad padece uno de los mayores fenómenos globales: el envejecimiento de la población o tercera transición demográfica. Esta transición consiste en una disminución de la fertilidad femenina, una mayor tasa de supervivencia infantil, una longevidad prolongada y un rápido incremento en la proporción de adultos mayores dentro de la sociedad, entendiendo como adultos mayores - para fines del presente estudio - todas aquellas personas que cuentan con una edad de 60 años o más. Sus principales causas son las mejores condiciones de vida, servicios de salud y educación con que se cuenta actualmente<sup>2,13-16</sup>.

Como evidencia de este proceso, a nivel mundial se estima que para el 2050 el número de personas mayores de 60 años aumentará casi al doble con respecto al 2015, del 12% (0.9 mil millones) al 22% (2.1 mil millones) (**Figura 1**)<sup>14,17</sup>. Específicamente, en México este sector crecerá hasta casi cuatro veces más en el mismo periodo, del 6.3% al 23% (**Figura 2**)<sup>18</sup>, lo que representa una problemática primordial en salud pública, pues la adaptación que duró más de un siglo en países altamente desarrollados como Francia, está sucediendo en tan sólo dos décadas en nuestro país y en otros menos desarrollados, donde se concentrará más del 80% del total de adultos mayores a nivel mundial<sup>14</sup>.



**Figura 1.** Población mundial por grupo de edad: 2000, 2015, 2030 y 2050. Imagen modificada. Se observa que el grupo de 60 años o más es el que presenta el cambio más drástico a lo largo del tiempo, en tanto que los demás grupos se mantienen igual o presentan aumentos paulatinos. *Fuente:* United Nations (2015).



**Figura 2.** Pirámide demográfica de México: 2010 y 2050. En la imagen se puede observar que en comparación con el año 2010, la prevalencia de adultos mayores de 60 años será mayor para el año 2050. *Fuente:* Angel, Vega & López - Ortega (2017).

El incremento en la frecuencia de individuos sexagenarios supone como reto su inclusión en actividades tanto sociales como económicas con el fin de fomentar un desarrollo sustentable del país. Para lograrlo, dicho sector debe ser autosuficiente, lo que implica mantener una salud óptima hasta edades avanzadas y por tanto, ahondar en su caracterización para generar estrategias encaminadas a un envejecimiento saludable<sup>14,18</sup>.

Contrario a los objetivos, poca evidencia señala que los adultos mayores en la actualidad sean más saludables de lo que lo fueron sus padres a la misma edad<sup>13</sup>. Esto se refleja en la alta prevalencia de enfermedades crónicas como HTA, diabetes y artritis que se reporta en los individuos que se encuentran en esta etapa de la vida. Esto supone uno de los principales desafíos económicos a los que se enfrenta México, pues este tipo de padecimientos suele involucrar cuidados a largo plazo y provocar enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, cuyos costos deben ser cubiertos, no sólo por el gobierno, sino por la sociedad en general<sup>17,18</sup>. He aquí la importancia de tomar acciones tan rápido como sea posible para enfrentar de la mejor manera este drástico cambio social.



## 2.2. Hipertensión arterial

### 2.2.1. Definición y epidemiología

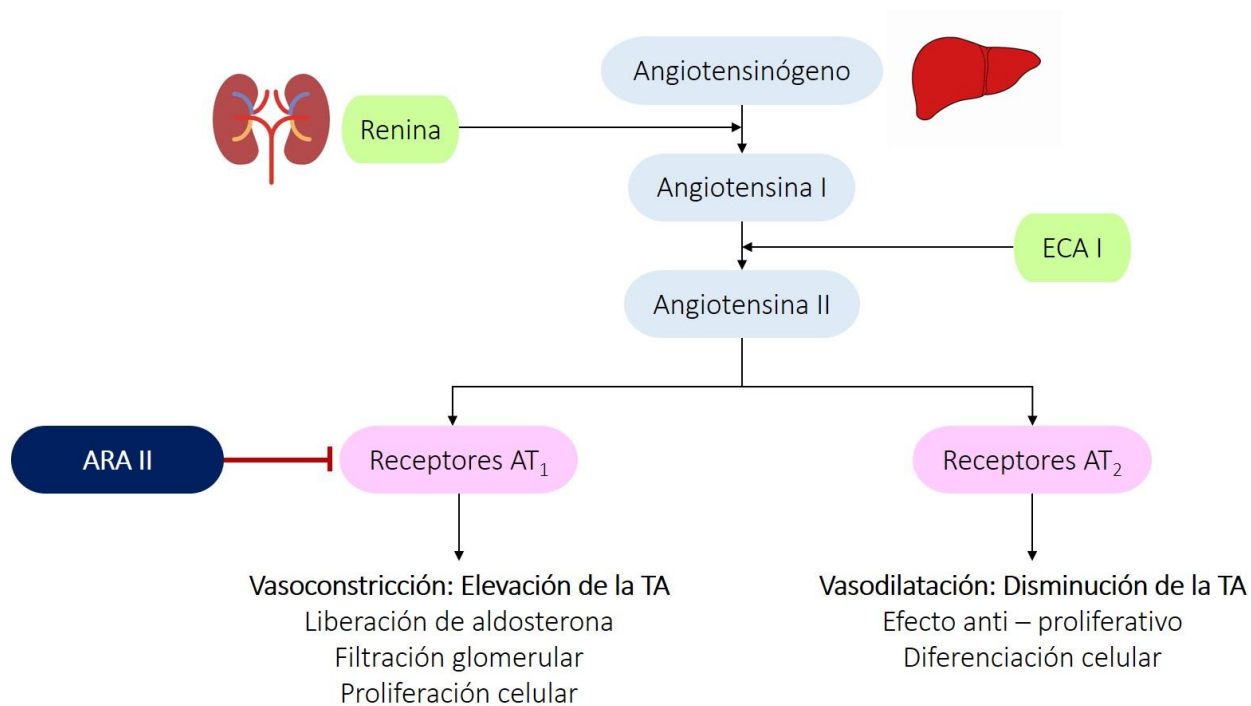
La hipertensión arterial (HTA), definida como una tensión arterial sistólica (TAS)  $\geq 140$  mm Hg y/o una tensión arterial diastólica (TAD)  $\geq 90$  mm Hg, es la afección crónica más común y el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (enfermedad coronaria e insuficiencia cardíaca) y cerebrovasculares (derrame cerebral), las cuales se consideran las primeras causas de muerte a nivel mundial<sup>9,20-22</sup>.

La tensión arterial (TA) incrementa con la edad, por lo que con el envejecimiento poblacional que se está suscitando se espera que la prevalencia mundial de 1130 millones de hipertensos, reportada para el año 2015, aumente considerablemente en las próximas décadas, siendo los principales afectados los países subdesarrollados y en vías de desarrollo como México<sup>20,21</sup>, nación en la que el 25.5% de la población, así como aproximadamente el 50% de adultos de 60 años o más sufre HTA, según lo reportado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT 2016)<sup>23</sup>.

### 2.2.2. Sistema renina – angiotensina – aldosterona y antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II

El sistema renina – angiotensina – aldosterona (SRAA) es un mecanismo complejo que juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad hemodinámica del cuerpo humano mediante la regulación de la TA y el balance hidroelectrolítico<sup>24</sup>. Sus principales componentes son la renina, el angiotensinógeno, la enzima convertidora de angiotensina tipo I (ECA 1), la angiotensina II (Ang II) y los receptores de siete dominios transmembranales AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub><sup>25</sup>.

La cascada hormonal clásica del SRAA (**Figura 3**) comienza con la producción de renina, aspartil proteasa producida por las células yuxtaglomerulares del riñón que convierte el angiotensinógeno, sintetizado principalmente en el hígado, en angiotensina I (Ang I). La Ang I al ser un decapeptido biológicamente inactivo requiere ser activado por la ECA 1, una dipeptidil carboxipeptidasa, a su forma biológicamente activa, la Ang II. La Ang II puede unirse a dos receptores y generar efectos distintos, de modo que su interacción con el receptor AT<sub>1</sub> causa vasoconstricción (elevación de la TA), liberación de aldosterona, filtración glomerular y proliferación celular, mientras que la interacción con el receptor AT<sub>2</sub> tiene efectos contrarios: vasodilatación (disminución de la TA), antiproliferación celular y diferenciación celular<sup>24,25</sup>.



**Figura 3.** Sistema renina – angiotensina – aldosterona y antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II. En la imagen se muestra el funcionamiento de la cascada del SRAA. El angiotensinógeno producido en tejido hepático es convertido por la enzima renina, producida en tejido renal, en angiotensina I. Angiotensina I, por acción de ECA I es transformada en angiotensina II. Angiotensina II puede tener efectos distintos dependiendo del tipo de receptores al cual se una: receptores AT<sub>1</sub> o receptores AT<sub>2</sub>. Los antihipertensivos de tipo ARA II actúan bloqueando la acción de angiotensina II sobre los receptores AT<sub>1</sub> al unirse de manera competitiva a éstos. SRAA: Sistema renina – angiotensina – aldosterona. ECA I: Enzima convertidora de angiotensina tipo I. ARA II: Antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II. Imagen de creación propia.

Dilucidar este sistema ha permitido el desarrollo de fármacos antihipertensivos (**Tabla 1**) que al inhibir alguna de las reacciones de la cascada impiden el incremento descontrolado de la TA. Entre estos fármacos destacan los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II (ARA II) (losartán, valsartán, candersatán, irbesartán, eprosartán, telmisartán y olmesartán), los cuales producen un bloqueo competitivo y selectivo de los receptores AT<sub>1</sub>, inhibiendo las acciones de la Ang II mediadas por éstos (**Figura 3**). Su afinidad por los receptores AT<sub>1</sub> es 10,000 a 30,000 veces mayor que por los AT<sub>2</sub>, por lo que en su presencia, la Ang II sintetizada puede estimular los receptores AT<sub>2</sub> que no se encuentran bloqueados y cuya expresión, además, puede haberse incrementado tras el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>. En el contexto de la HTA, la estimulación de los receptores AT<sub>2</sub> resulta importante, ya que aumenta la liberación de sustancias con propiedades vasodilatadoras<sup>26,27</sup>.

Actualmente, en México el 15.8% de pacientes hipertensos con tratamiento farmacológico utiliza ARA II, proporción que se espera incremente debido a la mejor tolerabilidad y eficacia observada con respecto a otros fármacos antihipertensivos. Además, alrededor del mundo comienza a dejarse de lado el uso de medicamentos tradicionales como los diuréticos y  $\beta$  – bloqueadores (BB), y a optarse por fármacos más

novedosos como lo son los ARA II. Prueba de ello es que la *American Diabetes Association* ha decidido considerar a los ARA II como tratamiento de primera elección en los pacientes hipertensos con diabetes tipo 2, debido a los resultados benéficos que se han obtenido<sup>27,28</sup>.

**Tabla 1.** Principales clases de fármacos antihipertensivos y su mecanismo de acción

Fármaco antihipertensivo	Mecanismo de acción	Ejemplos
Diuréticos tiazídicos	Inhiben la reabsorción de iones sodio (Na <sup>+</sup> ) y cloro (Cl <sup>-</sup> ) de los túbulos contorneados distales en los riñones causando disminución de la TA <sup>29</sup>	Clortalidona Indapamida Metolazona
β – bloqueadores	Son antagonistas competitivos que bloquean los sitios receptores para epinefrina (adrenalina) y norepinefrina en los receptores β – adrenérgicos <sup>30</sup> . Reducen el ritmo cardíaco, inhiben la liberación de renina, promueven la generación de óxido nítrico (NO) y reducen el tono vasomotor <sup>29</sup>	Acebutolol Bisoprolol Carvediolol Metoprolol Nebivolol
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)	Bloquean la conversión de angiotensina I a angiotensina II provocando vasodilatación y decremento de la TA <sup>29</sup>	Benazepril Captopril Cilazapril Enalapril Fosinopril
Antagonistas de los receptores AT <sub>1</sub> de angiotensina II (ARA II)	Bloquean directamente los receptores AT <sub>1</sub> de angiotensina II causando vasodilatación, disminución en la secreción de vasopresina, disminución de la liberación de aldosterona y disminución de la TA <sup>29</sup>	Azilsartán Candesartán Eprosartán Irbesartán Telmisartán
Bloqueadores de canales de calcio	Interrumpen el movimiento de calcio a través de los canales de calcio presentes en el músculo cardíaco y en las arterias periféricas provocando vasodilatación y disminución de la TA	Amlodipino Diltiazem Felodipino Nifedipino Verapamil
α – bloqueadores	Inhiben la unión de norepinefrina (noradrenalina) a los receptores adrenérgicos α <sub>1</sub> en las células musculares lisas vasculares, lo cual disminuye la resistencia vascular periférica y por ende la TA <sup>30</sup>	Terazosina Prazosina Doxazosina

### 2.2.3. Tratamiento y falla en el control de la tensión arterial

En México el tratamiento de la HTA se basa inicialmente en la evaluación de riesgo cardiovascular, daño a órgano blanco y presencia de comorbilidades. Ante la ausencia de enfermedades adyacentes y un riesgo cardiovascular bajo o medio se opta por un tratamiento no farmacológico enfocado a la modificación del estilo de vida del paciente (reducción en la ingesta de sal, control del exceso de peso y ejercicio). Si lo anterior no funciona o el riesgo cardiovascular es alto se recurre al tratamiento farmacológico, como monoterapia, con alguno de los antihipertensivos de primera línea: diuréticos tiazídicos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), ARA II, bloqueadores de los canales de calcio (BBC) o BB. En un primer momento estos fármacos se prescriben en dosis bajas, las cuales dependiendo de la respuesta y niveles de TA se incrementan gradualmente hasta alcanzar la dosis máxima. Cuando lo anterior no conlleva a una respuesta adecuada se cambia la clase terapéutica, y como último recurso, ante la persistencia del problema se añade un segundo, tercer o hasta cuarto fármaco antihipertensivo al régimen. Resulta importante señalar que muchas veces, incluso con el uso de dos o más antihipertensivos, los niveles de TA no logran controlarse<sup>31-33</sup>.

Cabe mencionar que en ocasiones se indica el uso de más de un fármaco desde el inicio del tratamiento antihipertensivo en<sup>34</sup>:

- Pacientes con niveles de TA >160/100 mm Hg, pacientes hipertensos y diabéticos que presentan registros iniciales de TA 20/100 mm Hg para sistólica y/o diastólica, respectivamente, por encima del objetivo terapéutico
- Pacientes hipertensos y diabéticos y/o con enfermedad renal crónica y proteinuria

Por otro lado, las cifras indican que en el país 79.3% del total de hipertensos cuenta con tratamiento farmacológico, sin embargo, sólo la mitad de ellos logra mantener niveles óptimos de TA<sup>23</sup>. Hasta el momento se sabe que algunos de los factores involucrados con esta falta de control o falla terapéutica son:

- Estilo de vida: Hábitos como el tabaquismo, alcoholismo y consumo de cafeína suelen causar elevación de la TA del paciente<sup>6</sup>.
- Falta de adherencia al tratamiento farmacológico: El paciente no toma el medicamento prescrito, o si lo hace ingiere una dosis mayor, menor o en horarios equívocos, lo cual conlleva a falla terapéutica y por tanto, a la falta de control sobre la TA<sup>4,35</sup>.
- Polifarmacia: Es común en pacientes con multimorbilidad, generalmente adultos mayores, el uso de múltiples fármacos. Esto puede provocar interacciones medicamentosas que inhiban el mecanismo de acción del o los antihipertensivos empleados, o bien, alguna de las sustancias involucradas puede tener efecto, por sí misma, sobre los niveles de TA<sup>5,6</sup>.

- Factores genéticos y farmacogenéticos: Estudios que versan sobre HTA han identificado genes involucrados con SRAA, la homeostasis hidroelectrolítica, la estructura y regulación del tono vascular, que tienen relación directa con los niveles de TA<sup>7</sup>. Mientras que, en farmacogenómica se ha visto que la presencia de polimorfismos en ciertos genes tiene efecto sobre la eficacia de algunos agentes antihipertensivos. Como ejemplo de ello se tiene la asociación de *NEDD4L* con los diuréticos tiazídicos, así como de *ADRB1* con los BB<sup>8</sup>.

Es preciso ahondar más en las posibles causas y factores involucrados con este fenómeno, pues los pacientes cuyos niveles elevados de TA persisten se mantienen en alto riesgo de sufrir daño vascular, discapacidad, e incluso, la muerte<sup>4,36,37</sup>.

## 2.3. Microbiota humana

El cuerpo humano, al igual que el resto de los mamíferos, se encuentra habitado por comunidades de microorganismos, las cuales al encontrarse en un equilibrio dinámico y simbiótico con su hospedero son esenciales para su funcionamiento normal. Mientras al conjunto de bacterias, arqueas, hongos, protozoarios y virus encontrados dentro y sobre el cuerpo humano se le conoce como microbiota humana, al genoma que albergan en conjunto dichos microorganismos se le denomina microbioma humano<sup>9,38</sup>.

La microbiota hace vitales contribuciones a la homeostasis energética, metabolismo, salud del epitelio intestinal, actividad inmunológica y neurodesarrollo del individuo<sup>38</sup>. Para comprender por qué puede tener este impacto debe hacerse referencia a su genoma, en este sentido, se calcula que hay de 2 a 20 millones de genes microbianos asociados con el cuerpo humano, es decir, exceden al menos 100 veces los aproximadamente 20,000 genes humanos existentes<sup>39</sup>.

Aunado a lo anterior, la microbiota se caracteriza por estar en constante cambio. Esto se debe al propio proceso de crecimiento y desarrollo que sufren los individuos, de modo que la diversidad microbiana aumenta durante la infancia y disminuye con edades avanzadas. Sin embargo, la edad no es el único factor que produce variaciones en la microbiota, factores como dieta, ejercicio, tabaquismo, alcoholismo, uso de antibióticos, la presencia de alguna enfermedad y el embarazo también pueden modificar su composición y estructura (disbiosis)<sup>9,40</sup>.

### 2.3.1. Microbiota intestinal

La microbiota humana no se encuentra distribuida homogéneamente en todo el organismo. Múltiples estudios han mostrado que cada individuo posee una microbiota única y que de igual manera, cada sitio del cuerpo alberga comunidades microbianas únicas<sup>9</sup>. En este sentido, la microbiota intestinal es una de las más ampliamente caracterizadas, en lo que respecta a su composición bacteriana, siendo representada por *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y en menor grado por *Actinobacteria* y *Proteobacteria* a nivel de filo, mientras que *Prevotella*, *Bacteroides* y/o *Ruminococcus* son abundantes a nivel de género<sup>40,41</sup>.

En lo que respecta a su papel en la fisiología humana, la microbiota intestinal contribuye en el metabolismo de fibras dietéticas que las enzimas humanas no pueden digerir. También impide la invasión de patógenos, contribuye a la educación y estimulación del sistema inmune, al mantenimiento de la homeostasis e integridad del epitelio intestinal, a la síntesis de vitamina B y vitamina K, y a la mejora en la funcionalidad y motilidad del tracto gastrointestinal (GI)<sup>9</sup>. En los últimos años, cambios en su composición se han relacionado con fisiopatologías como diabetes, cáncer, trastornos intestinales, enfermedades hepáticas, condiciones inmunes, síndrome metabólico e HTA<sup>40</sup>, por lo que centrarse en su estudio continúa resultando relevante.

### 2.3.1.1. Microbiota intestinal en adultos mayores

La microbiota sufre cambios con la edad, afirmación que se basa en estudios recientes que han encontrado claras diferencias entre la microbiota intestinal de bebés, niños, adultos y ancianos<sup>42</sup>. En línea con esto, una de las variaciones más significativas en su composición ocurre en la transición de la edad adulta a la vejez<sup>43</sup>. Esta transformación tiene origen tanto en los cambios fisiológicos como en la modificación que suele haber en la dieta del adulto mayor debido a la pérdida de dientes, disminución en su habilidad para masticar, detrimento de su sentido del gusto, y reducción de la motilidad intestinal que deriva en un tránsito intestinal lento y en la alteración del intercambio de nutrientes. Otro cambio fisiológico importante que se ha relacionado con la variación de la microbiota intestinal en esta edad es la inflamación sistémica de bajo grado (fenómeno conocido por el término en inglés *inflamm-aging*) que acompaña al envejecimiento, la cual se debe a una reducción global en la capacidad del organismo para enfrentar factores estresantes<sup>44-46</sup>. En general, los estudios sobre microbiota intestinal y envejecimiento han reportado que, en comparación con adultos jóvenes los adultos mayores presentan una reducción en la diversidad del ecosistema intestinal, así como un incremento en la colonización de especies oportunistas y patobiontes (simbiontes del tracto GI con potencial patogénico), incluyendo estreptococos, estafilococos, enterobacterias y enterococos. Adicionalmente, hay reordenamientos en la población de microorganismos sacarolíticos y proteolíticos, como *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y disminución en especies productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en particular butirato<sup>46</sup>. Cabe señalar que estos metabolitos se conocen por sus efectos benéficos sobre la salud, como su capacidad anti – inflamatoria<sup>43,47</sup>.

Estos cambios tienden a estar relacionados con factores de riesgo para la salud de individuos en edades avanzadas, por lo que modular la microbiota intestinal resulta una de las principales estrategias para mantener un estado de salud favorable en este creciente sector de la población. En la actualidad, se ha propuesto el uso de prebióticos y probióticos como estrategia para disminuir los efectos adversos que pueda tener la modificación de la microbiota intestinal. En este sentido, múltiples estudios clínicos han mostrado que su utilización incrementa la producción de AGCC y mejora la respuesta del sistema inmune, lo cual tiene un impacto positivo sobre la salud de los individuos. Pese a ello, aún falta comprender más la relación entre microbiota intestinal y vejez, de modo que las intervenciones médicas que se hagan sean racionales y no sólo producto de un conocimiento empírico<sup>43,44</sup>.

### 2.3.1.2. Microbiota intestinal e hipertensión arterial

La regulación de la TA es un proceso complejo<sup>9</sup> en el que participan múltiples sistemas fisiológicos influenciados por factores tanto ambientales como genéticos<sup>9,10</sup>. Aunque se sabe que la interacción entre estos factores forma parte de la etiología de la HTA, la causa precisa de esta morbilidad aún no ha sido

elucidada<sup>48</sup>. Estudios recientes sugieren que la microbiota intestinal interviene en la regulación de la TA y que un estado de disbiosis intestinal contribuye a la patogénesis de la enfermedad<sup>9,10</sup>.

En 1982, se demostró que el tratamiento con antibióticos podía producir una elevación en la TA, lo que implicaba la probable relación entre microbiota intestinal y la regulación de la TA<sup>49,50</sup>. Investigaciones posteriores han confirmado dicha asociación. Yang *et al.* (2015)<sup>11</sup> en ratas espontáneamente hipertensas, observaron una disminución en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal, así como un marcado incremento en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) (principal parámetro para establecer disbiosis), sugiriendo un estado de disbiosis asociado con la HTA. En apoyo a esto, otro estudio mostró que ratas Wistar – Kyoto (WKY) normotensas al ser trasplantadas con la microbiota intestinal de ratas hipertensas presentaban un incremento significativo tanto en su TAS como en la relación F/B en comparación con las ratas WKY normotensas<sup>51,52</sup>. En concordancia, otro experimento manifestó que ratas Dahl sensibles a la sal (S), en comparación con ratas Dahl resistentes (R), tenían una abundancia significativamente mayor de las familias *S24 – 7* y *Veillonellaceae* de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, respectivamente, además que las ratas S en las que se hacía trasplante de microbiota intestinal de ratas R presentaban una mayor TA que aquellas que recibían microbiota intestinal de ratas S<sup>52,53</sup>.

En lo que respecta a las investigaciones en humanos, continúan siendo pocas y meramente observacionales. Por mencionar algunos, Yang *et al.* (2015) para corroborar la asociación entre disbiosis e HTA encontrada en ratas WKY, realizaron el análisis de la composición de la microbiota intestinal de 10 pacientes con TAS normal ( $119 \pm 2$  mm Hg) y siete pacientes con TAS elevada ( $144 \pm 9$  mm Hg), encontrando una disminución en la riqueza y una alteración en la composición de la microbiota en los individuos hipertensos comparados con los normotensos<sup>10</sup>. Asimismo, otra investigación reciente realizada en China, en la que se examinó la composición de la microbiota intestinal de 196 pacientes clasificados como controles sanos, prehipertensos (pHTN) e hipertensos (HTN) demostró que la riqueza y diversidad microbiana decrece dramáticamente en los grupos pHTN e HTN en comparación con los controles sanos; aunado a ello, los géneros *Prevotella* y *Klebsiella* se encontraron sobrerrepresentados en pHTN e HTN, *Porphyromonas* y *Actinomyces* sólo en HTN, y *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus* y *Butyrivibrio* en los controles sanos pero reducidos en pHTN e HTN. Estos últimos géneros se caracterizan por ser esenciales para mantener un estado saludable<sup>10,48</sup>.

Como se puede observar, los estudios realizados hasta el momento sobre microbiota intestinal confirman que la HTA está asociada con un estado de disbiosis. Sin embargo, el estudio de este estado de disbiosis en la patología no sólo debe centrarse en qué microorganismos se encuentran o no en el intestino, sino también en qué metabolitos bioactivos están siendo secretados por los microorganismos presentes.



Seguendo con esta línea, actualmente se sabe que son tres los principales metabolitos microbianos asociados con la HTA<sup>9,10,50</sup>:

- AGCC
- Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL – ox)
- N – óxido de trimetilamina (*TMAO* por sus siglas en inglés)

Los AGCC – como acetato, propionato y butirato – son resultado del proceso de fermentación que realiza la microbiota intestinal sobre la fibra (polisacáridos) proveniente de la dieta. Tras su producción son absorbidos al torrente sanguíneo y su principal acción relacionada con la patogénesis de la HTA es ejercida sobre receptores acoplados a proteína G (RAPGs) expresados en los riñones. Hasta el momento se conocen tres RAPGs que son regulados por los AGCC: Gpr41, Gpr43 y Olfr78 (OR152 en humanos). Su estimulación puede regular rutas metabólicas que afectan la secreción de renina y por ende la TA<sup>9,50,54,55</sup>.

Por otra parte, la disbiosis puede promover la expresión de citocinas pro – inflamatorias e inducir estrés oxidativo, lo que puede estimular la producción de LDL – ox. Estudios han mostrado que altos niveles de LDL – ox contribuyen a la HTA al inhibir la generación de óxido nítrico (NO) y endotelina – 1. El NO es un conocido vasodilatador producido mediante la oxidación de L – arginina por la NO sintasa, de modo que al provocar una reducción en los niveles de NO, LDL – ox disminuye el grado de vasodilatación. La endotelina – 1 a bajas concentraciones tiene efectos vasodilatadores al activar el receptor endotelial B (ETB) y promover la producción de NO, sin embargo, causa vasoconstricción a altas concentraciones al incrementar la producción de LDL – ox y activar el receptor endotelial A (ETA)<sup>50</sup>.

Como ya se mencionó, otro de los metabolitos microbianos que puede estar asociado con la HTA es el *TMAO*. La microbiota intestinal metaboliza la colina, fosfatidilcolina y L – carnitina provenientes de la dieta – principalmente huevo y carnes rojas – para producir trimetilamina (TMA), la cual es posteriormente oxidada a *TMAO*. En estudios pasados se ha visto que el metabolismo de la microbiota intestinal puede afectar la concentración circulante de *TMAO*, sin embargo, este metabolito únicamente había sido asociado con aterosclerosis<sup>9,50,56</sup>. El estudio más reciente conocido, y tal vez el primero que versa sobre la relación entre *TMAO* e HTA, mostró que en los individuos que poseen altas concentraciones de *TMAO* circulante el riesgo de sufrir HTA incrementa un 12% en comparación con los individuos con bajas concentraciones del metabolito<sup>57</sup>.

### 2.3.1.3. Microbiota intestinal y fármacos antihipertensivos

Desde finales de los años 50 los investigadores han sabido que la microbiota intestinal afecta el modo en que los fármacos, y xenobióticos en general, son metabolizados, y estudios recientes realizados con levodopa, irinotecán y digoxina han mostrado que tiene una relación directa con su eficacia al convertirlos

en metabolitos activos, inactivos e incluso tóxicos<sup>58,59</sup>. En este sentido, la totalidad de genes que alberga la microbiota intestinal le convierten en un amplio repositorio enzimático con potencial para metabolizar fármacos administrados oralmente, lo cual lleva a cabo a través de dos principales tipos de reacciones: reducción e hidrólisis (particularmente en conjugados)<sup>60</sup>. Las enzimas involucradas con estas reacciones metabólicas mediadas por la microbiota intestinal son  $\beta$  – glucosidasas,  $\beta$  – glucuronidasas, sulfatasas, azorreductasas, nitrorreductasas y nitrato reductasas<sup>61</sup>. Cabe mencionar que también se han descrito otro tipo de reacciones como descarboxilaciones, deshioxilaciones, desalquilaciones, deshalogenaciones y desaminaciones<sup>62</sup>.

En la actualidad, son pocos los estudios que prueban el efecto de la microbiota sobre los fármacos antihipertensivos. A mencionar, se ha visto que la incubación *ex – vivo* de amlodipino, un antihipertensivo de la clase BCC, con suspensiones fecales tanto de rata como de humano provoca un decremento en su concentración junto con un aumento en la concentración de su metabolito mayoritario. Aunado a ello, también en ratas, se observó que la administración oral simultánea del antihipertensivo y ampicilina (antibiótico) provocaba una mejor absorción del fármaco en el tracto GI debido a la supresión de la actividad metabólica de la microbiota intestinal. Con estos resultados es posible deducir que la microbiota intestinal puede mediar interacciones fármaco – fármaco y que una alteración en su composición puede derivar en una variación en el control de la TA cuando se está bajo tratamiento farmacológico<sup>60-62</sup>. En apoyo a esto, en otro estudio se comprobó que hay fármacos que son metabolizados por al menos un microorganismo del tracto GI, entre dichos fármacos se encontraban antihipertensivos como verapamil, valsartán y olmesartán<sup>59</sup>.

Es preciso recordar que la interacción entre microbiota intestinal y fármacos es de dos sentidos, es decir, también los fármacos pueden tener impacto sobre la microbiota, claro ejemplo de ello son los antibióticos como la ampicilina mencionada en el párrafo anterior. De igual manera, este fenómeno ha sido poco descrito para los antihipertensivos. En un estudio en el que se trató a ratas hipertensas con captopril, antihipertensivo de la clase de los IECA, se observó una reversión del estado de disbiosis asociado con la HTA debida a una disminución en la permeabilidad y fibrosis intestinal, así como a una mejora en la longitud de las vellosidades del tracto GI<sup>60</sup>.

Como se puede ver, aún se necesita trabajar para determinar la relación exacta entre microbiota intestinal e HTA y todavía más para saber cuál es el impacto que dicha relación puede tener sobre los fármacos antihipertensivos<sup>60</sup>.

#### 2.3.1.4. Microbiota intestinal y métodos de estudio

A lo largo del tiempo, múltiples métodos han sido utilizados para estudiar la microbiota intestinal. Los primeros estudios usaban técnicas tradicionales de cultivos bacterianos, seguidas por la identificación de los microorganismos a partir de sus características morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, la mayoría de las bacterias presentes en el tracto GI son anaerobias, por lo que este método al favorecer el crecimiento de organismos aerobios, subestimaba significativamente la diversidad presente en el intestino<sup>12</sup>.

Con el avance de la tecnología, a finales del siglo XX se desarrollaron técnicas moleculares que han permitido estudiar la microbiota desde otra perspectiva: su genoma (o microbioma), superando así las limitaciones de los métodos tradicionales<sup>12</sup>. Actualmente, la secuenciación genómica es la técnica más utilizada y su constante mejoramiento ha permitido tener un mayor conocimiento sobre la composición y funciones de la microbiota intestinal y de la microbiota en general, así como del papel que juega dentro de la fisiología y homeostasis del hospedero<sup>9</sup>.

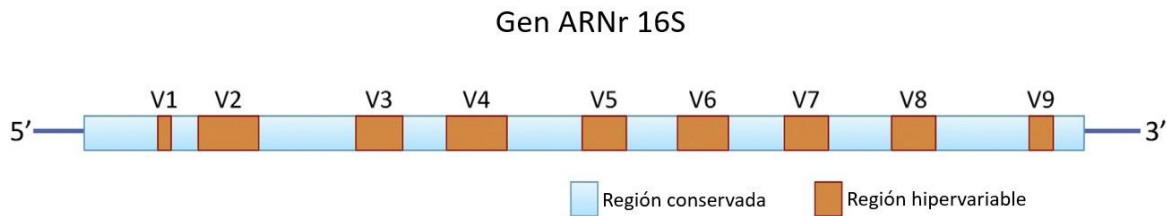
En este sentido, se pueden distinguir tres principales análisis basados en la secuenciación del genoma:

- Metataxonómica: se refiere a la secuenciación de genes marcadores, usualmente regiones de los genes ribosomales (ARNr) que se encuentran altamente conservadas entre taxones; estos incluyen al gen ARNr 16S de bacterias, gen ARNr 18S de eucariotas y a la región *ITS* (*internal transcribed spacer* o espaciador transcrito interno) en hongos<sup>63</sup>. Es utilizada para caracterizar la composición filogenética microbiana de una muestra<sup>9</sup>.
- Metagenómica: se refiere a la secuenciación masiva aleatoria de ADN (ácido desoxirribonucleico) microbiano o *shotgun*, por el término en inglés, sin seleccionar un gen en particular<sup>63,64</sup>. Este tipo de análisis identifica todos los genomas microbianos co – existentes en un mismo sitio junto con sus funciones biológicas<sup>9</sup>.
- Metatranscriptómica: se refiere a la captura y secuenciación de todo el ARN (ácido ribonucleico) presente en una muestra, lo que puede ayudar a crear un perfil de todos los genes que son transcripcionalmente activos, y por ende saber cuál es su abundancia relativa <sup>63</sup>.

Aunque hoy en día el uso de la metagenómica y la metatranscriptómica se encuentra en auge, la metataxonómica sigue siendo el análisis más utilizado y de primera elección para el estudio de la microbiota intestinal, sobre todo cuando el tema de interés se encuentra en fases iniciales de investigación. Como se mencionó anteriormente este tipo de análisis se basa en genes marcadores, siendo la base de estudio de la microbiota intestinal el gen ribosomal bacteriano ARNr 16S<sup>12,63</sup>.

El gen ARNr 16S tiene una longitud aproximada de 1500 nucleótidos con ciertas variaciones entre especies. Posee múltiples regiones altamente conservadas que se intercalan con nueve regiones hipervariables (V1 a

V9) (Figura 4). La variación de nucleótidos en estas regiones hipervariables refleja la divergencia evolutiva de las bacterias y por lo tanto, conocer su secuencia constituye un método confiable para la identificación y clasificación filogenética de estos microorganismos<sup>12,65</sup>.



**Figura 4.** Representación del gen ribosomal bacteriano ARNr 16S. Imagen modificada. Se muestran las nueve regiones hipervariables que conforman al gen (café) y las regiones conservadas (azul). Fuente: Sarangi et al. (2019)

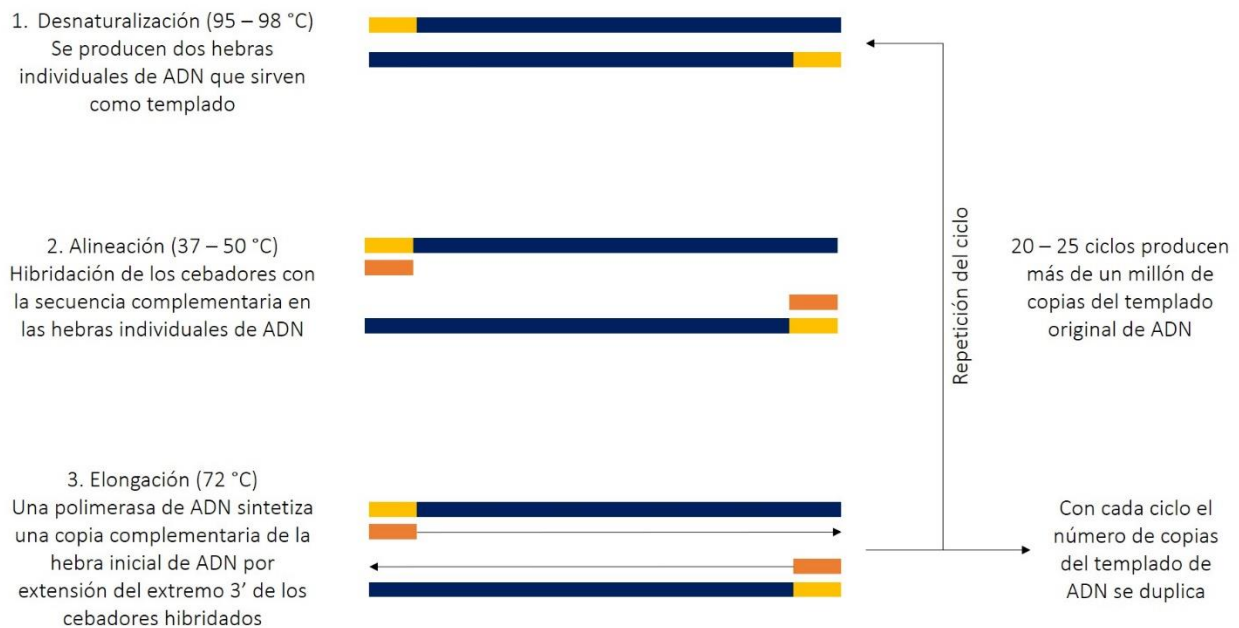
El flujo de trabajo que se sigue para el estudio de la microbiota con este gen consiste en tres pasos clave.

1. Extracción de ADN. El uso de diferentes protocolos de extracción de ADN puede resultar en distintos perfiles de diversidad microbiana debido tanto a la cantidad como calidad (pureza e integridad) del material genético. El principal factor que influye en estas dos propiedades es el tipo de lisis bacteriana empleada, mecánica o química, ya que algunos tipos de células pueden ser resistentes a uno u otro procedimiento. En el mercado existen distintos kits para la extracción de ADN bacteriano, los cuales suelen incluir uno de los dos métodos de lisis, o ambos<sup>66-70</sup>. Entre los protocolos más utilizados y con mayor efectividad se encuentran *PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.), *NucleoSpin® DNA Stool Kit* (MACHERY – NAGEL GmbH & Co., Inglaterra), *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Alemania), *ZR Fecal DNA MiniPrep™ Kit* (Zymo Research, E.U.A.) y el protocolo Q (no comercial) recomendado por el Consorcio Internacional de Microbioma Humano (IHMS por sus siglas en inglés, *International Human Microbiome Consortium*)<sup>71</sup>.
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen ARNr 16S. La técnica de PCR es un método *in vitro* de amplificación enzimática de ADN a una velocidad exponencial que involucra un proceso cíclico repetitivo compuesto por tres fases definidas: desnaturalización, alineación y elongación (Figura 5)<sup>72</sup>.

Mediante esta técnica se lleva a cabo la amplificación de las regiones hipervariables de interés del gen ARNr 16S utilizando cebadores “universales” que hibriden con las regiones altamente conservadas que las flanquean<sup>63,65</sup>. En el caso de la microbiota intestinal suelen amplificarse las regiones V3 – V4, ya que al ser las regiones más utilizadas en este tipo de estudios permiten la generación de datos comparables, además se ha visto que en contraste con otras regiones

producen una mejor calidad en los datos de secuenciación y permiten la identificación de una mayor diversidad bacteriana<sup>73,74</sup>.

Aunque poco apreciado, el paso de amplificación mediante PCR del gen ARNr 16S es crítico en la generación de datos de secuenciación para describir la composición taxonómica de las comunidades microbianas estudiadas. Esta parte del procedimiento puede tener impacto sobre la tasa de errores de secuenciación, la presencia de secuencias quiméricas y la abundancia de los taxones identificados. Específicamente se ha visto que usar polimerasas de alta fidelidad y minimizar el número de ciclos de la reacción produce mejores resultados con respecto a las características mencionadas<sup>75</sup>.



**Figura 5.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la imagen se muestran las 3 fases que conforman la PCR. En azul se muestra el templado de ADN (hebras originales), en amarillo la parte de la secuencia original que es complementaria a los cebadores y en naranja los cebadores. Imagen de creación propia.

3. Secuenciación y análisis bioinformático. Los productos de amplificación se someten a secuenciación en la plataforma elegida. Entre las más conocidas hasta el momento se encuentran *Illumina MiSeq*, *Roche 454* y *Thermo Fisher Ion Torrent*. Posteriormente, las secuencias de ADN generadas por estas plataformas son sometidas a un análisis bioinformático con herramientas como QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology* por sus siglas en inglés) o mothur; este análisis de manera general consiste en filtrar por calidad, corregir errores generados durante el proceso de secuenciación, eliminar secuencias quiméricas, agrupar las lecturas de acuerdo a la similitud que hay entre ellas, realizar la asignación taxonómica de los grupos generados y llevar a cabo análisis de

diversidad<sup>63,65</sup>. Esta fase del proceso tiene injerencia directa sobre la variedad taxonómica hallada, por tanto, puede afectar las conclusiones biológicas a las cuales se llegue tras los análisis estadísticos aplicados en el estudio<sup>76</sup>.

La principal ventaja de la identificación bacteriana basada en la secuenciación del gen ARNr 16S es que no se necesitan realizar cultivos bacterianos y, por tanto, es posible detectar tanto a las bacterias que son cultivables como aquellas que no lo son. Aunado a esto, la existencia de bases de datos específicas para el gen ARNr 16S agiliza la asignación taxonómica que involucra el análisis bioinformático, ya que la cantidad de secuencias a cotejar es menor en comparación con bases de datos genómicas. Por el contrario, la principal desventaja, no sólo del uso del gen ARNr 16S, sino de la metataxonómica en general, radica en que no permite la captura de virus, puesto que no poseen genes conservados análogos al ARNr 16S o 18S<sup>12,63,65</sup>. Sin embargo, sigue siendo la herramienta más aceptable, sobre todo en estudios pioneros o exploratorios.

Cabe señalar que existen otras técnicas que no se basan en la secuenciación, como la metaproteómica, que lleva a cabo la caracterización de todo el complemento proteico presente en una muestra en un momento determinado y la metabolómica, que realiza la determinación del perfil de metabolitos en un espécimen o tejido. Ambas técnicas también contribuyen significativamente a nuestro entendimiento de la relación entre microbiota y hospedero<sup>9,12</sup>.

### **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

La HTA es la principal causa de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, discapacidad y muertes prematuras en todo el mundo. Tiene una prevalencia del 25.5% en México y afecta a aproximadamente el 50% de adultos mayores, de los cuales al menos la mitad no tienen control de sus niveles de TA aun con tratamiento farmacológico. Estas cifras de prevalencia se verán acentuadas en los próximos años como consecuencia del incremento en la expectativa de vida y en la proporción de adultos mayores dentro de la sociedad. Actualmente, el estudio de la falla terapéutica en la HTA se ha centrado en factores genéticos y farmacogenéticos, sin embargo, el impacto de variables como la microbiota intestinal no ha sido caracterizado a detalle. En este sentido, descifrar parte de las bases moleculares de esta problemática podrá, en un futuro próximo, mejorar la eficacia terapéutica y el control de la enfermedad mediante el desarrollo de intervenciones clínicas.

## **CAPÍTULO 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar si existen diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes con niveles de tensión arterial controlada *versus* no controlados en adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico.

### **4.2. Objetivos particulares**

- Caracterizar la microbiota intestinal de un grupo de adultos mayores mexicanos hipertensos bajo tratamiento farmacológico
- Identificar diferencias entre grupos de estudio en cuanto a abundancia y diversidad tanto a nivel taxonómico como funcional de la microbiota intestinal.

### **4.3. Hipótesis**

La composición de la microbiota intestinal mostrará diferencias significativas entre pacientes hipertensos controlados y no controlados.



## CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Población de estudio y consideraciones éticas

Se llevó a cabo un estudio transversal descriptivo de la microbiota intestinal bacteriana, a partir de heces, de una submuestra de 69 sujetos de la “Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en Adultos Mayores Mexicanos” (COSFAMM), creada en 2014 con el fin de estudiar las afecciones mencionadas en sus siglas y conformada por 1252 adultos mayores ( $\geq 60$  años) bajo condiciones de salud heterogéneas y elegidos aleatoriamente de una lista de afiliados a 48 Unidades de Medicina Familiar (UMF) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)<sup>77-79</sup>.

La población de estudio surgió de una base de datos con el registro de 341 pacientes pertenecientes a COSFAMM. Dicha base de datos fue depurada utilizando los siguientes criterios de inclusión:

- Ser mexicano
- Tener diagnóstico previo de HTA.
- Estar bajo tratamiento farmacológico con ARA II (solo o en combinación).
- Tener al menos un registro de TA generado en el momento de la entrega de la muestra de materia fecal.

Debido al impacto que tienen en la microbiota intestinal, los criterios de exclusión a considerar fueron los siguientes<sup>70</sup>:

- Padecer alguna comorbilidad neurodegenerativa.
- Padecer cáncer.
- Haber usado antibióticos al menos dos meses antes de la recolección de la muestra de materia fecal.
- Haber cursado con infección GI en los tres meses previos a la recolección de la muestra fecal.

Con lo anterior se generó una submuestra de 74 pacientes, a los cuales se aplicaron los siguientes criterios de eliminación:

- No haber amplificación de las regiones V3 – V4 del gen ARNr 16S a partir del ADN extraído
- Contar con menos de 3,000 secuencias tras el análisis bioinformático con DADA2

La submuestra final constó de 69 pacientes cuyas características clínicas y demográficas se presentan en la **Tabla 2**, que fueron clasificados en dos grupos de acuerdo con su control de TA:

- Hipertensos controlados (CHTA+): Valores de TAS  $< 140$  mmHg o TAD  $< 90$  mmHg.
- Hipertensos no controlados (CHTA-): Valores de TAS  $\geq 140$  mm Hg o TAD  $\geq 90$  mmHg.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) con el número de dictamen CEI 2018/25 (**Anexo I**). Todos los pacientes aceptaron proporcionar su consentimiento informado para participar en este proyecto.

**Tabla 2.** Características clínicas y demográficas de la población de estudio.

Criterio	Media $\pm$ D.E. (mínimo - máximo) o n (%)
Número de pacientes	69
TAS, mmHg	129.6 $\pm$ 18.71 (94 – 187)
TAD, mmHg	70.93 $\pm$ 10.69 (47 – 101)
Sexo	
Mujeres	38 (55.1)
Hombres	31 (44.9)
Edad (años)	
60 – 69	37 (53.6)
70 – 79	23 (33.3)
$\geq$ 80	9 (13.0)
Control de TA	
Hipertensos controlados (cHTA+)	53 (76.8)
Hipertensos no controlados (cHTA-)	16 (23.2)
Estado nutricional <sup>a</sup>	
Obesidad	25 (36.2)
Sobrepeso	21 (30.4)
Peso normal	22 (31.9)
Peso bajo	1 (1.4)
Diabetes	
Pacientes diabéticos	34 (49.3)
Pacientes no diabéticos	35 (50.7)

a. Clasificación de acuerdo con los valores de índice de masa corporal establecido en la Guía de Referencia Rápida IMSS – 095 – 08 (Actualización 2014)<sup>80</sup>.

## 5.2. Recolección de muestras de materia fecal

Las muestras de materia fecal fueron recolectadas por los pacientes de acuerdo con un instructivo diseñado por INMEGEN y CMN SXXI (**Anexo II**). Las heces fueron depositadas en contenedores estériles con 1 mL de *RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen™, E.U.A)*, agente preservador de ácidos nucleicos (ADN/ARN) que bajo condiciones frías protege contra degradación, y conservadas a 4°C hasta su entrega al médico tratante en CMN SXXI (máximo 24 horas después) donde fueron resguardadas a -70°C hasta su transferencia en hielo seco al laboratorio de farmacogenómica de INMEGEN, lugar en que se almacenaron inmediatamente a -70°C<sup>81-83</sup>.

### 5.3. Extracción de ADN

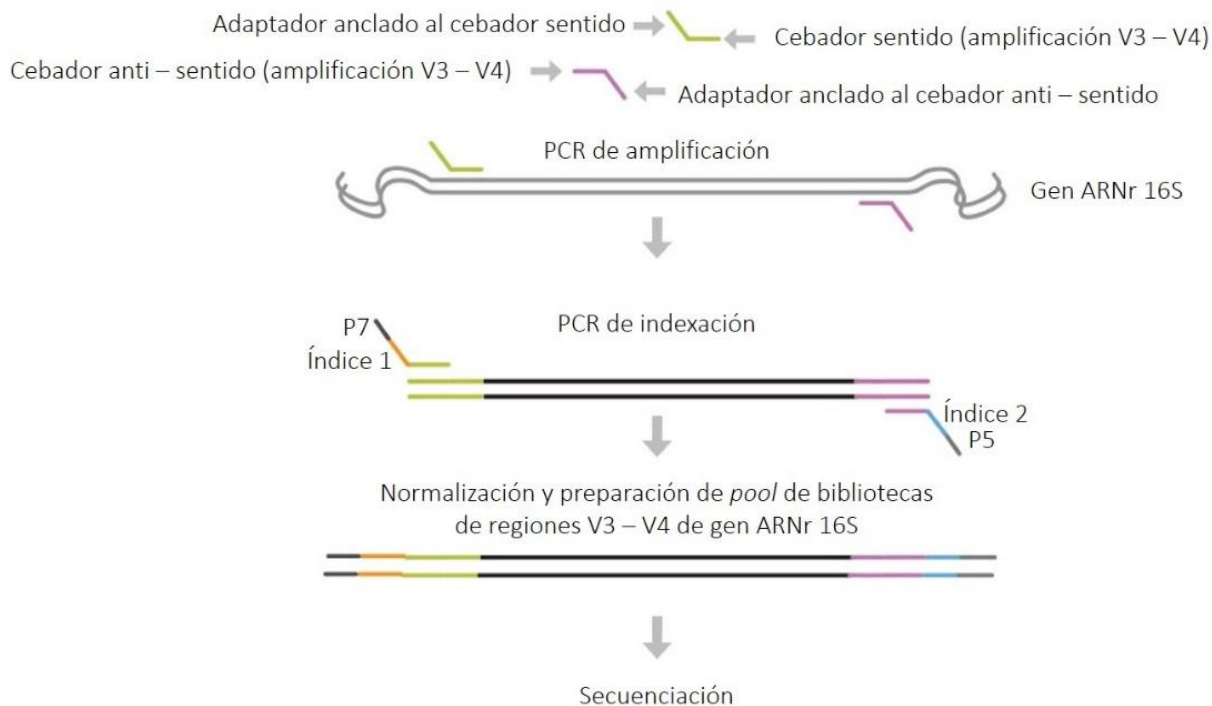
La extracción de ADN se efectuó a partir de 180 a 220 mg de materia fecal, pesada en condiciones estériles dentro de una campana de flujo, con el kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (*Qiagen*, Alemania) haciendo algunas modificaciones a las recomendaciones del fabricante:

- Tras la adición del buffer de lisis (ASL), las alícuotas se incubaron de 50 – 60°C en baño María por cinco minutos, lo que mejoró la lisis de las células bacterianas y la integridad del ADN obtenido.
- El ADN fue eluido en 100 µL de agua libre de nucleasas con el fin de incrementar su concentración final.

Posteriormente, se evaluó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, lo cual permitió observar su integridad. El ADN fue cuantificado por espectrofotometría UV usando un equipo *NanoDrop One* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.), y posteriormente diluido en agua libre de nucleasas a una concentración de 50 ng/µL.

### 5.4. Secuenciación del gen ARNr 16S

La preparación de bibliotecas para la secuenciación de las regiones V3 – V4 del gen ARNr 16S se llevó a cabo en dos lotes (L1018 y L0219). Cabe mencionar que con esta metodología únicamente se caracterizó la fracción bacteriana de la microbiota intestinal. Se siguió el protocolo “*16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*” de *Illumina* (**Figura 6**) con algunas modificaciones. Los procedimientos se explican a continuación.



**Figura 6.** Procedimiento para la preparación de bibliotecas del gen ARNr 16S. Imagen modificada. Para la elaboración de las bibliotecas se realizó una primer PCR usando cebadores específicos para las regiones V3 – V4 del gen ARNr 16S, los cuales incluyen una región adaptadora. Posteriormente, con una segunda PCR, se añadieron los índices (Índice 1/Índice 2) para introducir una combinación única de identificación para cada muestra, así como las secuencias adaptadoras P5/P7, las cuales hibridaron con la célula de flujo del sistema de secuenciación. Se preparó un *pool* de concentración equimolar de todas las muestras (normalización), para finalmente poder llevar a cabo el proceso de secuenciación<sup>84</sup>. Adaptada de *Illumina* (2013)

#### 5.4.1. PCR de amplificación

En esta primera etapa se realiza una PCR para amplificar las regiones de interés del gen ARNr 16S utilizando cebadores específicos que tienen anclada una región adaptadora. En este proyecto, las regiones de interés fueron V3 – V4, puesto que se ha demostrado que permiten generar resultados con una mejora tanto cualitativa (calidad en las lecturas producto de la secuenciación, eficiencia en el ensamblaje de lecturas, confiabilidad en la asignación taxonómica) como cuantitativa (identificación de una mayor diversidad bacteriana, obtención de un mayor número de lecturas por muestra), cuando se trabaja con muestras fecales con la tecnología de secuenciación *MiSeq* (*Illumina*, E.U.A.), en comparación con otras regiones<sup>73,74</sup>. Además de que su amplificación permitió la obtención de datos comparables y reproducibles, ya que son las regiones de primera elección en la mayoría de los estudios de microbiota intestinal humana.

De este modo, los cebadores empleados fueron (entre corchetes región adaptadora empleada):

- Sentido: 5' - [TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG]-CCTACGGGNGGCWGCAG
- Anti-sentido: 5' - [GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG]-GACTACHVGGGTATCTAATCC

A continuación, se preparó una mezcla de reacción:

<i>2X Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix (Invitrogen™, E.U.A.)</i>	15.0 µL
Cebador sentido (10 pM)	0.25 µL
Cebador antisentido (10 pM)	0.25 µL
ADN (50 ng/L)	4.0 µL
Agua libre de nucleasas	10.5 µL
Volumen final	30 µL

Las muestras fueron sometidas a amplificación en termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, E.U.A.)*, el cual se programó de la siguiente manera:

- 95°C por tres minutos
- 25 ciclos de:
  - 95°C por 30 segundos
  - 55°C por 30 segundos
  - 72°C por 30 segundos
- 72°C por cinco minutos
- 4°C ∞

Posteriormente, utilizando 5 µL de muestra se verificó que los productos de amplificación tuvieran el tamaño esperado (~550 pb) mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. En caso positivo se procedió con el proceso de purificación.

#### **5.4.2. Primera purificación**

Los productos de PCR (25 µL) fueron purificados utilizando perlas magnéticas (*ChargeSwitch® PCR Clean – Up kit de Invitrogen™, E.U.A.*) con el fin de remover cebadores, dNTPs (dinucleótidos trifosfatados), sales y algún otro agente que pudiera interferir en los pasos posteriores<sup>85,86</sup>.

#### **5.4.3. PCR de indexación**

En esta fase se utilizan los adaptadores, previamente anclados a los amplicones de la primer PCR, para añadir tanto los índices (Índice 1/Índice 2) que generarán una combinación única de identificación para cada muestra, como las secuencias adaptadoras (P5/P7) que hibridarán con la célula de flujo del sistema de secuenciación<sup>84</sup>.

Por tanto, para llevar a cabo esta PCR la mezcla de reacción consistió en:

<i>2X Platinum™SuperFi™PCR Master Mix (Invitrogen™, E.U.A.)</i>	25.0 µL
NTXX ( <i>Nextera XT Index kit de Illumina, E.U.A.</i> )	5 µL
S5XX ( <i>Nextera XT Index kit de Illumina, E.U.A.</i> )	5 µL
ADN purificado de la 1 <sup>er</sup> PCR	5.0 µL
Agua libre de nucleasas	10 µL
Volumen final	50 µL

Posteriormente, las condiciones que se establecieron en el termociclador *GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems, E.U.A.)* para llevar a cabo la reacción fueron:

- 95°C por tres minutos
- 6 ciclos de:
  - 95°C por 30 segundos
  - 55°C por 30 segundos
  - 72°C por 30 segundos
- 72°C por cinco minutos
- 4°C ∞

El resultado final de este proceso fueron las bibliotecas del gen ARNr 16S<sup>84</sup>, con un tamaño esperado de ~630 pb, puesto que cada índice tiene de 8 a 12 pb, mientras que cada región adaptadora (P5/P7) tiene ~30 pb. Las bibliotecas también fueron sometidas a purificación.

#### 5.4.4. Segunda purificación

Las bibliotecas (50 µL) fueron purificadas con perlas magnéticas (*ChargeSwitch®PCR Clean – Up kit de Invitrogen™, E.U.A.*) para eliminar cebadores, restos de polimerasa y cualquier otra sustancia distinta al ADN indexado que pudiera provocar interferencia en el proceso de secuenciación.

#### 5.4.5. Validación de bibliotecas del gen ARNr 16S

La validación de las bibliotecas consistió en verificar la adición de los índices a los amplicones de la región V3 – V4 del gen ARNr 16S, determinando si su tamaño era el esperado (~630 pb) mediante electroforesis automatizada con el equipo *4200 TapeStation (Agilent, E.U.A.)*.

#### 5.4.6. Cuantificación, normalización y secuenciación de bibliotecas del gen ARNr 16S

Las bibliotecas que pasaron el proceso de validación fueron cuantificadas mediante espectrofluorimetría (*Qubit®2.0 Fluorometer*), normalizadas a 10.2 nM y finalmente mezcladas en un *pool* que tuvo una concentración final de 2.2 nM. La secuenciación se llevó a cabo en el equipo *Illumina MiSeq (Illumina, E.U.A.)*. Para el lote L1018 se utilizó el kit *MiSeq Reagent V3* de 600 ciclos (*Illumina, E.U.A.*), mientras que

para el lote L0219 se utilizó el kit *MiSeq Reagent V2* de 500 ciclos (*Illumina*, E.U.A.). En ambos casos se generaron secuencias pareadas de 300 y 250 pb, respectivamente.

## 5.5. Análisis bioinformático y estadístico<sup>1</sup>

Producto de la secuenciación se obtuvieron dos archivos *fastq.gz* para cada muestra, los cuales contenían las lecturas sentido y anti – sentido generadas. Tales archivos fueron procesados con el programa *FastQC* con el fin de verificar que las secuencias, efectivamente, se encontraran libres de cebadores y adaptadores. Los archivos *fastq.gz*, junto con un archivo de metadatos (edad, sexo, diabetes, estado nutricional y control de HTA), fueron importados a QIIME2 2019.1. A continuación, utilizando el *plugin dada2* se realizó el filtrado de calidad de las lecturas, así como la construcción de ASVs (*Amplicon Sequence Variants* por sus siglas en inglés, o variantes de secuencia de amplicones) para cada lote. Los pasos seguidos por DADA2 fueron<sup>87–90</sup>:

- Filtración: El programa eliminó las secuencias que tuvieran una calidad (medida como *Phred score* o Q) menor a dos, y/o más de dos bases ambiguas (es decir, bases que, al no poder ser dilucidadas por el sistema de secuenciación, fueron representadas como “N”).
- Derreplicación: Se generó una lista de secuencias únicas, junto con la abundancia en que cada una de ellas se encontraba, es decir, el número de veces que se repetía.
- Eliminación de secuencias ruido o *denoising*: DADA2 implementó un algoritmo que generó un modelo paramétrico de errores de secuenciación, único para cada corrida y lo utilizó posteriormente para inferir la composición biológica verdadera de cada secuencia.
- Unión de secuencias o *merging*: Se llevó a cabo el alineamiento entre las últimas 20 bases de las secuencias sentido y anti – sentido; cuando se presentó un traslape exacto de las mismas, se unieron, generando una secuencia nueva de mayor longitud.
- Remoción de quimeras: Se identificaron y eliminaron aquellas secuencias que fueran resultado de la unión de dos secuencias de origen biológico distinto, dejando únicamente las secuencias no quiméricas.

Posterior al procesamiento con DADA2, se llevó a cabo la normalización de las secuencias no quiméricas con el fin de hacer comparables los dos lotes secuenciados. Una vez normalizados, los datos de ambos lotes se unificaron para la generación de ASVs, de modo que para cada ASV se obtuvo: un número de identificación único, una secuencia representativa y su frecuencia absoluta en cada muestra. Con ello como base se prosiguió con los análisis descritos a continuación.

---

<sup>1</sup> Todas las pruebas estadísticas y gráficos presentados fueron realizados con la plataforma *RStudio*.

### 5.5.1. Análisis de alfa – diversidad

La alfa – diversidad hace referencia a la variabilidad de bacterias en un individuo. Los parámetros que se utilizan para describirla son<sup>70,91,92</sup>:

- Riqueza: Número de especies diferentes presentes en una muestra.
- Equidad: Homogeneidad de las frecuencias relativas de las diferentes especies de una muestra.

Las métricas para reportar alfa – diversidad fueron el índice Chao1 y el índice de diversidad de Shannon, ambos calculados con QIIME2 2019.1 a partir de la tabla de ASVs. El índice Chao1 mide la riqueza de las muestras y es comúnmente utilizado puesto que toma en consideración a aquellas especies que, debido a las limitaciones propias del proceso de secuenciación, se encuentran en baja proporción y que por tanto, podrían pasar desapercibidas en el análisis. El índice de Shannon se caracteriza por relacionar tanto riqueza como equidad, permitiendo caracterizar de mejor manera la diversidad de las muestras<sup>91,93,94</sup>.

Para identificar posibles diferencias en la alfa – diversidad entre cHTA+ y cHTA-, se realizaron las pruebas estadísticas t de Student (distribución paramétrica) y U de Mann – Whitney (distribución no paramétrica), y se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$ . La normalidad de los datos se determinó con la prueba Shapiro – Wilk<sup>95</sup>.

### 5.5.2. Análisis de beta – diversidad

La beta – diversidad describe la diferencia que existe en la composición bacteriana entre muestras, es decir, evalúa si los individuos difieren en cuanto a qué bacterias albergan en su tracto GI. Tal diferencia es definida calculando la distancia entre muestras a partir de distintos parámetros, los cuales pueden ser cuantitativos, es decir, toman en cuenta la abundancia relativa de los ASVs en cada muestra, o cualitativos, los cuales únicamente se basan en si el ASV está o no presente. Además, pueden o no involucrar el componente filogenético de los ASVs. Para el presente estudio, se obtuvo una matriz de distancias ponderadas UniFrac (métrica de carácter cuantitativo y filogenético) mediante QIIME2 2019.1, la cual fue representada con un análisis de coordenadas principales (PCoA) con el fin de evaluar visualmente si existía o no separación de las muestras de acuerdo a su clasificación como cHTA+ y cHTA-<sup>70,91,92</sup>.

### 5.5.3. Análisis taxonómico

La asignación taxonómica de los ASVs se llevó a cabo en QIIME2 2019.1 empleando un clasificador previamente entrenado con las secuencias e información taxonómica de la base de datos SILVA 132 (actualizada por última vez el 10 de abril de 2018, <https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime>) y tomando un porcentaje mínimo de similitud (con las secuencias de referencia) del 90%<sup>96</sup>. Para los filos y géneros resultantes se realizaron las pruebas estadísticas t de Student (datos con distribución paramétrica) y U de Mann – Whitney (datos con distribución no paramétrica) con el fin de evaluar si su abundancia era



significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre pacientes cHTA+ y cHTA-. La normalidad de los datos se evaluó con la prueba Shapiro – Wilk, considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo<sup>95</sup>. Cabe mencionar que con el fin de corroborar si había un estado de disbiosis entre los grupos de interés, se calculó la relación F/B para cada muestra<sup>97</sup>. La comparación estadística entre grupos para este parámetro se llevó a cabo con la prueba U de Mann – Whitney tras evaluar su normalidad con la prueba Shapiro – Wilk. Para ambas pruebas, se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

Adicionalmente, se usó la interfaz gráfica de LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size* por sus siglas en inglés), incorporada en Galaxy (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>), para determinar los posibles taxones, a nivel de filo y género, que permitiesen diferenciar entre cHTA+ y cHTA-. LEfSe es un algoritmo, altamente empleado en los estudios de microbiota, que involucra las pruebas estadísticas Kruskal – Wallis, Wilcoxon y ADL (análisis discriminante lineal), para la identificación de posibles biomarcadores que indiquen la divergencia entre dos o más clases. Para el presente estudio se consideró que los microorganismos podían ser biomarcadores potenciales con un valor de  $ADL \geq 2$ <sup>93</sup>.

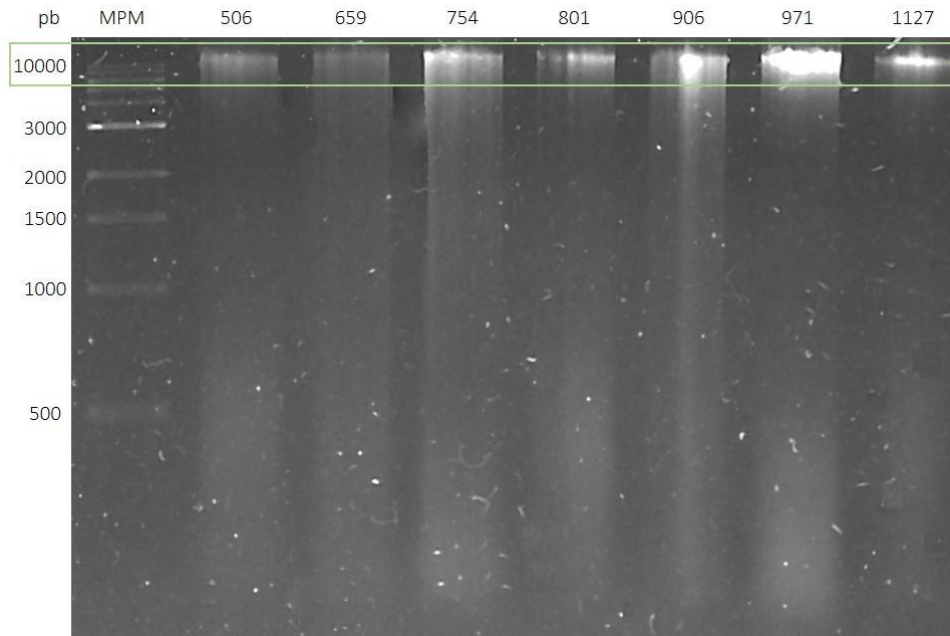
#### **5.5.4. Análisis de composición funcional**

Utilizando el *plugin* de PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) incluido en QIIME2 2019.2, se llevó a cabo la predicción de las características funcionales de las muestras involucradas. Para ello, el número de secuencias fue normalizado considerando el número de copias del gen ARNr 16S presente en cada organismo. Posteriormente, dicho número normalizado fue multiplicado por la frecuencia reportada en la base de datos *MetaCyc Metabolic Pathway* para cada gen (o función). El resultado obtenido fue la abundancia “real” de las funciones identificadas en las muestras<sup>92,98,99</sup>. Para comprobar si existían diferencias a nivel funcional entre cHTA+ y cHTA-, se realizaron las pruebas estadísticas t de Student (datos con distribución paramétrica) y U de Mann – Whitney (datos con distribución no paramétrica), considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo. La normalidad de los datos se evaluó con la prueba Shapiro – Wilk<sup>95</sup>.

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS

### 6.1. Extracción de ADN

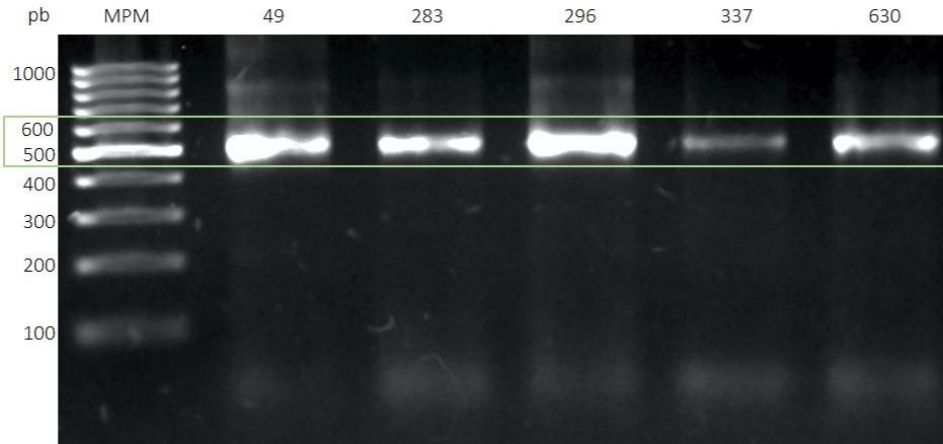
A partir de la evaluación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, se determinó que las 74 muestras tenían la calidad suficiente, en términos de integridad, para su uso en la preparación de bibliotecas del gen ARNr 16S, pues como se observa en la **Figura 7**, se obtuvieron bandas definidas de alto peso molecular, y una baja degradación.



**Figura 7.** Evaluación de integridad de ADN. Gel de agarosa al 1% teñido con *SYBR Safe DNA Gel Stain 10000X* (Invitrogen, E.U.A.). Para cada muestra se añadieron 5  $\mu$ L (250 ng) de ADN y 1  $\mu$ L de *6X DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.). El gel se corrió en cámara de electroforesis (*Cleaver Scientific*, Inglaterra) a 100 volts por 60 minutos. En el recuadro verde se muestra que el ADN tiene una longitud mayor a 10,000 pb. MPM: Marcador de Peso Molecular. pb: pares de bases.

### 6.2. Amplificación de las regiones V3 -V4 del gen ARNr 16S

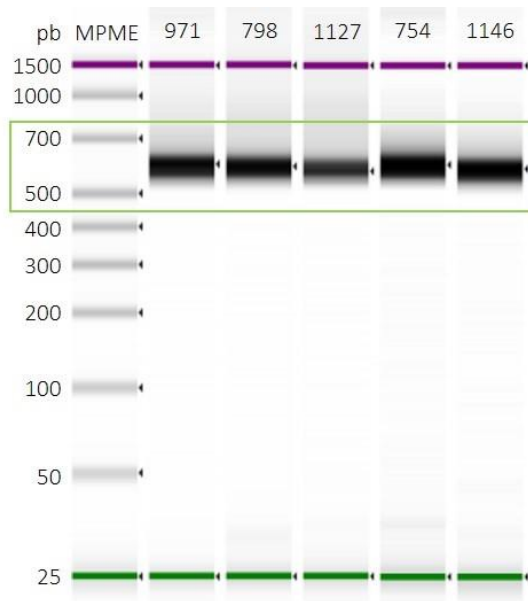
La amplificación de las regiones V3 – V4 del gen ARNr 16S se llevó acabo de manera exitosa en 71 muestras, obteniendo fragmentos con tamaño entre 500 y 600 pb (**Figura 8**), equivalentes al peso esperado (~ 550 pb). Las tres muestras en las cuales no fue posible la amplificación se eliminaron del proceso experimental.



**Figura 8.** Evaluación del tamaño de los amplicones de las regiones V3 - V4 del gen ARNr 16S. Gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe DNA Gel Stain 10000X* (Invitrogen, E.U.A.). Para cada muestra se añadieron 5  $\mu$ L de ADN y 1  $\mu$ L de *6X DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.). El gel se corrió en cámara de electroforesis (*Cleaver Scientific*, Inglaterra) a 100 volts por 40 minutos. En el recuadro verde se observa que los amplicones tienen un tamaño de entre 500 y 600 pb. MPM: Marcador de Peso Molecular. pb: pares de bases.

### 6.3. Validación de bibliotecas del gen ARNr 16S

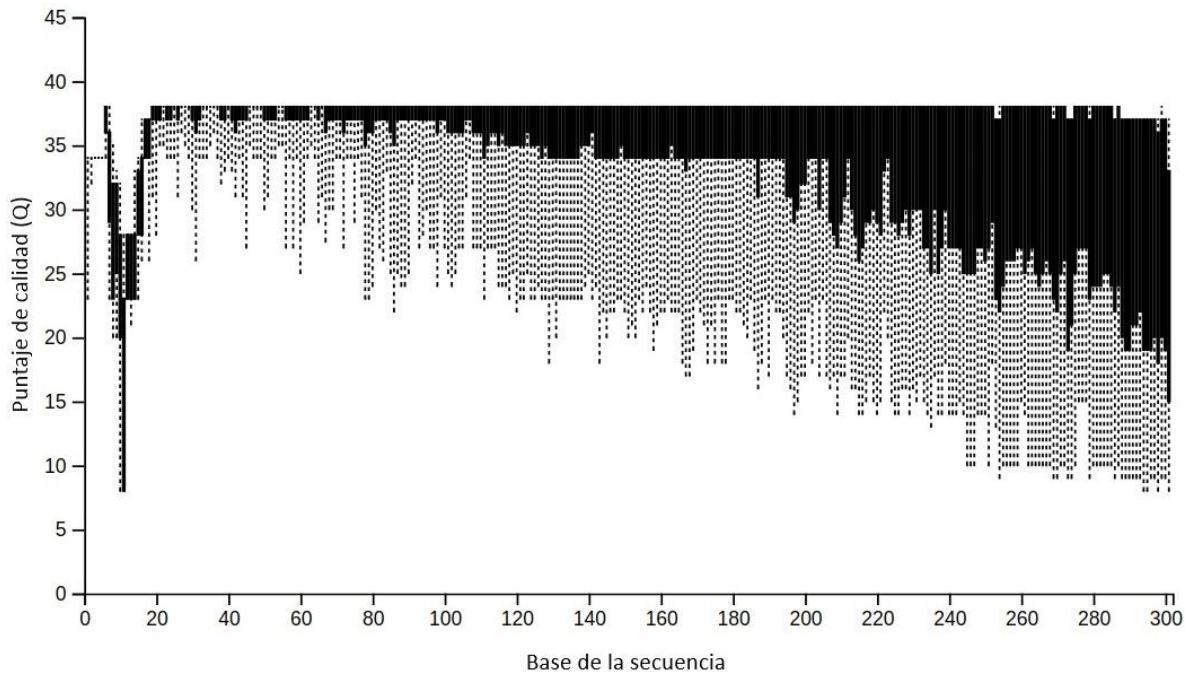
Con la PCR de indexación se logró la adición tanto de los índices como de las secuencias adaptadoras P5/P7 en las 71 muestras procesadas, ya que como se muestra en la **Figura 9**, el tamaño de los amplicones aumentó a  $\sim$ 630 pb, como se esperaba. Además, se observa que hubo bandas inespecíficas, las cuales no se consideró pudieran interferir en el proceso de secuenciación, debido a la intensidad tan tenue con que se presentaron.



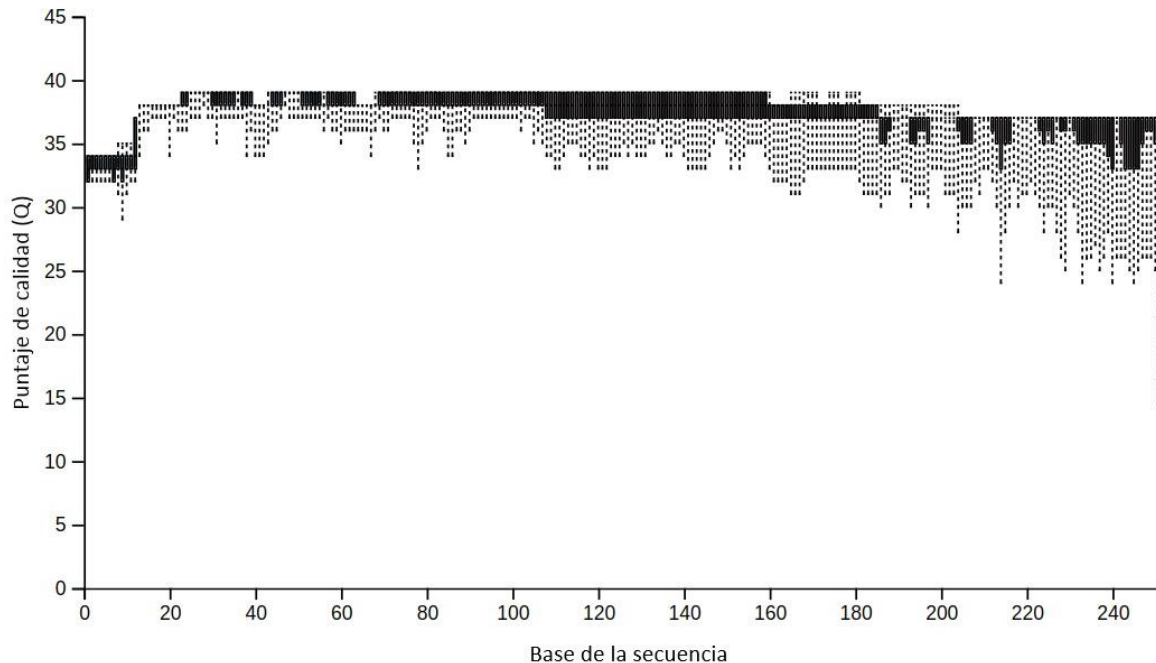
**Figura 9.** Validación de bibliotecas del gen ARNr 16S mediante electroforesis automatizada. Gel digital resultante de la electroforesis automatizada en *4200 TapeStation*. En el recuadro verde claro se observa que las bibliotecas tienen un tamaño que oscila entre 500 y 700 pb. También se aprecian tenues sombras grises que corresponden a bandas inespecíficas. MPME: Marcador de Peso Molecular Electrónico. pb: pares de bases.

## 6.4. Secuenciación

La secuenciación del lote L1018 generó un total de 19,681,997 lecturas en 41 muestras, mientras que la del lote L0219 generó 1,781,889 lecturas en 28 muestras. El lote L1018 se secuenció utilizando un cartucho de 600 ciclos (lecturas pareadas de 300 pb) y el lote L0219 en un cartucho de 500 ciclos (lecturas pareadas de 250 pb). Esta diferencia en el procedimiento experimental dio como resultado la generación de un menor número de secuencias, pero de mayor calidad para el lote L0219 en comparación con el lote L1018 (**Figura 10 y 11**). En la **Tabla 3** se muestra la discrepancia en el número de secuencias remanentes después de cada uno de los pasos llevados a cabo por DADA2. Debido a estas diferencias entre lotes, tanto el filtrado de calidad como la construcción de ASVs se realizó por separado.



**Figura 10.** Gráfico de cajas y bigotes de la calidad de las secuencias sentido (*forward*) del lote 1018. En la imagen se observa que las secuencias tienen una longitud de 300 pb y un valor de Q de 10 a 40, aproximadamente.



**Figura 11.** Gráfico de cajas y bigotes de la calidad de las secuencias sentido (*forward*) del lote 0219. En la imagen se muestran que las secuencias tienen una longitud de 250 pb con un valor de Q de 15 a 40, aproximadamente.

**Tabla 3.** Número de secuencias remanentes tras cada proceso llevado a cabo por DADA2.

Tipo de secuencias	L1018 <sup>a</sup> (n = 41)		L0219 <sup>a</sup> (n = 28)	
Sin procesar	480,048.71 ± 793,272	86,603.56 (288,820 – 114,152)	63,638.89 ± 16,653.51	(30,947 – 114,152)
Filtradas <sup>b</sup>	145,320.41 ± 267,169	39,665.76 (76,240 – 101,885)	54,534.89 ± 15,348.21	(24,387 – 101,885)
<i>Denoised</i> <sup>c</sup>	145,320.41 ± 267,169	39,665.76 (76,240 – 101,885)	54,534.89 ± 15,348.21	(24,387 – 101,885)
Unidas	122,871.93 ± 214,629	35,207.91 (51,993 – 80,989)	44,975.79 ± 12,863.82	(22,811 – 80,989)
No quiméricas	17,538.27 ± 4,252.09 (9,895 – 27,727)		6,214.82 ± 1,683.47 (3,193 – 9,429)	

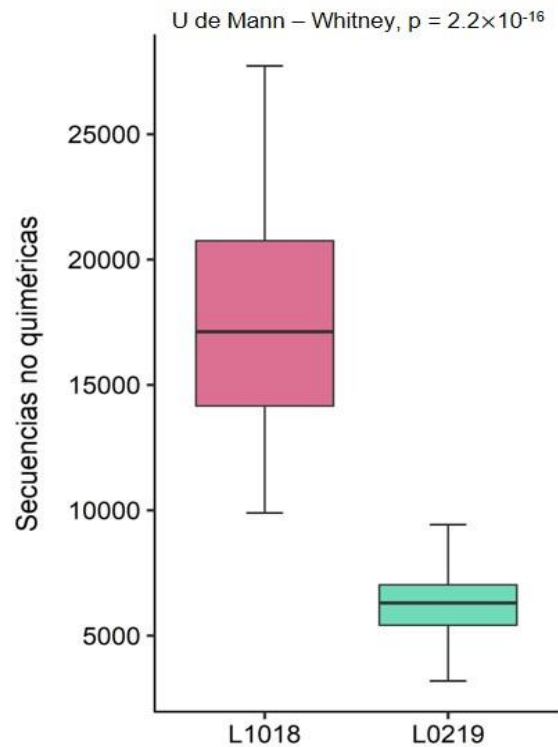
a. Los valores que se muestran para cada lote son: media ± D.E. (mínimo – máximo)

b. Filtradas: secuencias con Q mayor a 2, y con menos de dos bases ambiguas (identificadas como N)

c. *Denoised*: secuencias inferidas tras la aplicación del algoritmo implementado por DADA2 para la eliminación de secuencias ruido.

En la **Figura 12** se observa una diferencia significativa en las secuencias no quiméricas (secuencias utilizadas para la construcción de ASVs), por lo que para minimizar el efecto que ello podría tener en los análisis ulteriores, se utilizó el método de normalización por rarefacción<sup>100</sup>. Este proceso se llevó a cabo utilizando la herramienta bioinformática QIIME2 2019.1 eligiendo una profundidad de submuestreo de 3,000 lecturas por muestra para cada lote, considerando que la muestra con el menor número de lecturas entre ambos lotes contaba con sólo 3,193 secuencias no quiméricas. Cabe señalar que el resto de las lecturas de las muestras que contaban con una cantidad mayor a 3,000 lecturas fueron excluidas por el programa, puesto que éste ya había tomado en cuenta la proporción en que se encontraban en el momento de realizar el

submuestreo<sup>100</sup>. Tanto las condiciones establecidas para la rarefacción como el método en sí permitieron que los lotes pudieran ser unificados para el análisis y que ninguna de las muestras fuera excluida del estudio.



**Figura 12.** Análisis de la diferencia de secuencias no quiméricas entre lotes. El número de secuencias no quiméricas del lote L1018 es significativamente mayor en comparación con el lote L0219 ( $p = 2.2 \times 10^{-16}$ ).

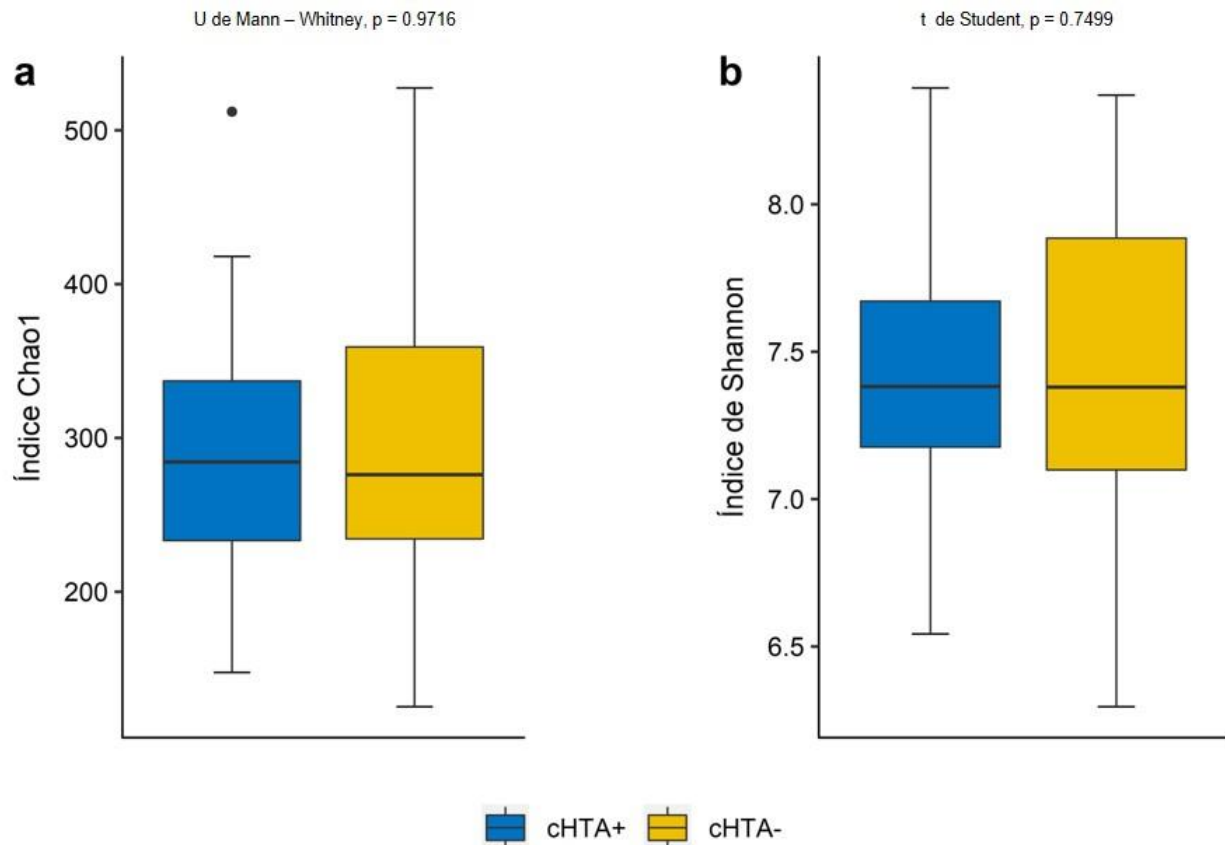
### 6.5. Análisis de alfa – diversidad

El análisis de alfa – diversidad se llevó a cabo calculando los índices Chao1 y Shannon. El índice Chao1 mide la riqueza de las muestras dando mayor peso a aquellas bacterias que se encuentran en muy baja proporción, mientras que el índice de Shannon refleja la diversidad de las muestras al relacionar su riqueza con la uniformidad de la abundancia en que se encuentran las bacterias<sup>91,93,94</sup>. Ambos parámetros mostraron que los pacientes cHTA- tienden a una mayor alfa – diversidad en comparación con los pacientes cHTA+, es decir, tienden a presentar una mayor riqueza y diversidad. Sin embargo, dicha diferencia no es significativa ( $p \geq 0.05$ ) (Tabla 4 y Figura 13).

**Tabla 4.** Diferencias en alfa - diversidad entre cHTA+ y cHTA-

Parámetro de alfa – diversidad	cHTA+ (media)	cHTA- (media)	Valor de p
Índice Chao1 <sup>a</sup>	288.86	300.92	0.9716
Índice de Shannon <sup>b</sup>	7.39	7.44	0.7499

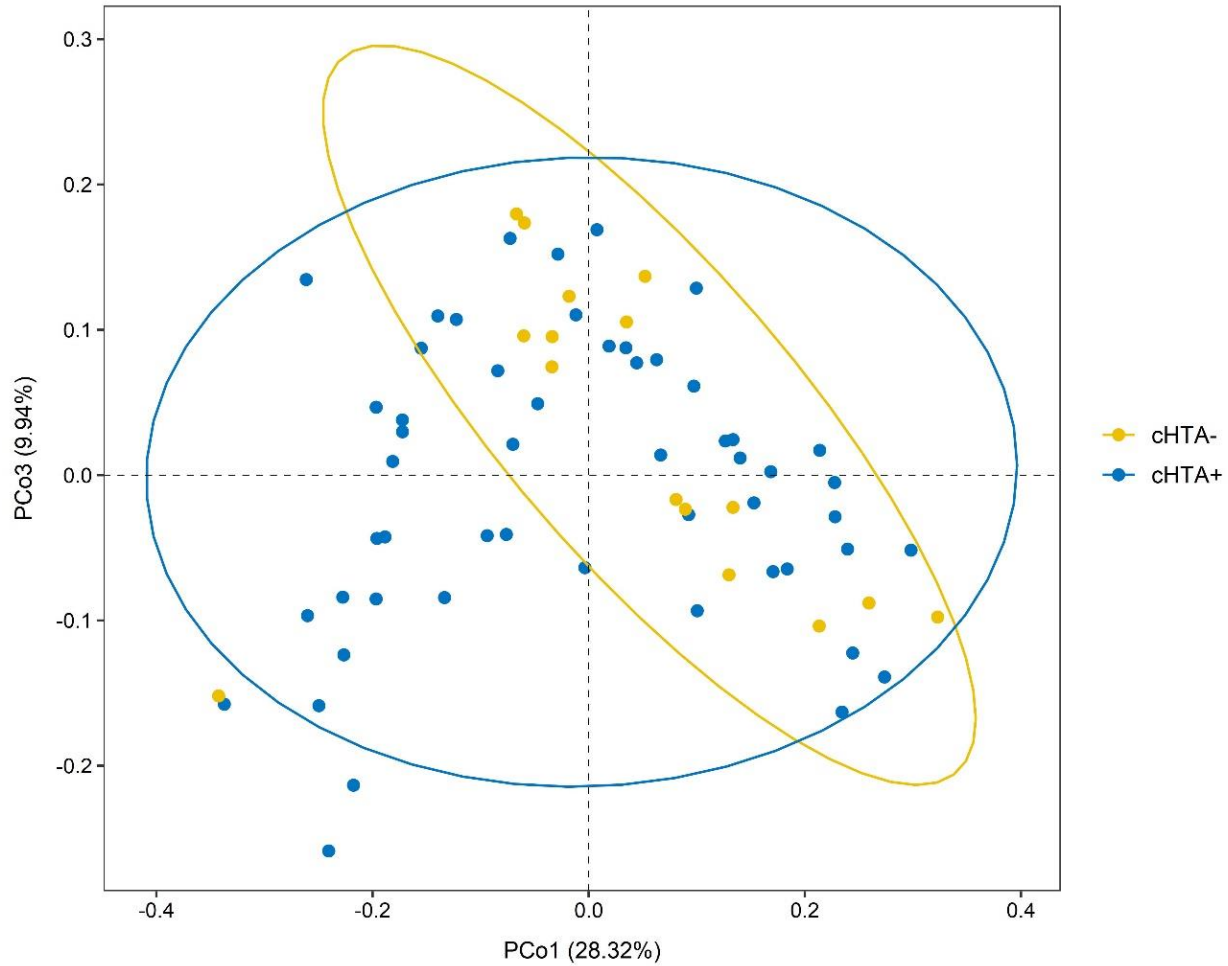
a. U de Mann – Whitney  
b. t de Student



**Figura 13.** Análisis de alfa – diversidad en pacientes hipertensos controlados y no controlados. a. Índice Chao1. b. Índice de Shannon. cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados.

## 6.6. Análisis de beta – diversidad

Para determinar la diversidad microbiana en cada muestra y posteriormente comparar entre los grupos de estudio, se realizó el análisis de beta – diversidad utilizando un PCoA (**Figura 14**). El PCoA se graficó a partir de la matriz de distancias ponderadas UniFrac generada con QIIME2 2019.1. Esta medida considera que la diferencia entre comunidades radica tanto en la abundancia de los taxones como en la relación filogenética de los mismos<sup>101</sup>, por tanto, se puede decir que la composición bacteriana de la microbiota intestinal entre pacientes cHTA- tiende a ser homogénea, permitiendo su ligera segregación con respecto a los pacientes cHTA+. Dicha agrupación tiene un porcentaje de explicación del 38.26% de la variabilidad de taxones entre grupos.

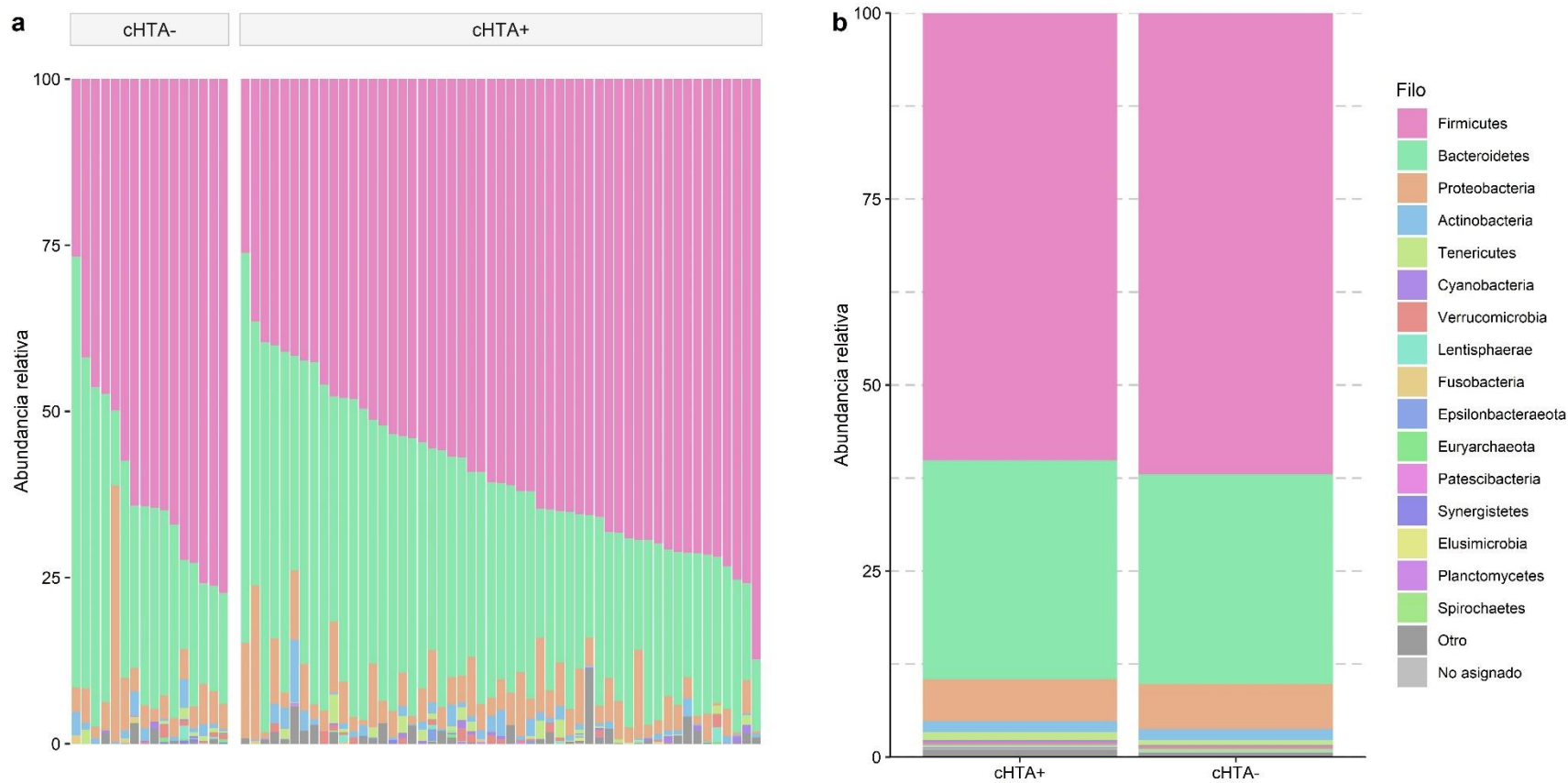


**Figura 14.** Análisis de beta - diversidad en pacientes hipertensos controlados y no controlados. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en matriz de distancias ponderadas UniFrac. Cada punto representa una muestra. Se observa la separación en dos grupos. cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados.

## 6.7. Análisis taxonómico

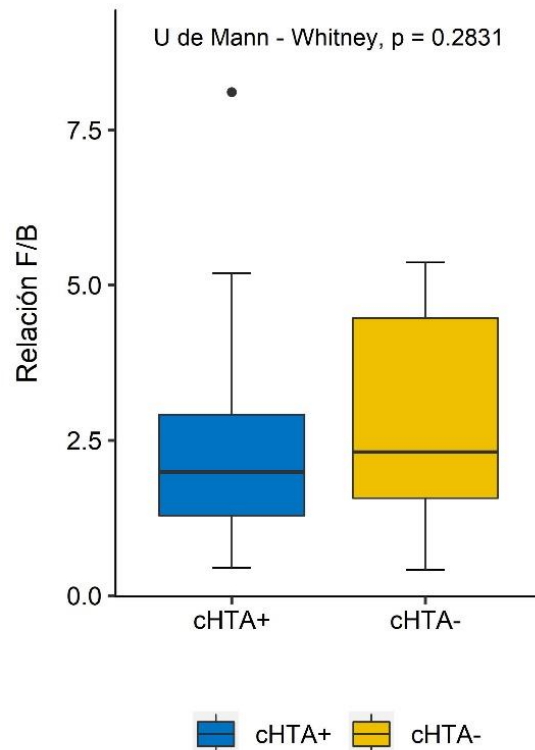
Con el proceso de asignación taxonómica, los ASVs generados se agruparon en un total de 17 filos y 302 géneros, los cuales fueron utilizados para describir los grupos de estudio y para evidenciar posibles diferencias entre ellos mediante el uso de la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney. En este sentido, a nivel de filo, *Firmicutes* fue el más abundante, contribuyendo 60.55% y 59.02% a la microbiota intestinal en el grupo cHTA- y en el grupo cHTA+, respectivamente, seguido por *Bacteroidetes* (30.02% y 32.17% respectivamente), *Proteobacteria* (6.2% y 5.28% respectivamente), *Actinobacteria* (1.33% y 1.12% respectivamente) y *Tenericutes* (0.42% y 0.53% respectivamente) (**Figura 15**).





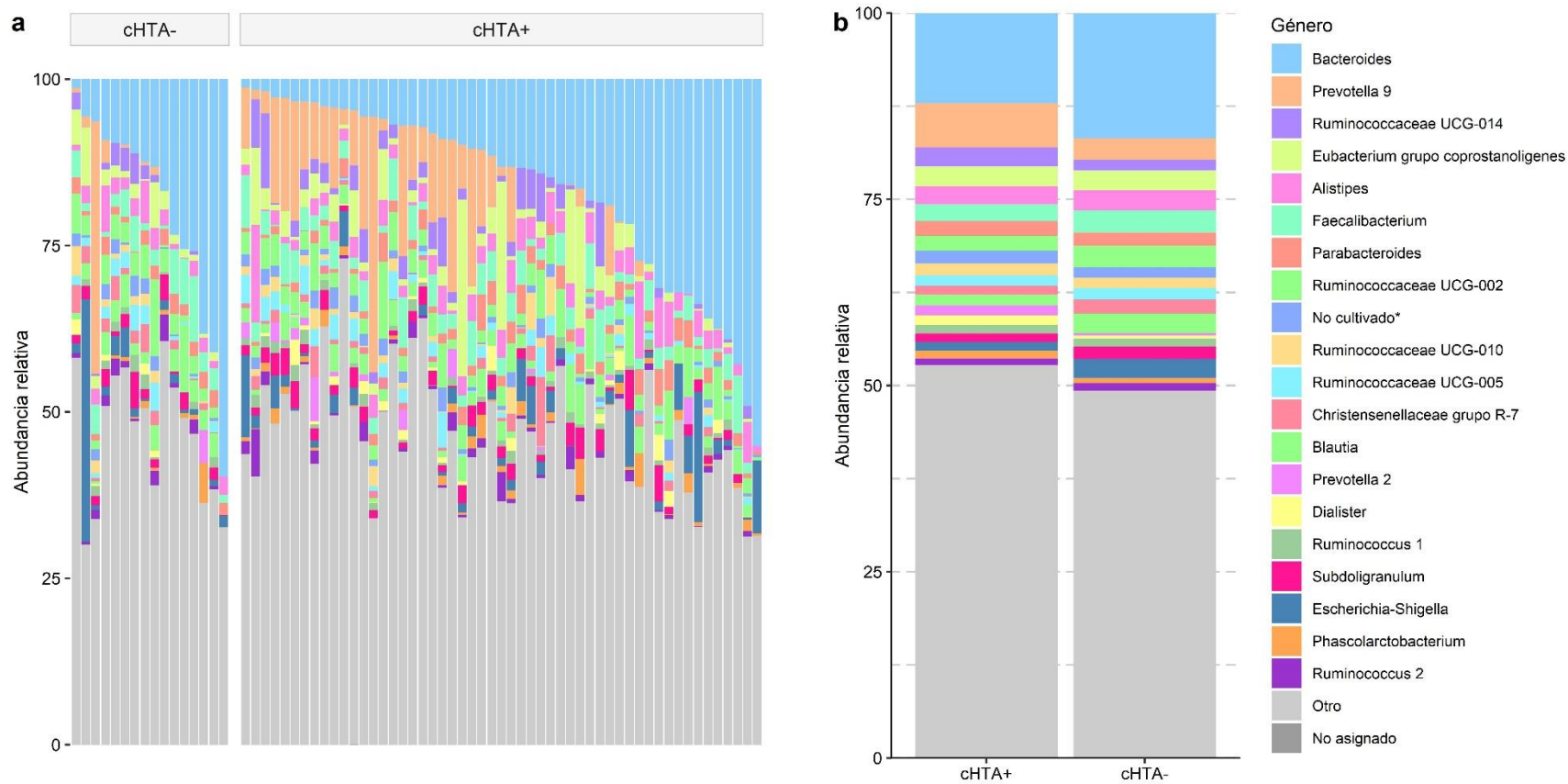
**Figura 15.** Composición de la fracción bacteriana de la microbiota intestinal de pacientes hipertensos controlados y no controlados a nivel de filo. a. Representación de la abundancia relativa de cada filo por individuo. b. Representación de la abundancia relativa de cada filo por grupo de estudio. En la imagen se plasman los 16 fillos más abundantes en la muestra. cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados. El término “Otro” se refiere a fillos poco caracterizados a los cuales no se ha asignado un nombre, o bien, fillos que no entran dentro de los 16 más abundantes y que debido a su proporción serían imperceptibles en el gráfico. El término “No asignado” se refiere a secuencias a las cuales no se les pudo dar una asignación taxonómica debido a la longitud de la secuencia, o bien, al porcentaje de similitud establecido.

En lo que refiere a la comparación entre comunidades, hubo un cambio significativo en la abundancia relativa del filo *Synergistetes*, el cual resultó ser más abundante ( $p = 0.0088$ ) en el grupo cHTA- (Tabla 5 y Figura 18). Además resultó de interés observacional más no estadístico el incremento de *Bacteroidetes* y la disminución de *Firmicutes* en pacientes cHTA+ con respecto a los cHTA-, razón por la cual se calculó la relación F/B para cada muestra, pues es un parámetro que permite identificar disbiosis<sup>97</sup>. La comparación estadística entre grupos no mostró que hubiera diferencias significativas en la relación F/B ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 16).



**Figura 16.** Comparación de la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* entre pacientes hipertensos controlados y no controlados. Se observa que no hay diferencia significativa en la relación F/B entre pacientes cHTA+ y pacientes cHTA- ( $p = 0.2831$ ). cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados.

Por otra parte, a nivel de género las bacterias con mayor representación en la microbiota intestinal tanto de pacientes cHTA- como cHTA+ fueron *Bacteroides* (19.31% y 16.17% respectivamente) y *Prevotella 9* (2.87% y 6.19% respectivamente) (Figura 17). Una primera descripción, no estadística, de los grupos a este nivel permite reconocer que en pacientes cHTA+ hay un incremento del género *Bacteroides* y un decremento del género *Prevotella 9*, mientras que en pacientes cHTA- parecer ser que dicha variación se da de manera opuesta (disminución de *Bacteroides* y aumento de *Prevotella 9*). Otros cambios de abundancia se aprecian en *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae UCG – 014*, *Christensenellaceae grupo R – 7*, *Blautia*, *Escherichia – Shigella*, *Prevotella 2* y *Dialister*.



**Figura 17.** Composición de la fracción bacteriana de la microbiota intestinal de pacientes hipertensos controlados y no controlados a nivel de género. a. Representación de la abundancia relativa de cada género por individuo. b. Representación de la abundancia relativa de cada género por grupo de estudio. En la imagen se plasman los 20 géneros más abundantes en la muestra. cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados. El término "Otro" se refiere a géneros poco caracterizados a los cuales no se ha asignado un nombre, o bien, géneros que no entran dentro de los 20 más abundantes y que debido a su proporción serían imperceptibles en el gráfico. El término "No asignado" se refiere a secuencias a las cuales no se les pudo dar una asignación taxonómica debido a la longitud de la secuencia, o bien, al porcentaje de similitud establecido.

\* Reino: Bacteria. Filo: Bacteroidetes. Clase: Bacteroidia. Orden: Bacteroidales. Familia: Muribaculaceae. Género: Organismo no cultivado

El análisis estadístico, en el mismo nivel de género, dio como resultado que *Cloacibacillus* ( $p = 0.0002$ ), *Desulfovibrio* ( $p = 0.0007$ ), *Negativibacillus* ( $p = 0.0015$ ), *Lachnospiraceae* grupo *ND3007* ( $p = 0.0055$ ), *Methanobrevibacter* ( $p = 0.0088$ ), *Acidaminococcus* ( $p = 0.0100$ ), un organismo no cultivado de la familia *Muribaculaceae* ( $p = 0.0102$ ), *Hydrogenoanaerobacterium* ( $p = 0.0109$ ), un miembro de la familia *Mollicutes* *RF39* (filo *Tenericutes*) identificado como Metagenoma intestinal ( $p = 0.0133$ ), *Ruminiclostridium 6* ( $p = 0.0190$ ), *Fusicatenibacter* ( $p = 0.0469$ ) y *Ruminiclostridium 1* ( $p = 0.0499$ ) se encuentran en una abundancia relativa significativamente mayor en pacientes cHTA-, en tanto que para el grupo de pacientes cHTA+, el género con mayor presencia significativa es *Prevotella 7* (Tabla 5 y Figura 18).

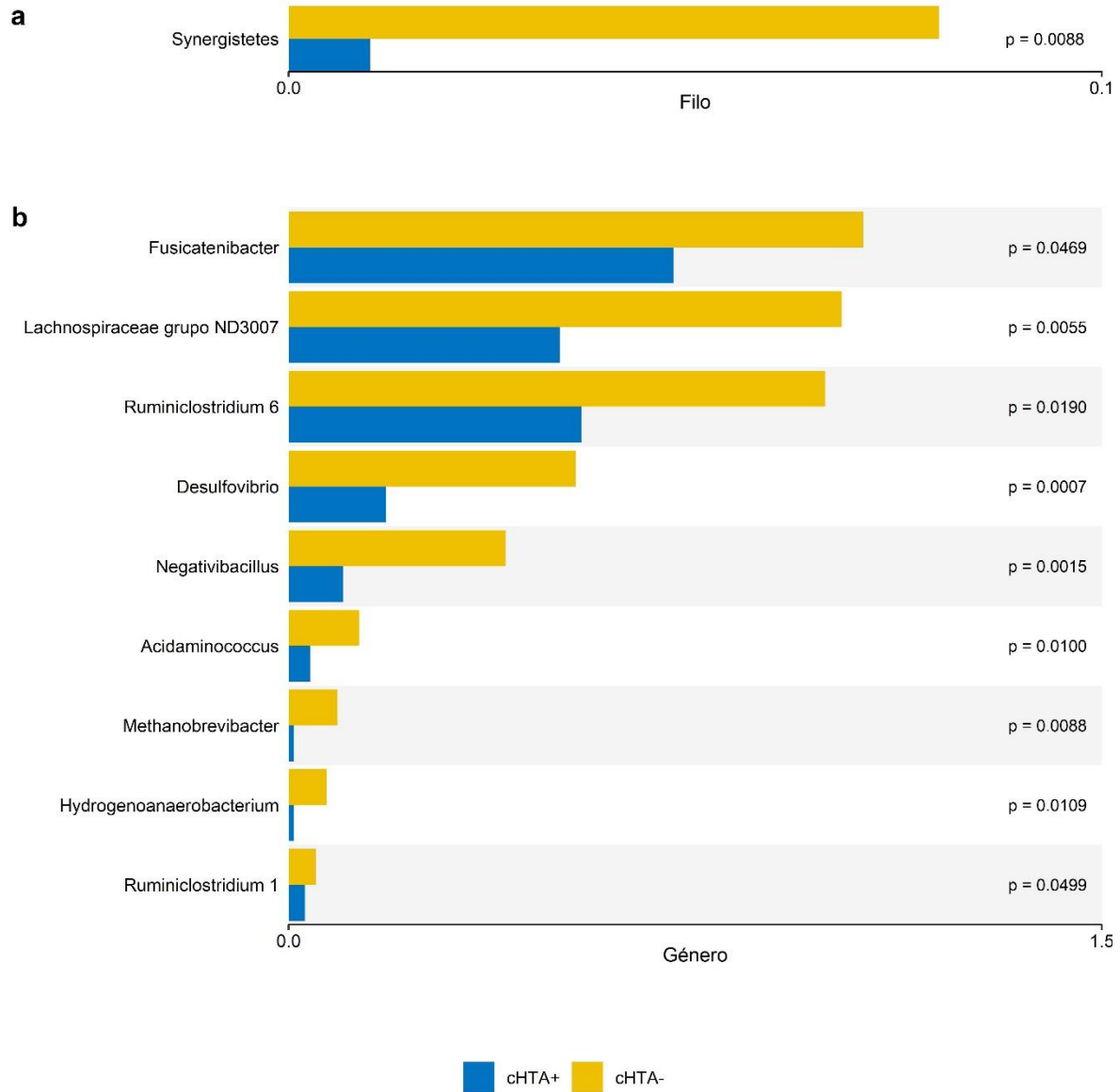
**Tabla 5.** Diferencias a nivel de filo y género entre pacientes hipertensos controlados y no controlados.

Nivel taxonómico	Nombre	cHTA+ (media)	cHTA- (media)	Valor de p <sup>a</sup>
Filo	<i>Synergistetes</i>	0.0113	0.0813	0.0088
Género	<i>Cloacibacillus</i>	0	0.0813	0.0002
	<i>Desulfovibrio</i>	0.1799	0.5292	0.0007
	<i>Negativibacillus</i>	0.0969	0.4042	0.0015
	<i>Lachnospiraceae</i> grupo <i>ND3007</i>	0.4956	1.017	0.0055
	<i>Methanobrevibacter</i>	0.0119	0.0896	0.0088
	<i>Acidaminococcus</i>	0.0403	0.1313	0.0100
	Organismo no cultivado <sup>b</sup>	0	0.1563	0.0102
	<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0.0107	0.0729	0.0109
	Metagenoma intestinal <sup>c</sup>	0.0031	0.05	0.0133
	<i>Ruminiclostridium 6</i>	0.5352	0.9917	0.0190
	<i>Prevotella 7</i>	0.2182	0	0.0398
	<i>Fusicatenibacter</i>	0.7057	1.063	0.0469
	<i>Ruminiclostridium 1</i>	0.0258	0.05	0.0499

a. Prueba U de Mann – Whitney

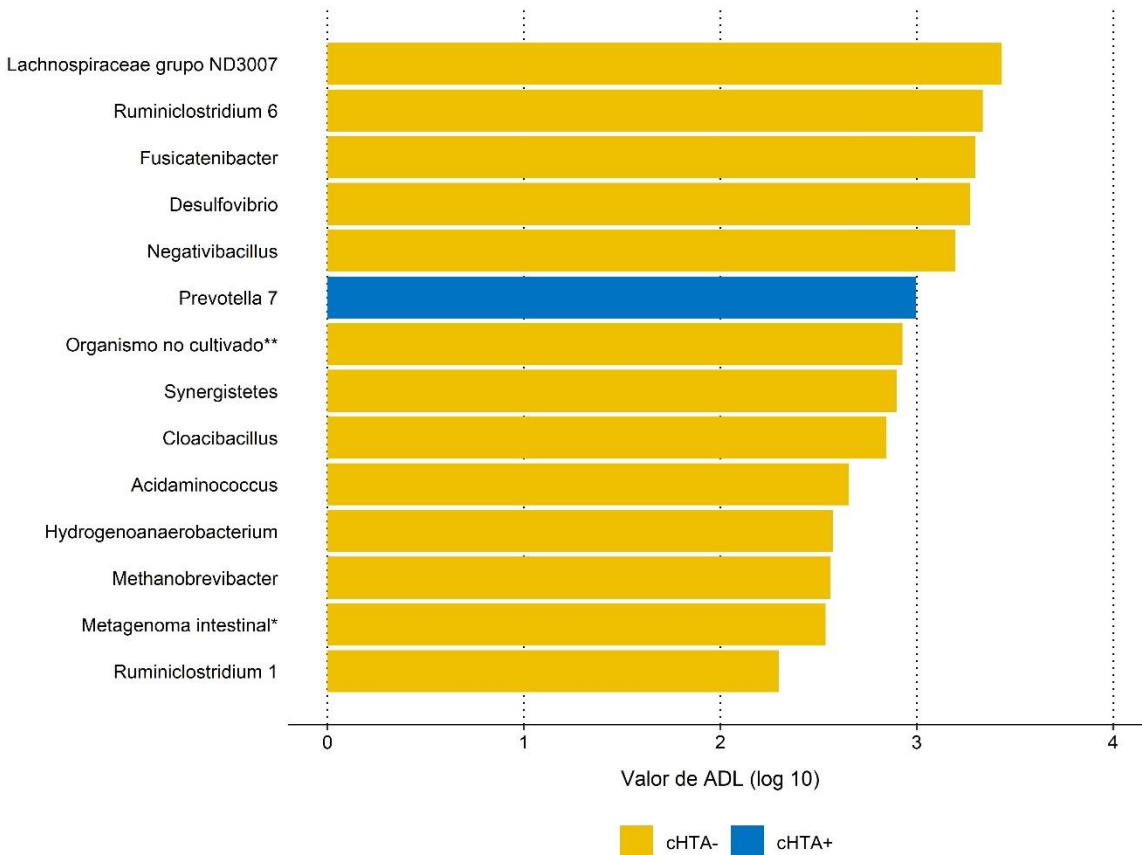
b. Reino: *Bacteria*. Filo: *Bacteroidetes*. Clase: *Bacteroidia*. Orden: *Bacteroidales*. Familia: *Muribaculaceae*.

c. Reino: *Bacteria*. Filo: *Tenericutes*. Clase: *Mollicutes*. Orden: *Mollicutes* *RF39*. Familia: Identificada en metagenoma intestinal



**Figura 18.** Representación de los taxones con diferencia significativa entre pacientes hipertensos controlados y no controlados. a. Nivel de filo. b. Nivel de género. cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados.

Además, se realizó un ADL con la herramienta bioinformática de LEfSe con el propósito de identificar posibles taxones que permitieran la identificación de cada grupo. Develó que *Prevotella 7* es un posible biomarcador para pacientes cHTA+ al encontrarse en una abundancia significativamente mayor; en tanto que la prevalencia del filo *Synergistetes* junto con los 12 géneros restantes en los que se encontró una variación significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba U de Mann – Whitney, se relaciona como biomarcador potencial de pacientes cHTA- (valor de ADL  $\geq 2$ ,  $p < 0.05$ ) (**Figura 19**).



**Figura 19.** Análisis discriminante lineal entre pacientes hipertensos controlados y no controlados mediante LEfSe. Se muestran los posibles biomarcadores para la identificación de los grupos de estudio. cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados.

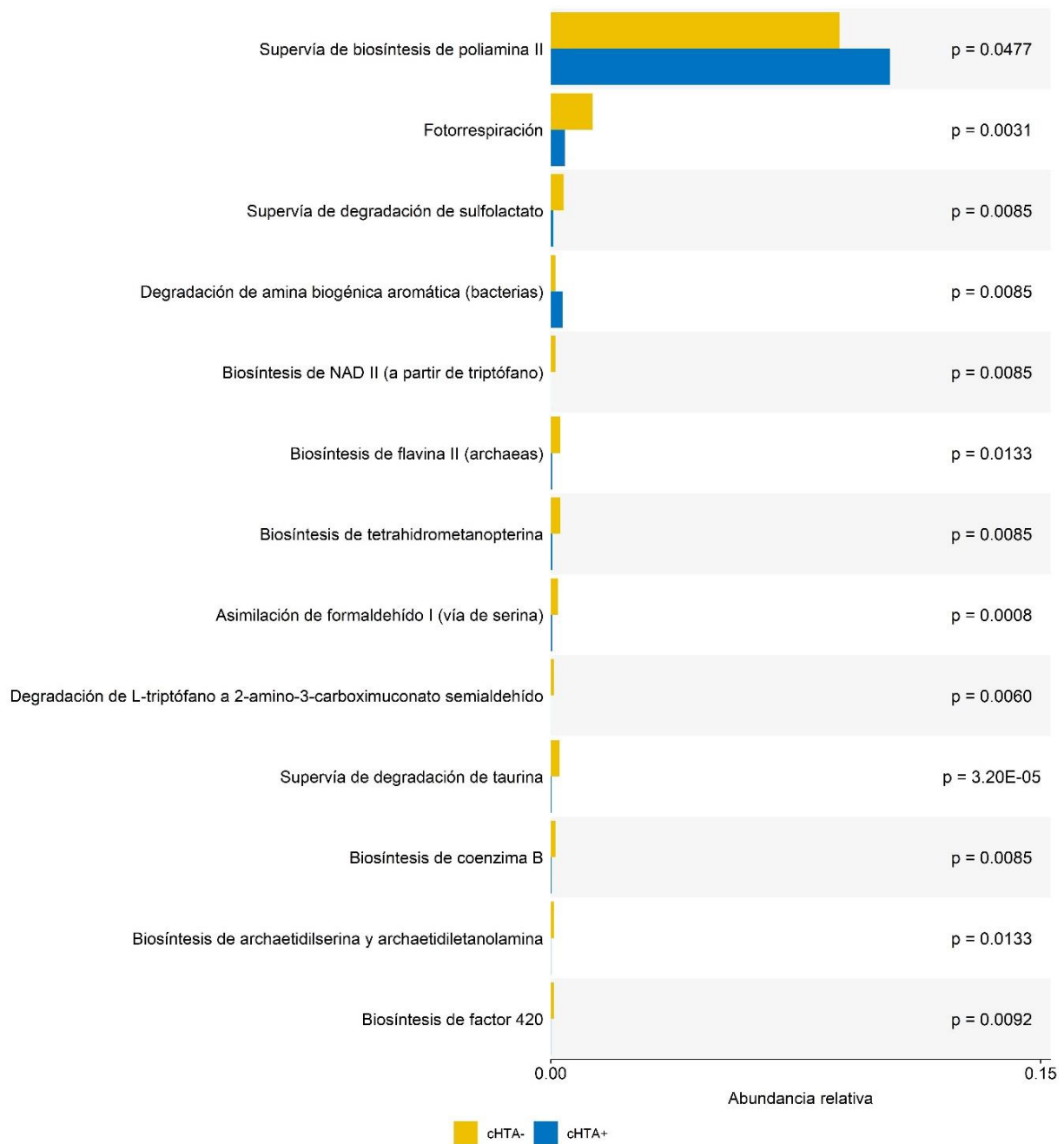
\*Reino: *Bacteria*. Filo: *Tenericutes*. Clase: *Mollicutes*. Orden: *Mollicutes RF39*. Familia: Identificada en metagenoma intestinal

\*\* Reino: *Bacteria*. Filo: *Bacteroidetes*. Clase: *Bacteroidia*. Orden: *Bacteroidales*. Familia: *Muribaculaceae*.

## 6.8. Análisis de composición funcional

Con el propósito de conocer la composición funcional de la fracción bacteriana de la microbiota intestinal de los pacientes se usó la herramienta bioinformática PICRUST, la cual arrojó como resultado la predicción de un total de 381 funciones de acuerdo con la microbiota identificada en los análisis previos. 13 mostraron una abundancia significativamente diferente entre pacientes cHTA+ y pacientes cHTA-: supervía de biosíntesis de poliamina II, fotorrespiración, supervía de degradación de sulfolactato, degradación de amina biogénica aromática, biosíntesis de NAD II (a partir de triptófano), biosíntesis de flavina II (archaea), biosíntesis de tetrahidrometanopterin, asimilación de formaldehído I (vía de serina), degradación de L – triptófano a 2 – amino – 3 – carboximuconato semialdehído, supervía de degradación de taurina, biosíntesis de coenzima B, biosíntesis de archaetidilserina y archaetidiletanolamina, y biosíntesis de factor 420 (**Figura 20**). Las funciones que presentaron una variación entre grupos de estudio se encuentran involucradas en

procesos metabólicos como generación o procesamiento de metano (biosíntesis de factor 420, biosíntesis de coenzima B, asimilación de formaldehído I), biosíntesis de vitaminas y cofactores (biosíntesis de NAD II, biosíntesis de flavina II), biosíntesis y degradación de aminos y poliaminas (biosíntesis de tetrahidrometanopterina, degradación de L – triptófano, degradación de taurina) y fotorrespiración. Cabe destacar que las únicas vías metabólicas que resultaron estar significativamente más representadas en el grupo cHTA+ fueron la supervía de biosíntesis de poliamina II y la degradación de amina biogénica aromática. Las 11 funciones restantes fueron altamente abundantes en el grupo cHTA-.



**Figura 20.** Análisis de funcionalidad basado en la predicción metagenómica a partir de MetaCyc con PICRUST. Se muestran las 14 vías metabólicas cuya abundancia difiere significativamente entre pacientes hipertensos controlados y pacientes hipertensos no controlados. cHTA+: Pacientes hipertensos controlados. cHTA-: Pacientes hipertensos no controlados.



## CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

La HTA es la principal causa de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, discapacidad y muertes prematuras en todo el mundo<sup>4,37,52</sup>, con una prevalencia del 29%<sup>102</sup>. Aunado a ello se sabe que más del 30% de pacientes hipertensos que se encuentran bajo tratamiento farmacológico, incluso con más de tres medicamentos antihipertensivos, no logra un adecuado control de sus niveles de TA (< 140/90 mmHg)<sup>4,37</sup>. Dichas cifras de prevalencia se acentúan en países en vías de desarrollo donde al aumentar la proporción de adultos mayores, es decir, al incrementar la expectativa de vida aumenta la prevalencia de HTA<sup>103</sup>. Tal es el caso de nuestro país, en donde 25.5% de la población es hipertensa y aproximadamente el 50% de adultos mayores padece la enfermedad, de los cuales al menos la mitad aun cuando recibe tratamiento farmacológico no presenta una TA controlada<sup>23</sup>. Actualmente la investigación alrededor de este fenómeno en pacientes hipertensos se ha centrado en el estudio de factores genéticos, sin embargo, la influencia de otro tipo de factores como dieta, microbiota, estrés, medio ambiente, comorbilidades y sedentarismo, sigue siendo parcialmente caracterizada<sup>4</sup>. Este estudio se enfocó en el análisis de la microbiota intestinal, específicamente de la porción bacteriana, como un parámetro que puede influir en el control de la HTA en pacientes bajo tratamiento farmacológico. Se identificaron las diferencias que existen en la microbiota intestinal entre pacientes hipertensos bajo tratamiento farmacológico controlados (< 140/90 mm Hg) y no controlados ( $\geq$  140/90 mm Hg). Además, se realizó la primera caracterización de la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos (**Anexo III y IV**).

Estudios previos sobre HTA han demostrado que la alfa – diversidad en hipertensos y en general, en enfermedades crónico degenerativas, se encuentra disminuida en comparación con personas sanas<sup>11,48,56</sup>. También es común observar la disminución de esta diversidad con la edad<sup>46</sup>. Con el fin de comprobar si ello se extrapola al presente proyecto, se compararon cualitativamente los datos de alfa – diversidad de los 69 pacientes adultos mayores incluidos en el estudio con lo previamente reportado para adultos mayores sanos. En este sentido, Odamaki *et al.* (2016)<sup>42</sup> en un estudio que versó sobre el cambio que sufre la microbiota intestinal con la edad en población china, reporta que la alfa – diversidad en personas mayores a 60 años oscila de 3 – 7 y de 200 – 600, cuando se mide con el índice de Shannon y el índice Chao1, respectivamente, mientras que en el presente estudio los valores variaron de 6.296 – 8.395 y de 125.3 – 527.5, respectivamente. Como se puede observar, de acuerdo con esta comparación, la riqueza de la microbiota intestinal (índice de Chao1) entre los pacientes hipertensos de este estudio y pacientes sanos es muy similar, lo cual concuerda con un estudio reciente en el que no se encontró diferencia significativa en la alfa – diversidad de pacientes hipertensos sin tratamiento comparada con personas con niveles de TA

normal<sup>22</sup>. En contraste, la misma comparación indica que la homogeneidad y riqueza de la microbiota intestinal (índice Shannon) es mayor en los pacientes hipertensos incluidos en este proyecto, lo cual difiere de cualquier otro resultado previamente reportado<sup>11,22,48,56</sup>. Estas discrepancias pueden deberse a las variaciones que presenta la microbiota intestinal con factores como la etnia, zona geográfica de residencia<sup>104</sup> y dieta<sup>105-107</sup>, por lo que se propone la inclusión, en estudios posteriores, de un grupo control (sin HTA) que empate con las características sociodemográficas de la presente población de estudio.

En este estudio, la población se clasificó en pacientes con niveles de TA controlados (cHTA+) y no controlados (cHTA-). Al analizar la alfa – diversidad no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre ambos grupos, no obstante, la representación gráfica de beta – diversidad evidenció una tendencia de agrupamiento de los pacientes cHTA- con respecto a los pacientes cHTA+. Es posible que el carácter tendencioso de dicha separación se deba al tamaño limitado de la población de estudio, sin embargo, puede estar indicando que la diferencia entre los grupos de pacientes se encuentra a nivel de composición de la microbiota intestinal<sup>108</sup>, aseveración que se podría confirmar con una muestra poblacional de mayor tamaño. Por otra parte, si se toma en cuenta que la medida de beta – diversidad utilizada fue UNIFRAC ponderado, medida de carácter cuantitativo y filogenético, también se puede suponer que la disparidad entre grupos depende tanto de la relación filogenética que hay entre taxones como de la abundancia en que se encuentran los mismos<sup>101</sup>. A este respecto, se sabe que bacterias relacionadas filogenéticamente son similares en cuanto al nicho ecológico en el que habitan, el tipo de sustrato que utilizan e incluso en cuanto a las “estrategias” de supervivencia que emplean<sup>109</sup>. Con esto se puede deducir que es posible que la separación observada entre grupos tras la evaluación de la beta – diversidad tenga su origen en la divergencia de las capacidades funcionales (metabólicas) de las bacterias presentes en la microbiota intestinal de los individuos.

Por lo que se refiere al análisis taxonómico, a nivel de filo se observó que los taxones más abundantes en ambos grupos de pacientes fueron, en orden de abundancia, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Estudios realizados tanto en población sana<sup>42</sup> como hipertensa<sup>10,11</sup> han demostrado que si bien, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los filos prevalentes a nivel intestinal, el filo *Actinobacteria* se presenta en mayor proporción que el filo *Proteobacteria*, lo cual difiere con lo aquí hallado. Se conoce que el filo *Proteobacteria* puede estar relacionado con enfermedades cardiovasculares<sup>110</sup>, además de que su incremento en población mexicana se ha asociado con obesidad y con el consumo de dietas ricas en grasa, similar a lo reportado para población estadounidense<sup>111,112</sup>. Dicho lo anterior, la presencia en mayor proporción de *Proeobacteria* con respecto a *Actinobacteria* puede deberse a que la enfermedad que se está estudiando está asociada a complicaciones cardiovasculares, a la condición de sobrepeso u obesidad que

presenta el 66.6% de la población estudio, y a la dieta propia de la zona metropolitana de la Ciudad de México, zona a la que pertenecen los adultos mayores aquí estudiados (**Tabla 1**).

En el mismo nivel taxonómico uno de los parámetros que suele utilizarse para describir situaciones de disbiosis es la relación F/B<sup>97</sup>. Tal relación no mostró diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre grupos de pacientes cHTA+ (2.22) vs. cHTA- (2.76). Sin embargo, al comparar cualitativamente con lo reportado en la literatura para adultos mayores sanos (0.6)<sup>97</sup> se hace evidente que dicho valor de relación F/B es cuatro veces mayor en la población aquí estudiada. Este hallazgo coincide con lo visto en estudios anteriores, en donde se establece que la HTA provoca cierto grado de disbiosis caracterizada por el incremento del filo *Firmicutes* y/o el decremento del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal, reflejada en un aumento considerable de la relación F/B<sup>10,11,43,48</sup>. En conjunto se puede decir que si bien la población presenta la disbiosis característica de la afección, tal desequilibrio no está contribuyendo al control de los niveles de TA en los pacientes, pues aun cuando hay un aumento de la relación F/B con respecto a lo reportado previamente para población sana, no hay una diferencia significativa de la misma entre los grupos de estudios: cHTA+ vs. cHTA-.

A nivel de género, los taxones con mayor prevalencia en la totalidad de la muestra de estudio (sin clasificación por control de HTA) fueron *Bacteroides*, *Prevotella 9* y *Ruminococcaceae UCG – 014*, lo cual coincide con la composición de la microbiota intestinal de adultos sanos, en la que los géneros bacterianos predominantes son: *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*<sup>113</sup>. Por otra parte, uno de los hechos que llaman la atención es que hay una disminución de *Bacteroides* ligada con el aumento de *Prevotella 9* en pacientes cHTA+, y que el mismo efecto pero de forma contraria se presenta en pacientes no controlados, cHTA-. Esto se debe a que hay una relación indirectamente proporcional entre la abundancia de estos dos géneros, pues se ha establecido que compiten por el mismo nicho ecológico dentro del tracto GI<sup>114</sup>. Sin embargo, la disparidad entre los grupos de estudio sigue resultando interesante, pues podría ser un parámetro de diferenciación entre grupos con TA bajo control vs los no controlados. En este sentido, la relación *Bacteroides/Prevotella* que se observa en pacientes cHTA- también ha sido reportada para personas cuya dieta es rica en ácidos grasos saturados y proteínas de origen animal<sup>115</sup>, mientras que lo visto en pacientes cHTA+ ha sido reportado como un factor que favorece la tolerancia a la glucosa en pacientes diabéticos (factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares) tras el tratamiento con una dieta rica en fibra<sup>114</sup>. Así, estos hallazgos indican en primer lugar que la variación encontrada puede deberse al tipo de dieta que consumen los pacientes, y en segundo lugar que, el género *Prevotella* puede estar contribuyendo positivamente al control de la TA, tema que se tratará con mejor detalle más adelante. Cabe mencionar que el patrón de taxones más abundantes observado en la población de estudio se asemeja a lo

reportado para microbiota intestinal de población estadounidense, con dietas ricas en grasa y proteína, en la cual los filos más abundantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, mientras que los géneros más abundantes son *Bacteroides*, *Prevotella* y *Faecalibacterium*<sup>116</sup>.

Otro de los puntos importantes a discutir es la presencia de taxones, tanto a nivel de filo como de género, con una abundancia significativamente diferente entre los grupos cHTA- y cHTA+. Antes de proseguir es relevante hacer referencia puntual en cuanto al proceso estadístico que se siguió para la generación de dichos resultados. Hasta el momento la mayoría de los estudios reportados emplea la prueba t de Student o U de Mann Whitney cuando los datos tienen distribución paramétrica o no paramétrica, respectivamente, para comparar la abundancia de los taxones entre grupos de estudio, es decir, sólo si la investigación involucra dos grupos experimentales. Aun cuando en el presente estudio se optó por la aplicación de tales métodos se debe señalar que los mismos no son del todo los adecuados cuando los datos a analizar presentan una gran cantidad de ausencia de taxones o “ceros” (es decir, uno o más taxones se presentan con una abundancia igual a cero en una o más de las muestras). Este es uno de los principales problemas a los que se enfrenta cualquier estudio de microbiota y, por tanto, el aquí descrito. Las principales estrategias que ha utilizado la comunidad científica para solucionar este conflicto son 1. La eliminación de los taxones que tienen una abundancia de cero en una o más muestras del estudio. Si bien esta alternativa parece razonable, la desventaja es la pérdida de información, pues esos ceros pueden ser consecuencia de la profundidad de secuenciación o pueden estar confirmando que efectivamente la presencia de los taxones en cuestión es extremadamente baja. 2. Recientemente se ha incrementado la aplicación de pruebas estadísticas que toman en cuenta esas ausencias o ceros en datos de taxones para minimizar su impacto en el análisis final. Algunos ejemplos de este último caso son el modelo de regresión de Poisson inflado con ceros (*Zero – Inflated Poisson* o ZIP, por sus siglas en inglés), el modelo binomial negativo cero – inflado (*Zero – Inflated Negative Binomial* o ZINB, por sus siglas en inglés) y el modelo gaussiano de cero – inflado (*Zero – Inflated Gaussian* o ZIG, por sus siglas en inglés). Esta última resulta ser una mejor opción, pues evita la necesidad de eliminar parte de la información. Además, dado que este tipo de pruebas sólo puede ser usada en listas de datos con contenido de ceros, algunos investigadores han optado por utilizar las pruebas clásicas (t de Student y U de Mann – Whitney) de manera inicial, y confirmar con el segundo tipo de pruebas si las diferencias significativas encontradas realmente lo son<sup>95,99,100,117</sup>. Teniendo en cuenta que en el presente estudio la totalidad de los especímenes con diferencia significativa entre grupos presentan una gran cantidad de ceros entre muestras, se plantea comprobar tales resultados con pruebas como ZIP, ZINB o ZIG en estudios futuros. Por lo pronto, en lo que atañe al presente trabajo de investigación se reporta lo

hallado únicamente con la aplicación de las pruebas paramétricas (t de Student) y no paramétricas (U de Mann – Whitney).

Continuando con las comparaciones entre los grupos de estudio, algunos de los géneros que resultaron estar en mayor proporción en pacientes cHTA- ( $p < 0.05$ ) en comparación con pacientes cHTA+ fueron: *Fusicatenibacter* y *Lachnospiraceae* grupo ND3007, pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae*; *Hydrogenoanaerobacterium*, *Negativibacillus*, *Ruminiclostridium 1* y *Ruminiclostridium 6*, de la familia *Ruminococcaceae*; *Acidaminococcus*, miembro de la familia *Acidaminococcaceae*; un organismo no cultivado de la familia *Muribaculaceae*, y un espécimen propio del filo *Tenericutes*. Las primeras tres familias se caracterizan por tener un metabolismo activo en la producción de butirato, la última por la producción de propionato, mientras que el filo *Tenericutes* se asocia con la producción de acetato, siendo los tres compuestos mencionados los AGCC más abundantes e importantes en el intestino humano<sup>50,118–121</sup>. Para contextualizar, los AGCC son metabolitos derivados del proceso de fermentación que realiza la microbiota intestinal a partir de la fibra obtenida mediante la dieta<sup>50</sup>. Su interés en el estudio de la HTA se ha acentuado debido a que múltiples investigaciones han develado que la microbiota es capaz de regular la TA a través de la interacción entre AGCC y dos receptores: OR51E2 (Olf78 en murinos) y Gpr41, ambos en humanos, que impactan en la fisiología de la HTA a través del SRAA. Sobre estos receptores se sabe que OR51E2 se expresa en las células lisas de la musculatura vascular de la arteriola aferente renal, que los únicos ligandos ante los cuales responde son acetato y propionato, y que su activación provoca un aumento de la TA, probablemente mediante la estimulación de la secreción de renina. Mientras que Gpr41, un receptor acoplado a proteína G, se expresa en células lisas de la musculatura vascular, pero a diferencia de OR51E2, se activa ante la presencia de acetato, propionato, butirato y algunos otros AGCC, además su estimulación provoca una disminución en los niveles de TA, posiblemente causando vasodilatación<sup>54–56,122–125</sup>. Considerando lo anterior se esperaría, opuesto a lo resultante, que los pacientes cHTA- tuvieran niveles de TA normales, o bien, que los productores de AGCC se encontraran en mayor proporción en pacientes cHTA+.

No obstante, existen dos investigaciones importantes, sobre el papel de los AGCC en la HTA, que pueden ayudar a comprender los hallazgos de este estudio, por lo que se explicarán a continuación.

La primera investigación, realizada en modelo murino *knockout*, mostró que cuando los niveles de AGCC disminuyen la TA incrementa moderadamente y que cuando sólo se encuentra presente uno de los dos receptores mencionados el aumento de la TA se da de manera drástica<sup>54</sup>. A este respecto, los autores resuelven que Gpr41 se activa con bajas concentraciones de AGCC y que ante niveles bajos de éstos la disminución de la TA se da de manera favorable para el individuo (como se ha explicado). Por el contrario, la activación de Olf78 se observa con altas concentraciones de AGCC, por lo que podría activarse

únicamente cuando los niveles de estos AGCC incrementan significativamente y así prevenir que la estimulación excesiva de Gpr41 provoque un cuadro de hipotensión. Esto lleva a deducir en primer lugar que, cuando hay niveles bajos de AGCC la señalización de ambos receptores disminuye para que puedan seguir en equilibrio fisiológico<sup>126</sup>, y en segundo lugar que ante la falta de Olfr78, algún otro mecanismo no definido se activa para contrarrestar el efecto hipotensor de Gpr41.

En la segunda investigación por Yang *et al.* (2019) enfocada en la acción del butirato, se vio que en roedores con HTA, pese a la administración oral de butirato, los niveles séricos de éste resultaban ser bajos. Análogamente dichos animales presentaron una expresión reducida de transportadores de AGCC a nivel intestinal. En consecuencia, el autor sugiere que bajos niveles de butirato circulantes, debidos a un transporte disfuncional del compuesto a nivel intestinal, pueden contribuir al desarrollo de HTA, tal como se había descrito previamente.

Regresando a los resultados aquí descritos, se puede decir que ciertos pacientes con HTA, aun cuando cuentan con un tratamiento farmacológico y una sobreabundancia de géneros productores de AGCC, siguen presentando una TA elevada, como los pacientes cHTA-, lo cual lleva a generar dos hipótesis:

- Tienen una baja expresión del receptor OR51E2. Es decir, la abundancia de géneros capaces de generar AGCC provoca un aumento en los niveles circulantes de dicho metabolito, una sobreestimulación de Gpr41 y por ende, una tendencia a presentar un cuadro de hipotensión en pacientes cHTA-. Esta situación, ante la falta del efecto regulador de OR51E2, se soluciona con la activación de un mecanismo alternativo que provoca la elevación, no controlada, de la TA. Para comprobar esto se propone, en estudios posteriores, evaluar la potencial asociación entre niveles séricos de AGCC y la expresión de ambos receptores.
- Tienen una baja expresión de transportadores de AGCC a nivel intestinal. En este caso, nuevamente se propone que en pacientes cHTA- hay cierto aumento en la concentración de AGCC en el intestino debido a la presencia de bacterias productoras de dichos metabolitos, sin embargo, la poca presencia de transportadores a este nivel podría causar una disminución de AGCC en circulación, y por tanto, que la señalización de Gpr41 y OR51E2 se reduzca, provocando que ante la mínima estimulación de Gpr41, OR51E2 actúe elevando la TA. Para ahondar en este planteamiento, se propone llevar a cabo un estudio en el que se midan los niveles séricos de AGCC y su asociación con la expresión de transportadores a nivel intestinal, en humanos.

Siguiendo con los AGCC, uno de los géneros bacterianos que resultó prevalente en el grupo cHTA+ ( $p < 0.05$ ) fue *Prevotella 7*. La presencia de este género pudiera estar ocasionando un incremento en la producción de propionato y por ende contribuir a disminuir los niveles de TA<sup>127</sup>. Recientemente se reportó que la

administración de este AGCC ayudó a disminuir la TA y la disfunción endotelial en modelos murinos hipertensos<sup>128</sup>. Mientras que en otra publicación se reportó que individuos que padecen HTA presentan niveles bajos de *Prevotella*, en el momento del estudio los niveles de TA de los individuos estaban elevados además de que no tomaban medicamento<sup>22</sup>. Con todo esto, y con el cambio ya discutido en la relación *Bacteroides/Prevotella*, resulta lógico suponer que la diferencia en la abundancia del género *Prevotella* está contribuyendo de manera benéfica en el control de la TA observado en pacientes cHTA+.

El taxón *Desulfovibrio* mostró mayor prevalencia en pacientes cHTA- ( $p < 0.05$ ). De éste se ha observado un aumento en abundancia en pacientes con HTA<sup>22,48</sup>. Los miembros de este género son capaces de reducir el sulfato a ácido sulfhídrico, el cual provoca vasodilatación y disminución de la presión arterial. Por tal motivo, alguno de los metabolitos generados por este género bacteriano pudiera relacionarse con cambios a nivel vascular que favorezcan un inadecuado control de la TA<sup>22,129</sup>. Por otra parte, si se toma en consideración que estos pacientes son adultos mayores y que en promedio toman cuatro o más medicamentos diferentes, es factible especular que frente al estado de disbiosis que sufren, su organismo, en un intento por mantener un estado de salud óptimo, esté promoviendo la colonización de bacterias benéficas<sup>130</sup>.

En lo concerniente al resto de taxones que tuvieron una abundancia relativa mayor en pacientes cHTA- que en pacientes cHTA+ ( $p < 0.05$ ), el género *Methanobrevibacter* se ha visto asociado con ganancia de peso, alteraciones en la tolerancia a la glucosa y con riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares<sup>131-133</sup>. Por su parte, el filo *Synergistetes*, el cual alberga al género *Cloacibacillus* (tanto filo como género con diferencia significativa entre grupos), se caracteriza por ser oportunista, se encuentra involucrado en la patogénesis de la periodontitis (infección e inflamación de las encías)<sup>121</sup> y en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos<sup>134</sup>; en conjunto con lo anterior, se ha visto que metabolitos generados por la microbiota oral intervienen en la regulación de la TA<sup>9,135</sup>.

Finalmente, en vista de que la diferencia entre grupos de estudio puede no deberse solamente a la composición de la microbiota intestinal, sino a las funciones que lleva a cabo, se realizó el análisis de predicción metagenómica funcional con la herramienta PICRUST<sup>98</sup> que infiere la actividad metabólica basada en las secuencias del gen ARNr 16S con que se alimenta. Para este análisis también se utilizaron las pruebas estadísticas “clásicas” (t de Student y U de Mann – Whitney), por lo que al igual que en el caso del análisis taxonómico, se presenta el conflicto de la presencia excesiva de ceros o ausencia de funciones (una o más funciones tienen una abundancia igual a cero en una o más muestras). Se propone que en un futuro se utilicen herramientas estadísticas alternativas (pruebas que minimicen el efecto de los ceros, tales como ZIP, ZINB y ZIG) para comprobar si las diferencias significativas encontradas a nivel funcional realmente lo son.

En resumen, la abundancia de 13 vías metabólicas presentó un cambio significativo ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de pacientes, controlados vs. no controlados (**Fig. 20**). En general se observa un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en estas 13 rutas en cHTA-, a excepción de la supervía de biosíntesis de poliamina II y la degradación de amina biogénica aromática, las cuales se ven favorecidas en abundancia en pacientes en cHTA+. En torno a este análisis, es necesario resaltar la relevancia de la asociación de las poliaminas (vía involucrada: supervía de biosíntesis de poliamina II, **Fig. 20**) en condiciones de salud en el proceso de envejecimiento<sup>46</sup> y con la regulación del tono vascular<sup>136</sup>, lo que podría estar ayudando a los pacientes cHTA+ a controlar sus niveles de TA. También cabe señalar la posible implicación de las vías involucradas en la producción de metano como la biosíntesis de factor 420, biosíntesis de coenzima B y asimilación de formaldehído I (**Fig. 20**), ya que dicho compuesto juega un papel documentado en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas<sup>129</sup>, incluyendo HTA, lo cual podría explicar su observación en pacientes cHTA-. Adicionalmente, el haber hallado diferencias en las vías metabólicas apoya lo previamente planteado con el análisis de beta – diversidad: la diferencia entre la microbiota intestinal de pacientes cHTA- y pacientes cHTA+ puede estar a nivel funcional, y ser un reflejo de las diferencias en abundancia de taxones entre grupos.



## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con el presente estudio se llevó a cabo la primera caracterización reportada de la microbiota intestinal de un grupo de adultos mayores mexicanos, encontrando 17 filos y 302 géneros bacterianos diferentes, así como una composición similar a lo reportado para población estadounidense. Además, las observaciones derivadas del mismo sugieren que la composición bacteriana de la microbiota intestinal, efectivamente, difiere entre pacientes hipertensos controlados y no controlados bajo tratamiento farmacológico con ARA II, y que posiblemente dicha diferencia entre grupos de estudio se encuentra a nivel funcional de la microbiota intestinal. Esto marca una pauta para ampliar el presente estudio, confirmar los resultados encontrados y ahondar en el conocimiento de la relación entre microbiota intestinal y el control de la TA.

## REFERENCIAS

1. Nilsson, P. M. Blood pressure strategies and goals in elderly patients with hypertension. *Exp. Gerontol.* **87**, 151–152 (2017).
2. Ogura, S. & Jakovljevic, M. M. Editorial: Global Population Aging - Health Care, Social and Economic Consequences. *Front. Public Heal.* **6**, 335 (2018).
3. Setters, B. & Holmes, H. M. Hypertension in the Older Adult. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* **44**, 529–539 (2017).
4. Carey, R. M. *et al.* Resistant Hypertension: Detection, Evaluation, and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension* **72**, E53–E90 (2018).
5. Masnoon, N., Shakib, S., Kalisch-Ellett, L. & Caughey, G. E. What is polypharmacy? A systematic review of definitions. *BMC Geriatr.* **17**, 230 (2017).
6. Mukete, B. N. & Ferdinand, K. C. Polypharmacy in Older Adults With Hypertension: A Comprehensive Review. *J. Clin. Hypertens.* **18**, 10–18 (2016).
7. Butler, M. G. Genetics of hypertension. Current status. *J. Med. Liban.* **58**, 175–8 (2010).
8. Cooper-DeHoff, R. M. & Johnson, J. A. Hypertension pharmacogenomics: in search of personalized treatment approaches. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 110–122 (2016).
9. Al Khodor, S., Reichert, B. & Shatat, I. F. The Microbiome and Blood Pressure: Can Microbes Regulate Our Blood Pressure? *Front. Pediatr.* **5**, 138 (2017).
10. Pevsner-Fischer, M., Blacher, E., Tatirovsky, E., Ben-Dov, I. Z. & Elinav, E. The gut microbiome and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **26**, 1–8 (2017).
11. Yang, T. *et al.* Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension. *Hypertension* **65**, 1331–1340 (2015).
12. Sarangi, A. N., Goel, A. & Aggarwal, R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **9**, 62–73 (2019).
13. Beard, J. R. *et al.* The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *Lancet* **387**, 2145–2154 (2016).
14. Organización Mundial de la Salud. *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud.* (2015). [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186466/9789240694873\\_spa.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186466/9789240694873_spa.pdf?sequence=1)
15. Ley de los derechos de las personas adultas mayores 36 (2020). [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/245\\_240120.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/245_240120.pdf)
16. United Nations. *World Population Ageing 2019: Highlights.* (2019). <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2019-Highlights.pdf>
17. Wong, R. *et al.* Progression of aging in Mexico: the Mexican Health and Aging Study (MHAS) 2012. *Salud Publica Mex.* **57**, S79-89 (2015).
18. Angel, J. L., Vega, W. & López-Ortega, M. Aging in Mexico: Population Trends and Emerging Issues. *Gerontologist* **57**, 153–162 (2016).
19. United Nations. *World Population Ageing 2015.* (2015). [https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015\\_Report.pdf](https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf)
20. Anker, D. *et al.* Screening and treatment of hypertension in older adults: less is more? *Public Health Rev.* **39**, 26 (2018).
21. Zhou, B. *et al.* Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet* **389**, 37–55 (2017).
22. Dan, X. *et al.* Differential Analysis of Hypertension-Associated Intestinal Microbiota. *Int. J. Med. Sci.* **16**, 872–881 (2019).
23. Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C. & Barquera, S.

- Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. *Ensanut MC* 2016. *Salud Publica Mex.* **60**, 233–243 (2018).
24. Ma, T. K. W., Kam, K. K. H., Yan, B. P. & Lam, Y.-Y. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1273–1292 (2010).
  25. Pérez-Díaz, I., Hiriart, M., Olivares-Reyes, J. A. & Robles-Díaz, G. Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2: Características y su papel en el funcionamiento celular. *Rev. Educ. Bioquímica* **25**, 55–60 (2006).
  26. Tamargo, J. *et al.* Características farmacológicas de los ARA-II. ¿Son todos iguales? *Rev. Española Cardiol. Supl.* **6**, 10C-24C (2006).
  27. Alba-Leonel, A., Fajardo-Ortiz, G. & Papaqui-Hernández, J. Farmacoepidemiología de los fármacos antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA) II en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial. México. *Rev. Enfermería Neurológica* **13**, 139–146 (2014).
  28. Alba-Leonel, A. *et al.* Prescription patterns of antihypertensives in a community health centre in Mexico City: a drug utilization study. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **30**, 276–281 (2016).
  29. Lindholm, L. H. & Ekblom, T. Hypertension in the elderly. *Clin. Exp. Hypertens.* **15**, 1343–52 (1993).
  30. Wright, J. M., Musini, V. M. & Gill, R. First-line drugs for hypertension. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2018) doi:10.1002/14651858.CD001841.pub3.
  31. Instituto Mexicano del Seguro Social. *Diagnóstico y tratamiento de hipertensión arterial en el adulto mayor. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. Guía de Práctica Clínica.* (IMSS, 2017). <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/238GER.pdf>
  32. Secretaría de Salud. *Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial en el primer nivel de atención.* CENETEC. (CENETEC, 2014). [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/076-GCP\\_\\_HipertArterial1NA/HIPERTENSION\\_EVR\\_CENETEC.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/076-GCP__HipertArterial1NA/HIPERTENSION_EVR_CENETEC.pdf)
  33. Marín, R. & Gorostidi, Y. M. *Ventana a otras especialidades. Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial. GH CONTINUADA.* (2003).
  34. Rodríguez, M. S., Parodi, R. L. & Carbó, J. Tratamiento combinado de la hipertensión arterial en *Hipertensión arterial, epidemiología, fisiología, diagnóstico y terapéutica.* (eds. Gómez Llambi, H. & Piskorz, D.) 573–575 (Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, 2013).
  35. Hugtenburg, J., Vervloet, M., van Dijk, L., Timmers, L. & Elders. Definitions, variants, and causes of nonadherence with medication: a challenge for tailored interventions. *Patient Prefer. Adherence* **7**, 675–82 (2013).
  36. Egan, B. M. *et al.* Improving Hypertension Control in Primary Care With the Measure Accurately, Act Rapidly, and Partner With Patients Protocol. *Hypertension* **72**, 1320–1327 (2018).
  37. Noubiap, J. J. *et al.* Global prevalence of resistant hypertension: a meta-analysis of data from 3.2 million patients. *Heart* **105**, 98–105 (2019).
  38. Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S. & Williams, D. A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* **32**, 9–25 (2018).
  39. Knight, R. *et al.* The Microbiome and Human Biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **18**, 65–86 (2017).
  40. Katsi, V. *et al.* GUT Microbiome-GUT Dysbiosis-Arterial Hypertension: New Horizons. *Curr. Hypertens. Rev.* **15**, 40–46 (2019).
  41. Fava, F., Rizzetto, L. & Tuohy, K. M. Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system. *Proc. Nutr. Soc.* 1–12 (2018) doi:10.1017/S0029665118002719.
  42. Odamaki, T. *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* **16**, 90 (2016).
  43. Vemuri, R. *et al.* Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. *Biomed Res. Int.* **2018**, 4178607 (2018).

44. O'Toole, P. W. & Claesson, M. J. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *Int. Dairy J.* **20**, 281–291 (2010).
45. Jeffery, I. B., Lynch, D. B. & O'Toole, P. W. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME J.* **10**, 170–182 (2016).
46. Biagi, E. *et al.* The gut microbiota of centenarians: Signatures of longevity in the gut microbiota profile. *Mech. Ageing Dev.* **165**, 180–184 (2017).
47. O'Toole, P. W. & Jeffery, I. B. Microbiome–health interactions in older people. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 119–128 (2018).
48. Li, J. *et al.* Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome* **5**, 14 (2017).
49. Honour, J. The possible involvement of intestinal bacteria in steroidal hypertension. *Endocrinology* **110**, 285–287 (1982).
50. Ma, J. & Li, H. The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension. *Front. Pharmacol.* **9**, 1082 (2018).
51. Adnan, S. *et al.* Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. *Physiol. Genomics* **49**, 96–104 (2017).
52. Kang, Y. & Cai, Y. Gut microbiota and hypertension: From pathogenesis to new therapeutic strategies. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **42**, 110–117 (2018).
53. Mell, B. *et al.* Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiol. Genomics* **47**, 187–197 (2015).
54. Pluznick, J. L. *et al.* Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 4410–4415 (2013).
55. Natarajan, N. *et al.* Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41. *Physiol. Genomics* **48**, 826–834 (2016).
56. Yan, Q. *et al.* Alterations of the Gut Microbiome in Hypertension. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 1–9 (2017).
57. Ge, X. *et al.* The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Adv. Nutr.* **11**, 66–76 (2020).
58. Nichols, R. G., Peters, J. M. & Patterson, A. D. Interplay Between the Host, the Human Microbiome, and Drug Metabolism. *Hum. Genomics* **13**, 27 (2019).
59. Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R. & Goodman, A. L. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature* **570**, 462–467 (2019).
60. Tuteja, S. & Ferguson, J. F. Gut Microbiome and Response to Cardiovascular Drugs. *Circ. Genomic Precis. Med.* **12**, 421–429 (2019).
61. Choi, M. S., Yu, J. S., Yoo, H. H. & Kim, D. H. The role of gut microbiota in the pharmacokinetics of antihypertensive drugs. *Pharmacol. Res.* **130**, 164–171 (2018).
62. Wilson, I. D. & Nicholson, J. K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* **179**, 204–222 (2017).
63. Breitwieser, F. P., Lu, J. & Salzberg, S. L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief. Bioinform.* **20**, 1125–1136 (2019).
64. Del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S. & Ferrer-Martínez, M. Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **36**, 241–245 (2018).
65. Jo, J.-H., Kennedy, E. A. & Kong, H. H. Research Techniques Made Simple: Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing in Cutaneous Research. *J. Invest. Dermatol.* **136**, e23–e27 (2016).
66. Teng, F. *et al.* Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Sci. Rep.* **8**, 16321 (2018).
67. Videnska, P. *et al.* Stool sampling and DNA isolation kits affect DNA quality and bacterial composition

- following 16S rRNA gene sequencing using MiSeq Illumina platform. *Sci. Rep.* **9**, 13837 (2019).
68. Claassen, S. *et al.* A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *J. Microbiol. Methods* **94**, 103–110 (2013).
  69. Lim, M. Y., Song, E.-J., Kim, S. H., Lee, J. & Nam, Y.-D. Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Syst. Appl. Microbiol.* **41**, 151–157 (2018).
  70. Goodrich, J. K. *et al.* Conducting a Microbiome Study. *Cell* **158**, 250–262 (2014).
  71. Fiedorová, K. *et al.* The Impact of DNA Extraction Methods on Stool Bacterial and Fungal Microbiota Community Recovery. *Front. Microbiol.* **10**, 821 (2019).
  72. Giasuddin, A. S. M. Polymerase chain reaction technique: fundamental aspects and applications in clinical diagnostics. *J. Islam. Acad. Sci.* **8**, 29–32 (1995).
  73. Clooney, A. G. *et al.* Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. *PLoS One* **11**, e0148028 (2016).
  74. Whon, T. W. *et al.* The effects of sequencing platforms on phylogenetic resolution in 16 S rRNA gene profiling of human feces. *Sci. Data* **5**, 180068 (2018).
  75. Sze, M. A. & Schloss, P. D. The Impact of DNA Polymerase and Number of Rounds of Amplification in PCR on 16S rRNA Gene Sequence Data. *mSphere* **4**, e00163-19 (2019).
  76. Siegwald, L. *et al.* The Impact of Bioinformatics Pipelines on Microbiota Studies: Does the Analytical “Microscope” Affect the Biological Interpretation? *Microorganisms* **7**, 393 (2019).
  77. Ramírez-García, E., Moreno-Tamayo, K., Briseño-Fabian, S. C. & Sánchez-García, S. Sarcopenia and Sarcopenic Obesity in Older Community-Dwelling Adults With Favorable Health Conditions. *J Aging Res Clin Pract.* **6**, 143–148 (2017).
  78. Doubova, S. V., Sánchez-García, S., Infante-Castañeda, C. & Pérez-Cuevas, R. Factors associated with regular physical exercise and consumption of fruits and vegetables among Mexican older adults. *BMC Public Health* **16**, 952 (2016).
  79. Sánchez-García, S. *et al.* Frailty in community-dwelling older adults: association with adverse outcomes. *Clin. Interv. Aging* **12**, 1003–1011 (2017).
  80. Consejo de Salubridad General. *Guía de Práctica Clínica: Evaluación y Seguimiento Nutricional del Adulto Mayor.* (2014).
  81. Wang, M., Ji, X., Wang, B., Li, Q. & Zhou, J. Simultaneous Evaluation of the Preservative Effect of RNA later on Different Tissues by Biomolecular and Histological Analysis. *Biopreserv. Biobank.* **16**, 426–433 (2018).
  82. Chen, Z. *et al.* Impact of Preservation Method and 16S rRNA Hypervariable Region on Gut Microbiota Profiling. *mSystems* **4**, e00271-18 (2019).
  83. Hallmaier-Wacker, L. K., Lueert, S., Roos, C. & Knauf, S. The impact of storage buffer, DNA extraction method, and polymerase on microbial analysis. *Sci. Rep.* **8**, 6292 (2018).
  84. Laserna Mendieta, E. J. & Claesson, M. J. Creación de librerías mediante amplificación del ARN ribosomal 16S para la caracterización de la microbiota. *Lab. Med. a glance* **4**, 9–13 (2016).
  85. Gumińska, N. *et al.* Culture purification and DNA extraction procedures suitable for next-generation sequencing of euglenids. *J. Appl. Phycol.* **30**, 3541–3549 (2018).
  86. Clarridge, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 840–862 (2004).
  87. Nearing, J. T., Douglas, G. M., Comeau, A. M. & Langille, M. G. I. Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ* **6**, e5364 (2018).
  88. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**, 581–583 (2016).
  89. Perofsky, A. C., Lewis, R. J. & Meyers, L. A. Terrestriality and bacterial transfer: a comparative study of gut microbiomes in sympatric Malagasy mammals. *ISME J.* **13**, 50–63 (2019).

90. Ingala, M. R. *et al.* Comparing Microbiome Sampling Methods in a Wild Mammal: Fecal and Intestinal Samples Record Different Signals of Host Ecology, Evolution. *Front. Microbiol.* **9**, 803 (2018).
91. Prehn-Kristensen, A. *et al.* Reduced microbiome alpha diversity in young patients with ADHD. *PLoS One* **13**, e0200728 (2018).
92. Pinto, J. R. Statistical methods for the analysis of microbiome compositional data in HIV studies (University of Vic - Universitat Central de Catalunya, 2018).
93. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60 (2011).
94. Boutin, S. *et al.* Comparison of Microbiomes from Different Niches of Upper and Lower Airways in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *PLoS One* **10**, e0116029 (2015).
95. Xia, Y. & Sun, J. Hypothesis testing and statistical analysis of microbiome. *Genes Dis.* **4**, 138–148 (2017).
96. Louca, S., Mazel, F., Doebeli, M. & Parfrey, L. W. A census-based estimate of Earth's bacterial and archaeal diversity. *PLOS Biol.* **17**, e3000106 (2019).
97. Mariat, D. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* **9**, 123 (2009).
98. Langille, M. G. I. *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**, 814–821 (2013).
99. Lin, D. *et al.* Association between the oral microbiome and brain resting state connectivity in smokers. *Neuroimage* **200**, 121–131 (2019).
100. Weiss, S. *et al.* Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* **5**, 27 (2017).
101. Wong, R. G., Wu, J. R. & Gloor, G. B. Expanding the UniFrac Toolbox. *PLoS One* **11**, e0161196 (2016).
102. Colín-Ramírez, E. *et al.* Protocol for a prospective longitudinal study of risk factors for hypertension incidence in a Mexico City population: the Tlalpan 2020 cohort. *BMJ Open* **7**, e016773 (2017).
103. World Health Organization. *Noncommunicable diseases country profiles 2018*. (2018). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274512>
104. Yatsunenkov, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227 (2012).
105. Cani, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**, 1716–1725 (2018).
106. Shen, R.-L., Dang, X.-Y., Dong, J.-L. & Hu, X.-Z. Effects of Oat  $\beta$ -Glucan and Barley  $\beta$ -Glucan on Fecal Characteristics, Intestinal Microflora, and Intestinal Bacterial Metabolites in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11301–11308 (2012).
107. Wang, Y. *et al.* High Molecular Weight Barley  $\beta$ -Glucan Alters Gut Microbiota Toward Reduced Cardiovascular Disease Risk. *Front. Microbiol.* **7**, 129 (2016).
108. Wagner, B. D. *et al.* On the Use of Diversity Measures in Longitudinal Sequencing Studies of Microbial Communities. *Front. Microbiol.* **9**, 1037 (2018).
109. Morrissey, E. M. *et al.* Phylogenetic organization of bacterial activity. *ISME J.* **10**, 2336–2340 (2016).
110. Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C. & Gasbarrini, A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res. Int.* **2017**, 9351507 (2017).
111. Meng, Y., Li, X., Zhang, J., Wang, C. & Lu, F. Effects of Different Diets on Microbiota in The Small Intestine Mucus and Weight Regulation in Rats. *Sci. Rep.* **9**, 8500 (2019).
112. Méndez-Salazar, E. O., Ortiz-López, M. G., Granados-Silvestre, M. D. L. Á., Palacios-González, B. & Menjivar, M. Altered Gut Microbiota and Compositional Changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican Undernourished and Obese Children. *Front. Microbiol.* **9**, 2494 (2018).
113. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).
114. Kovatcheva-Datchary, P. *et al.* Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella. *Cell Metab.* **22**, 971–982 (2015).
115. Liu, J. *et al.* Inside Out: HIV, the Gut Microbiome, and the Mucosal Immune System. *J. Immunol.* **198**,

- 605–614 (2017).
116. Senghor, B., Sokhna, C., Ruimy, R. & Lagier, J.-C. Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance. *Hum. Microbiome J.* **7–8**, 1–9 (2018).
  117. Mandal, S. *et al.* Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **26**, 27663 (2015).
  118. Lee, S. M. *et al.* Gut microbiota and butyrate level changes associated with the long-term administration of proton pump inhibitors to old rats. *Sci. Rep.* **9**, 6626 (2019).
  119. Org, E. *et al.* Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol.* **18**, 70 (2017).
  120. Smith, B. J. *et al.* Changes in the gut microbiome and fermentation products concurrent with enhanced longevity in acarbose-treated mice. *BMC Microbiol.* **19**, 130 (2019).
  121. Wu, Z.-X. *et al.* The changes of gut microbiota after acute myocardial infarction in rats. *PLoS One* **12**, e0180717 (2017).
  122. Yang, T. *et al.* Impaired butyrate absorption in the proximal colon, low serum butyrate and diminished central effects of butyrate on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol.* **226**, e13256 (2019).
  123. Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M. & Kim, C. H. Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice. *Gastroenterology* **145**, 396-406.e1–10 (2013).
  124. de la Cuesta-Zuluaga, J. *et al.* Higher Fecal Short-Chain Fatty Acid Levels Are Associated with Gut Microbiome Dysbiosis, Obesity, Hypertension and Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Nutrients* **11**, 51 (2018).
  125. Pluznick, J. L. Gut microbiota in renal physiology: focus on short-chain fatty acids and their receptors. *Kidney Int.* **90**, 1191–1198 (2016).
  126. Pluznick, J. L. Microbial Short-Chain Fatty Acids and Blood Pressure Regulation. *Curr. Hypertens. Rep.* **19**, 25 (2017).
  127. Poeker, S. A. *et al.* Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS). *Sci. Rep.* **8**, 4318 (2018).
  128. Bartolomaeus, H. *et al.* Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. *Circulation* **139**, 1407–1421 (2019).
  129. Tomasova, L., Konopelski, P. & Ufnal, M. Gut Bacteria and Hydrogen Sulfide: The New Old Players in Circulatory System Homeostasis. *Molecules* **21**, 1558 (2016).
  130. Lazar, V. *et al.* Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front. Immunol.* **9**, 1830 (2018).
  131. Mbakwa, C. A. *et al.* Gut colonization with methanobrevibacter smithii is associated with childhood weight development. *Obesity* **23**, 2508–2516 (2015).
  132. Kelly, T. N. *et al.* Gut Microbiome Associates With Lifetime Cardiovascular Disease Risk Profile Among Bogalusa Heart Study Participants. *Circ. Res.* **119**, 956–64 (2016).
  133. Wilder-Smith, C. H., Olesen, S. S., Materna, A. & Drewes, A. M. Breath methane concentrations and markers of obesity in patients with functional gastrointestinal disorders. *United Eur. Gastroenterol. J.* **6**, 595–603 (2018).
  134. Siegel, E., Bermejo, J., Flade, I. & Hasslacher, C. Cardiovascular Complications and Composition of the Intestinal Microbiome in Patients with Type 2 Diabetes. *Int. J. Diabetes Clin. Res.* **5**, 086 (2018).
  135. Bryan, N. S., Tribble, G. & Angelov, N. Oral Microbiome and Nitric Oxide: the Missing Link in the Management of Blood Pressure. *Curr. Hypertens. Rep.* **19**, 33 (2017).
  136. Forte, A. *et al.* The Polyamine Pathway as a Potential Target for Vascular Diseases: Focus on Restenosis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **9**, 706–714 (2011).

# ANEXO I. DICTAMEN DE APROBACIÓN



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



Ciudad de México, a 27 de agosto de 2018.

## Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica

No. de registro: 20/2018/I

El Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), con fundamento en lo dispuesto por los artículos 99, 100, 102 y 111 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud; 41, fracciones I y III de la Ley de los Institutos Nacionales de Salud y en el Reglamento Interior del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica y consensuando la opinión de los Comités de Ética en Investigación y de Bioseguridad, emite el presente:

### DICTAMEN APROBATORIO

Al proyecto titulado:

**“Análisis del microbioma intestinal en adultos mayores con hipertensión arterial”**

De esto se notifica a la Dra. Mirelle Vanessa Gonzalez Covarrubias, investigadora responsable del mismo.

El Comité de Investigación, el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Bioseguridad, se reservan el derecho de hacer revisiones periódicas cuando así lo estimen pertinente. Sin perjuicio de lo anterior, se deberá entregar a través de la Intranet, un informe semestral con los avances y al término de la investigación, se deberá enviar una copia del o los artículos o tesis generados.

Atentamente

  
**Dra. Lorena Orozco**  
Presidenta del Comité de Investigación



## ANEXO II. INSTRUCTIVO DE TOMA DE MUESTRA FECAL COLABORACIÓN INMEGEN/CMN SXXI

### RECOMENDACIONES

- ◆ Lávese muy bien las manos antes de tomar las muestras.
- ◆ Utilizar la muestra de la mañana (antes de ir a su cita) o tomarla un día antes de la cita.
- ◆ No importa la consistencia de las heces.
- ◆ Llenar los datos de la etiqueta.
- ◆ Si necesita ayuda para tomar la muestra pídale a un familiar, se provee de un frasco en espátula con resistencia suficiente para tomar la muestra.
- ◆ Deseche la bolsa que se utilizó para el inodoro a la basura.
- ◆ Limpie bien alrededor del frasco con la toalla satinizante que esta en la bolsa.
- ◆ Asegúrese de cerrar bien el frasco métalo a la bolsa y cierre.
- ◆ Métalo al refrigerador el sello de la bolsa impedirá cualquier contaminación.
- ◆ Si utiliza pañal tome la muestra de donde las heces no estén en contacto con el papel del pañal.
- ◆ Lávese muy bien las manos después de tomar la muestra.

**CUALQUIER DUDA COMUNÍQUESE  
CON NOSOTROS:**



**56-27-69-00 Extensión 21213**



**53-50-19-00 Extensión 1212**



**Toma de Muestra  
Fecal**



## KIT



### Hacer del baño, **LAS HECES NO DEBEN DE TENER CONTACTO**

- **CON LA ORINA.**
- **AGUA DEL SANITARIO.**
- **NI PAPEL.**



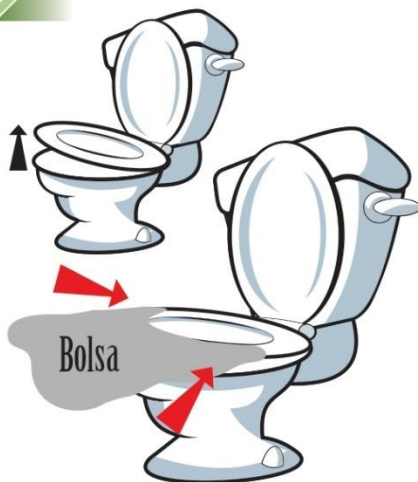
Frasco para Muestras

Bolsa de plástico

Guante de Plástico



### LEVANTE Y FORRE EL ASIENTO con la bolsa blanca



Bolsa



Bolsa



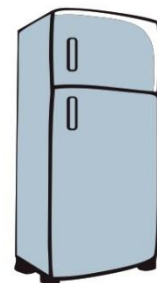
Lávese muy bien las manos antes y después de tomar las muestras.



### Tomar con la espátula una muestra del **TAMAÑO DE 2 NUECES**, colocar dentro del recipiente.



### MANTENER LA MUESTRA EN REFRIGERACIÓN hasta su entrega en el hospital.



Llenar los datos de la etiqueta.



- Asegúrese de cerrar bien el frasco metal a la bolsa y cierre.
- Métalo al refrigerador el sello de la bolsa impedirá cualquier contaminación.

### ANEXO III. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL A NIVEL DE FILO DE UN GRUPO DE ADULTOS MAYORES MEXICANOS

Reino	Filo	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	<i>Firmicutes</i>	60.978	60.978
Bacteria	<i>Bacteroidetes</i>	28.148	89.126
Bacteria	<i>Proteobacteria</i>	5.812	94.937
Bacteria	<i>Actinobacteria</i>	1.612	96.549
Bacteria	<i>Tenericutes</i>	1.176	97.725
Bacteria	No asignado*	0.872	98.597
Bacteria	<i>Cyanobacteria</i>	0.341	98.938
Bacteria	<i>Verrucomicrobia</i>	0.284	99.223
Bacteria	<i>Lentisphaerae</i>	0.228	99.450
Bacteria	<i>Fusobacteria</i>	0.142	99.592
Bacteria	<i>Epsilonbacteraeota</i>	0.123	99.716
Archaea	<i>Euryarchaeota</i>	0.076	99.791
Bacteria	<i>Patescibacteria</i>	0.076	99.867
Bacteria	<i>Synergistetes</i>	0.057	99.924
Bacteria	<i>Elusimicrobia</i>	0.047	99.972
Bacteria	<i>Planctomycetes</i>	0.009	99.981
Bacteria	<i>Spirochaetes</i>	0.009	99.991
No asignado*	No asignado*	0.009	100

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico implicado.

## ANEXO IV. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL A NIVEL DE GÉNERO DE UN GRUPO DE ADULTOS MAYORES MEXICANOS

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	11.794	11.794
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	No asignado*	7.518	19.312
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 9	5.271	24.583
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	No asignado*	2.664	27.247
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-014	2.484	29.731
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Grupo [Eubacterium] coprostanoligenes	2.484	32.215
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes	2.351	34.566
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	2.143	36.708
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Tannerellaceae	Parabacteroides	1.906	38.614
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-002	1.830	40.444
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	No cultivado**	1.830	42.273
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-010	1.801	44.075
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-005	1.479	45.554
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	Grupo Christensenellaceae R-7	1.469	47.023
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Blautia	1.356	48.379
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	No asignado*	No asignado*	1.318	49.697
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 2	1.223	50.920
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Dialister	1.204	52.124
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcus 1	1.195	53.318
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Subdoligranulum	1.195	54.513
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia-Shigella	1.147	55.660
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	Phascolarctobacterium	0.891	56.551
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcus 2	0.872	57.423
Bacteria	No asignado*	No asignado*	No asignado*	No asignado*	No asignado*	0.872	58.295
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	No asignado*	0.853	59.149
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Eubacterium] eligens	0.777	59.926
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Sutterella	0.739	60.666
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF39	No asignado*	No asignado*	0.739	61.405
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	0.721	62.126
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	grupo [Ruminococcus] torques	0.721	62.846
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium 5	0.721	63.567

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Butyricoccus	0.702	64.268
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-013	0.702	64.970
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	0.645	65.614
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Grupo Ruminococcaceae NK4A214	0.645	66.259
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Familia XIII	Familia XIII grupo AD3011	0.597	66.856
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Dorea	0.588	67.444
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Veillonella	0.588	68.032
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Alloprevotella	0.578	68.610
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Paraprevotella	0.578	69.188
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	Butyricimonas	0.559	69.748
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-003	0.559	70.307
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium 9	0.550	70.857
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae	Barnesiella	0.540	71.397
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium 6	0.540	71.938
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae 1	Clostridium sensu stricto 1	0.531	72.469
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Roseburia	0.521	72.990
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	0.502	73.493
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospira	0.465	73.957
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	No cultivado**	0.465	74.422
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Oscillibacter	0.446	74.867
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	Odoribacter	0.436	75.303
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium	0.417	75.721
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Eubacterium] hallii	0.408	76.128
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-010	0.379	76.507
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Fusicatenibacter	0.370	76.877
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-001	0.360	77.237
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Parasutterella	0.360	77.598
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	No asignado*	0.351	77.948
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	No asignado*	No asignado*	0.332	78.280
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Familia XIII	Familia XIII UCG-001	0.332	78.612
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo Lachnospiraceae NK4A136	0.332	78.944
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	No asignado*	0.332	79.276

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Coprococcus 2	0.313	79.589
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	0.313	79.901
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Grupo Clostridiales vadinBB60	No asignado*	0.294	80.195
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo Lachnospiraceae ND3007	0.294	80.489
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae	Coprobacter	0.284	80.774
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Eubacterium] ruminantium	0.275	81.049
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Grupo intestinal Rikenellaceae RC9	0.265	81.314
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Coprococcus 1	0.265	81.579
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	GCA-900066575	0.265	81.845
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-004	0.265	82.110
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	No cultivado**	0.256	82.366
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo Lachnospiraceae NC2004	0.256	82.622
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Ruminococcus] gouvreauii	0.256	82.878
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichaceae UCG-003	0.256	83.134
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	No cultivado**	Taxón ambiguo	0.256	83.390
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Bilophila	0.256	83.646
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Collinsella	0.246	83.893
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Butyrivibrio	0.246	84.139
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	GCA-900066225	0.246	84.386
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	0.228	84.613
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Eubacterium] ventriosum	0.228	84.841
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	No asignado*	0.228	85.068
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Flavonifractor	0.228	85.296
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Intestinimonas	0.228	85.523

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	No cultivado**	0.218	85.741
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Caproiciproducens	0.218	85.959
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Ralstonia	0.218	86.177
Bacteria	Cyanobacteria	Melainabacteria	Gastranaerophilales	No asignado*	No asignado*	0.209	86.386
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Grupo Clostridiales vadinBB60	No cultivado**	0.209	86.595
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 7	0.199	86.794
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Moryella	0.199	86.993
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-009	0.199	87.192
Bacteria	Firmicutes	No asignado*	No asignado*	No asignado*	No asignado*	0.199	87.391
Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	Akkermansia	0.199	87.590
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	No cultivado**	0.190	87.780
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Grupo Clostridiales vadinBB60	Metagenoma intestinal	0.190	87.969
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Coprococcus 3	0.190	88.159
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Eubacterium] xylanophilum	0.190	88.349
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Negativibacillus	0.190	88.538
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	No asignado*	0.190	88.728
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	0.180	88.908
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Defluviitaleaceae	Defluviitaleaceae UCG-011	0.180	89.088
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	No cultivado**	0.180	89.268
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Bacteria Porphyromonadaceae no cultivada**	0.171	89.439
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo Lachnospiraceae NK4B4	0.171	89.609
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-008	0.171	89.780
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Eubacterium] oxidoreducens	0.171	89.951
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	UBA1819	0.171	90.121

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*



(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Eggerthella	0.161	90.283
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-004	0.161	90.444
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	DTU089	0.161	90.605
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Megamonas	0.161	90.766
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	No cultivado**	No asignado*	0.161	90.927
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	No asignado*	0.152	91.079
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Weissella	0.152	91.231
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Marvinbryantia	0.152	91.382
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae	No cultivado**	0.142	91.524
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Howardella	0.142	91.667
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo Lachnospiraceae FCS020	0.142	91.809
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Holdemanella	0.142	91.951
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Succinivibrionaceae	No cultivado**	0.142	92.093
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	CAG-56	0.133	92.226
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	No cultivado**	0.133	92.359
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Holdemania	0.133	92.491
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Megasphaera	0.133	92.624
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Eisenbergiella	0.123	92.747
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Slackia	0.114	92.861
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	No cultivado**	0.114	92.975
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Grupo Clostridiales vadinBB60	Organismo no cultivado**	0.114	93.089
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Agathobacter	0.114	93.203
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-003	0.114	93.316
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Bacteroides] pectinophilus	0.114	93.430
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Candidatus Soleaferrea	0.114	93.544
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Fournierella	0.114	93.658
Bacteria	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	0.114	93.771
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	Peptococcus	0.104	93.876
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Faecalitalea	0.104	93.980
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Allisonella	0.104	94.084

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*



(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	Victivallis	0.104	94.188
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.104	94.293
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF39	Bacteria no cultivada**	Bacteria no cultivada**	0.104	94.397
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Familia XI	Ezakiella	0.095	94.492
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Familia XIII	No asignado*	0.095	94.587
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Erysipelatoclostridium	0.095	94.681
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	Acidaminococcus	0.095	94.776
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Succinivibrionaceae	Succinivibrio	0.095	94.871
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Izimaplasmatales	Taxón ambiguo	Taxón ambiguo	0.095	94.966
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriales Incertae Sedis	No cultivado**	0.085	95.051
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Grupo Prevotellaceae NK3B31	0.085	95.137
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Hungatella	0.085	95.222
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Tyzzereella 3	0.085	95.307
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Ruminococcus] gnavus	0.085	95.392
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Catenibacterium	0.085	95.478
Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Opitutales	Puniceicoccaceae	No cultivado**	0.085	95.563
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Rothia	0.076	95.639
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Enterorhabdus	0.076	95.715
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	No cultivado**	Bacteria no cultivada**	0.076	95.791
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	No cultivado**	0.076	95.867
Bacteria	Epsilonbacteraeo- ta	Campylobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	0.076	95.942
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Granulicatella	0.076	96.018
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Tyzzereella 4	0.076	96.094
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Anaerotruncus	0.076	96.170
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichaceae UCG- 004	0.076	96.246
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Grupo [Clostridium] innocuum	0.076	96.322
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Gordonibacter	0.066	96.388

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Senegalimassilia	0.066	96.454
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	CAG-873	0.066	96.521
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Anaerofilum	0.066	96.587
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Oscillospira	0.066	96.653
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	DTU014	Taxón ambiguo	Taxón ambiguo	0.066	96.720
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Solobacterium	0.066	96.786
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Turicibacter	0.066	96.852
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Mitsuokella	0.066	96.919
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Oxalobacter	0.066	96.985
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	No asignado*	No asignado*	0.066	97.052
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF39	Taxón ambiguo	Taxón ambiguo	0.066	97.118
Bacteria	Cyanobacteria	Oxyphotobacteria	Chloroplast	No asignado*	No asignado*	0.057	97.175
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Intestinibacter	0.057	97.232
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Hydrogenoanaerobacterium	0.057	97.289
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium 1	0.057	97.345
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Comamonas	0.057	97.402
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF39	metagenoma intestinal	metagenoma intestinal	0.057	97.459
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter	0.047	97.507
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 6	0.047	97.554
Bacteria	Elusimicrobia	Elusimicrobia	Elusimicrobiales	Elusimicrobiaceae	Elusimicrobium	0.047	97.601
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Familia XI	Gemella	0.047	97.649
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	0.047	97.696
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Taxón ambiguo	0.047	97.744
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	CAG-352	0.047	97.791
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-007	0.047	97.838
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Dielma	0.047	97.886
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	No asignado*	0.047	97.933
Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	Saccharimonadales	Saccharimonadaceae	No asignado*	0.047	97.981
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	No cultivado**	Bacteria no cultivada**	0.047	98.028
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	Sanguibacteroides	0.038	98.066
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-003	0.038	98.104

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Cyanobacteria	Melainabacteria	Gastranaerophilales	Taxón ambiguo	Taxón ambiguo	0.038	98.142
Bacteria	Cyanobacteria	Melainabacteria	Gastranaerophilales	<i>Clostridium</i> sp. K4410.MGS-306	<i>Clostridium</i> sp. K4410.MGS-306	0.038	98.180
Bacteria	Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	Campylobacterales	Arcobacteraceae	Arcobacter	0.038	98.218
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	No asignado*	No asignado*	0.038	98.256
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Lachnoclostridium</i> 12	0.038	98.294
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Tyzzera</i>	0.038	98.331
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Coprobacillus</i>	0.038	98.369
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-006	0.038	98.407
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	No cultivado**	<i>Azospirillum</i> sp. 47_25	0.038	98.445
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	0.038	98.483
Bacteria	Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Cloacibacillus</i>	0.038	98.521
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF39	metagenoma	metagenoma	0.038	98.559
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Atopobiaceae	<i>Atopobium</i>	0.028	98.587
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Atopobiaceae	<i>Olsenella</i>	0.028	98.616
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	metagenoma intestinal	0.028	98.644
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0.028	98.673
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	P5D1-392	<i>Granulicatella</i> sp. BB-11	0.028	98.701
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	No asignado*	0.028	98.730
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Grupo Clostridiales vadinBB60	Bacteria <i>Thermoanaerobacteriales</i> no cultivada**	0.028	98.758
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Familia XI	<i>Peptoniphilus</i>	0.028	98.786
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Acetitomaculum</i>	0.028	98.815
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Romboutsia</i>	0.028	98.843
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	<i>Phocaea</i>	0.028	98.872
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Asteroleplasma</i>	0.028	98.900
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	No cultivado**	0.028	98.929
Bacteria	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	<i>Leptotrichia</i>	0.028	98.957
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	No asignado*	0.028	98.986

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	vadinBE97	Bacteroidales bacteria 55_9	0.028	99.014
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	vadinBE97	No asignado*	0.028	99.042
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	No asignado*	0.028	99.071
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Anaeroplasmatales	Anaeroplasmataceae	Anaeroplasma	0.028	99.099
Archaea	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Methanomassiliicoccales	Methanomassiliicoccaeae	Methanomassiliicoccus	0.019	99.118
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Adlercreutzia	0.019	99.137
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Organismo no cultivado**	0.019	99.156
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	0.019	99.175
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	no cultivado**	Taxón ambiguo	0.019	99.194
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Leuconostoc	0.019	99.213
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	Catabacter	0.019	99.232
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Familia XI	Parvimonas	0.019	99.251
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Taxón ambiguo	0.019	99.270
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Oribacterium	0.019	99.289
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Sellimonas	0.019	99.308
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Grupo [Eubacterium] fissicatena	0.019	99.327
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptoclostridium	0.019	99.346
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Terrisporobacter	0.019	99.365
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Acetanaerobacterium	0.019	99.384
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Taxón ambiguo	0.019	99.403
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Faecalicoccus	0.019	99.422
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	Bacteria de rumen no cultivada**	0.019	99.441
Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	Saccharimonadales	Taxón ambiguo	Taxón ambiguo	0.019	99.460
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Neisseriaceae	Neisseria	0.019	99.479
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus	0.019	99.498
Bacteria	Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	Pyramidobacter	0.019	99.516

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Archaea	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Methanomassiliicoccales	Methanomethylophilaceae	No cultivado**	0.009	99.526
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	0.009	99.535
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	No asignado*	0.009	99.545
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	No cultivado**	No asignado*	0.009	99.554
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Bacteria Bacteroidales no cultivada**	0.009	99.564
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenella	0.009	99.573
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga	0.009	99.583
Bacteria	Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	Helicobacter	0.009	99.592
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	Christensenella	0.009	99.602
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae 1	No asignado*	0.009	99.611
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Anaerofustis	0.009	99.621
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Familia XI	Anaerococcus	0.009	99.630
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Cellulosilyticum	0.009	99.640
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Epulopiscium	0.009	99.649
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	GCA-900066755	0.009	99.659
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-007	0.009	99.668
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Stomatobaculum	0.009	99.678
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	UC5-1-2E3	0.009	99.687
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	No asignado*	0.009	99.697
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Angelakisella	0.009	99.706
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Harryflintia	0.009	99.716
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Papillibacter	0.009	99.725
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Pseudoflavonifractor	0.009	99.735
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium	0.009	99.744
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-008	0.009	99.754
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Grupo Ruminococcaceae V9D2013	0.009	99.763
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Candidatus Stoquefichus	0.009	99.772
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Merdibacter	0.009	99.782
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	No asignado*	0.009	99.791

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*

(CONTINUACIÓN)

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)	Abundancia acumulada (%)
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	<i>Succiniclasticum</i>	0.009	99.801
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	No asignado*	No asignado*	0.009	99.810
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	Bacteria no cultivada**	0.009	99.820
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	<i>vadinBE97</i>	Bacteria no cultivada**	0.009	99.829
Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	Saccharimonadales	No asignado*	No asignado*	0.009	99.839
Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Pirellulales	Pirellulaceae	Grupo intestinal p-1088-a5	0.009	99.848
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	0.009	99.858
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Succinivibrionaceae	No asignado*	0.009	99.867
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	<i>Achromobacter</i>	0.009	99.877
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	0.009	99.886
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	<i>Actinobacillus</i>	0.009	99.896
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	<i>Aggregatibacter</i>	0.009	99.905
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	No asignado*	0.009	99.915
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	0.009	99.924
Bacteria	Proteobacteria	No asignado*	No asignado*	No asignado*	No asignado*	0.009	99.934
Bacteria	Spirochaetes	Brachyspirae	Brachyspirales	Brachyspiraceae	<i>Brachyspira</i>	0.009	99.943
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Izimaplasmatales	Organismo no cultivado**	Organismo no cultivado**	0.009	99.953
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Izimaplasmatales	No asignado*	No asignado*	0.009	99.962
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF39	Procariota no cultivado**	Procariota no cultivado**	0.009	99.972
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF39	Bacteria de rumen no identificada RF39	Bacteria de rumen no identificada RF39	0.009	99.981
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	<i>Ureaplasma</i>	0.009	99.991
No asignado*	No asignado*	No asignado*	No asignado*	No asignado*	No asignado*	0.009	100.000

\* No asignado. Secuencias que no cumplieron con el porcentaje de similitud establecido al ser comparadas con la base de datos del gen ARNr 16S y que, por ende, no pudieron ser identificadas en el nivel taxonómico en cuestión

\*\* No cultivado. Secuencias pertenecientes a organismos que no han sido cultivados *in vitro*