



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Efecto de diferentes tipos de mieles sobre la microbiota y los marcadores de inflamación

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Diana Cristal Coutiño Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Nimbe Torres y Torres  
INCMNSZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
Facultad de Química; UNAM

Dr. Adrián Ochoa Leyva  
Instituto de Biotecnología; UNAM

Ciudad de México. Octubre 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO DE EXAMEN**

**Presidente:** Mata Essayag Rachel

**Vocal:** Gálvez Mariscal Amanda

**Vocal:** Canizales Quinteros Samuel

**Vocal:** Pedraza Chaverri José

**Secretario:** Alcaraz Peraza Luis David

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo la tutoría de la Dra. Nimbe Torres y Torres.

## **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dra. Quirasco Baruch Maricarmen

Dr. Ochoa Leyva Adrián

## **AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS**

A la UNAM, por permitirme realizar un posgrado.

A mi tutora la Dra. Nimbe por dejarme ser parte de su grupo de trabajo y darme un proyecto hermoso.

Al Dr. Tovar por sus consejos en los seminarios.

A la Dra. Lilia, Adri, Viri, el Dr. Ivan, Dr. Omarcito por todos los tips a lo largo de la maestría.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Maricarmen Baruch y el Dr. Adrián Ochoa por esos tutorales enriquecedores.

A los miembros de mi jurado por revisarme la tesis en estos tiempos de pandemia.

A todos los animales del laboratorio que dieron su vida por este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Jehová Dios por permitirme conocer la grandeza de su creación a través de la ciencia.

A mi familia en especial a mis mamas Jerónima y Victoria que siempre me han apoyado en mis sueños y creen en mí.

A mis hermanos Julio y Carolina, mi cuñado Donaldo y mis sobrinitos Julio y Ángel que siempre han estado conmigo. A mis primos Abril, Marcos, Pati, Viri, Yoma, Cali, Ulises, y tíos Raquel, Marcos, Isaac, Maribel, David, Elsa, Sady, Julio, que han estado al pendiente de mis metas y me han alentado a seguir adelante.

A mi padre Daniel que, aunque ya no está con nosotros, su alegría y sus consejos permanecen conmigo todos los días.

A Dogui un ser muy especial para mí.

A mis amigos Flori, Karlita, Mony, Sandy, Ari, Javier, Vilchis, Zuli por todas las experiencias juntos.

A todos mis compañeros del laboratorio, por todos sus consejos.

A Doña Pati y toda su familia por cobijarme como un miembro más.



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>v</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>viii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Origen de la miel. ....	1
1.2 Composición de la miel. ....	4
1.3 Actividades biológicas de la miel. ....	6
1.4 Microbiota intestinal. ....	7
1.5 Composición de la microbiota intestinal. ....	8
1.6 Funciones de la microbiota intestinal.....	10
1.7 Microbiota e inflamación.....	12
<b>II. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
4.1 Objetivo general .....	16
4.2 Objetivos específicos .....	16
<b>V. METODOLOGÍA .....</b>	<b>17</b>
5.1 Reactivos .....	17
5.2 Edulcorantes. ....	17
5.3 Actividad antioxidante .....	17
5.4 Contenido de polifenoles.....	18
5.5 Contenido de flavonoides. ....	18
5.6 Análisis bromatológico. ....	18

5.7 Grados Brix. ....	19
5.8 Actividad antimicrobiana de la miel. ....	19
5.9 Modelo experimental. ....	19
5.10 Determinación ganancia de peso y consumo de alimento. ....	21
5.11 Composición corporal por resonancia magnética nuclear. ....	21
5.12 Curva de tolerancia a la glucosa. ....	21
5.13 Gasto energético por calorimetría indirecta. ....	22
5.14 Parámetros bioquímicos.....	23
5.15 Determinación de insulina, leptina, IgAs y lipopolisacáridos en suero. .....	23
5.16 Análisis del gen 16S ribosomal por secuenciación utilizando la plataforma de Miseq Illumina. ....	23
5.17 Western Blot. ....	24
5.18 Análisis histológico.....	25
5.19 Contenido de ácidos grasos de cadena corta en heces. ....	25
5.20 Análisis estadístico.....	26
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
6.1 Actividad antioxidante, contenido de polifenoles, flavonoides y análisis bromatológico .....	27
6.2 Actividad antimicrobiana de la miel .....	29
6.3 Curva de crecimiento y composición corporal .....	30
6.4 Morfología y tamaño del tejido adiposo. ....	32
6.5 Efecto de las mieles sobre la tolerancia a la glucosa. ....	33
6.6 Parámetros bioquímicos.....	34
6.7 Gasto energético y coeficiente respiratorio.....	35
6.8 Efecto de las mieles sobre las concentraciones de LPS e IgAs.....	37

6.9 Modulación de la microbiota intestinal por los diferentes tratamientos. .....	38
6.10 Efecto de las mieles sobre la abundancia de proteínas involucradas en la inflamación. ....	44
6.11 Ácidos grasos de cadena corta. ....	46
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>55</b>
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elaboración de la miel. ....	1
Figura 2. Transformación de la miel.....	2
Figura 3. Estructura de los principales ácidos fenólicos y flavonoides presentes en la miel.....	6
Figura 4. Localización y organización espacial de la microbiota intestinal .....	9
Figura 5. Cascada de inflamación mediada por lipopolisacáridos.....	14
Figura 6. Diseño experimental. ....	20
Figura 7. Actividad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides en las muestras de estudio. ....	28
Figura 8. Ganancia de peso e ingesta calórica en los diferentes tratamientos. ....	31
Figura 9. Composición corporal en los diferentes tratamientos.....	32
Figura 10. Análisis histomorfológico de los adipocitos.....	33
Figura 11. Curva de tolerancia a la glucosa.....	34
Figura 12. Coeficiente respiratorio .....	36
Figura 13. Volumen de oxígeno.....	37
Figura 14. Concentración de LPS e IgA secretora en suero .....	38
Figura 15. Beta diversidad.....	39
Figura 16. Abundancia relativa de las principales phylas.....	41
Figura 17. Abundancia relativa de los principales géneros.....	42
Figura 18. Abundancia relativa de las principales especies.....	42
Figura 19. Principales especies cambiantes.....	43
Figura 20. Correlación de las principales especies cambiantes y el porcentaje de masa grasa y magra.....	44
Figura 21. Abundancia relativa de proteínas involucrada en la inflamación en íleon.....	45
Figura 22. Correlación entre la abundancia de p-NF- $\kappa$ $\beta$ y la concentración LPS en suero.....	46
Figura 23. Concentraciones de acetato, propionato y butírate en muestras fecales de ratas alimentadas con diferentes mieles.....	47

Figura 24. Resumen integrativo.....	53
-------------------------------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la miel.....	4
Tabla 2. Nombres científicos de las abejas y región de producción de las mieles. ....	17
Tabla 3. Composición de la dieta AIN-93M, según las recomendaciones de la Asociación Americana de Nutrición para roedores. ....	20
Tabla 4. Grados Brix.....	20
Tabla 5. Tipo de sustrato utilizado según la relación $VCO_2/VO_2$ .....	22
Tabla 6. Análisis de la composición de los edulcorantes utilizados, en 100 g de muestra. ....	29
Tabla 7. Efecto de diferentes concentraciones de miel sobre diversas cepas patógenas.....	30
Tabla 8. Parámetros bioquímicos en suero, al final de los tratamientos.....	35
Tabla 9. Alfa diversidad. ....	39

## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Cloruro de aluminio
<b>AIN-93</b>	Dieta AIN-93 del American Institute of Nutrition
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ASB</b>	Albumina sérica bovina
<b>AOAC</b>	Association of Official Agricultural Chemists
<b>C</b>	Control
<b>COX2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>CTG</b>	Curva tolerancia a la glucosa
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogeno
<b>IgAs</b>	Inmunoglobulina A secretora
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>IKK-β</b>	Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta
<b>JMAF</b>	Jarabe de maíz alto en fructosa
<b>JNK</b>	Quinasa c-jun N-terminal
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad Lipopolisacáridos
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>MI</b>	Microbiota intestinal
<b>MML</b>	Miel melipona
<b>MMT</b>	Miel mantequilla
<b>MyD88</b>	Proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88
<b>NF-κβ</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activada
<b>LDL</b>	Lipoproteina de baja densidad

<b>ORAC</b>	Capacidad de absorbanca de los radicales de oxigeno
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PI3K<math>\gamma</math></b>	Fosfoinositol 3-quinasa $\gamma$
<b>PO<sub>2</sub></b>	Presión de oxigeno
<b>RER</b>	Coeficiente de recambio respiratorio
<b>RIPA</b>	Amortiguador de lisis de radioinmunoprecipitación
<b>SAC</b>	Sacarosa
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
<b>TBS</b>	Solución salina amortiguada con Tris con Tween 20 al 0.1%
<b>TG</b>	Tracto gastrointestinal
<b>TLR4</b>	Receptor tipo toll 4
<b>VCO<sub>2</sub></b>	Volumen de dióxido de carbono
<b>VO<sub>2</sub></b>	Volumen de oxigeno

## RESUMEN

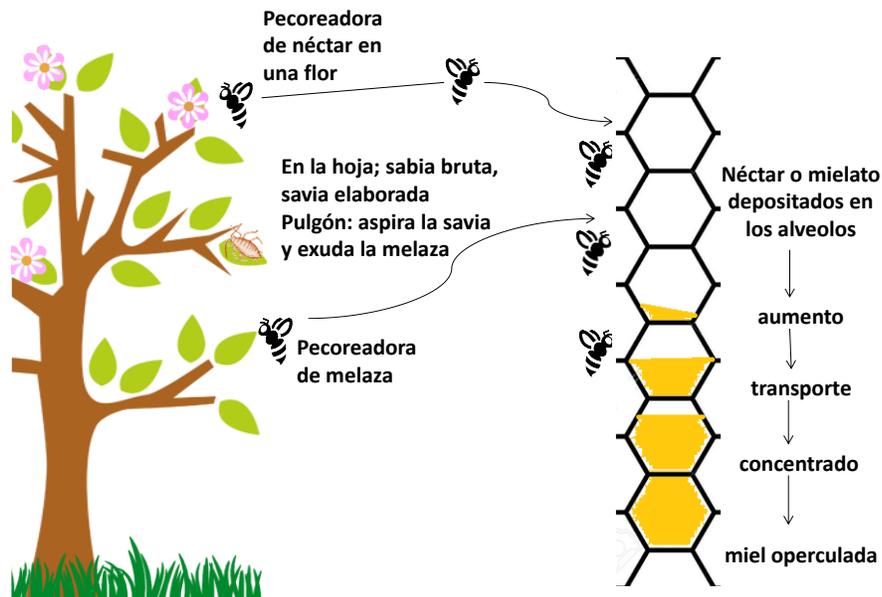
La miel es un líquido viscoso procesado por las abejas compuesta de principalmente de agua y los monosacáridos glucosa y fructosa que en conjunto representan aproximadamente el 80% de su composición. En el presente estudio se demostró que la miel tiene actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria. Se alimentaron ratas con diferentes tipos de mieles por un periodo de 18 semanas. Se evaluó el peso corporal, la composición corporal, ingesta calórica, parámetros bioquímicos, niveles de IgA secretora (IgAs), lipopolisacáridos (LPS), ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y proteínas involucradas en la inflamación. Los resultados mostraron que los grupos alimentados con mieles ganaron menos masa grasa y perdieron menos masa magra con respecto al control, sin embargo, mantuvieron una curva de tolerancia a la glucosa similar al control y los niveles de leptina e insulina fueron significativamente menores con respecto a la sacarosa. Las mieles también disminuyeron los niveles de LPS y aumentaron las concentraciones de IgAs. La abundancia del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), p-NF- $\kappa$ B y el receptor 4 tipo Toll (TLR4) fueron menores en los grupos de mieles comparados con la sacarosa o jarabe de maíz. Con respecto al análisis de la microbiota intestinal, dos especies de bacteria, parecen ser las posibles causantes de las modificaciones en los tratamientos de mieles con respecto a los demás grupos *Defluviitalea saccharophila* bacteria gram-positiva perteneciente al pylum Firmicutes que esta aumentada en mieles y presenta una correlación inversa con la masa grasa y *Alistipes masilenses* especie gram-negativa, miembro del pylum Bacteroidetes la cual esta aumentada en los grupos de sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa y se correlaciona con el aumento de masa grasa. Los resultados del presente trabajo muestran que el consumo de miel es capaz de modificar la microbiota aumentando la respuesta inmunológica a través de un aumento en la IgAs y de esta manera disminuyendo las concentraciones de LPS y por lo tanto la endotoxemia metabólica.



# I. INTRODUCCIÓN

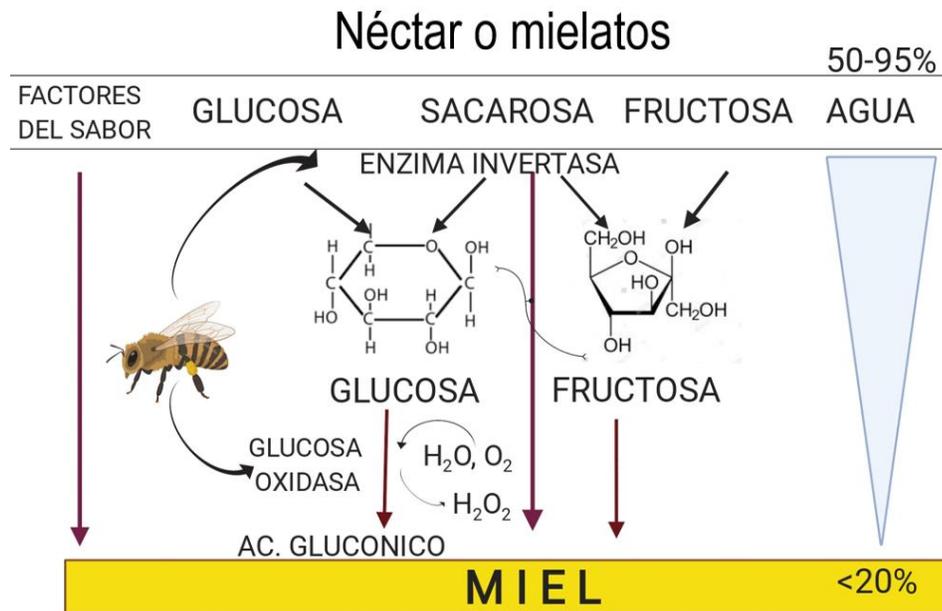
## 1.1 Origen de la miel.

La miel es uno de los edulcorantes naturales que más se consumen en todo el mundo. Es un producto derivado de la transformación del néctar y mielatos por medio de las abejas (Kumul et al., 2015). El proceso de transformación de la miel consta de cuatro pasos principales: recolección de la materia prima, deposición en los alveolos hexagonales del panal, concentrado y protección con opérculo de cera (**Figura 1**). La materia prima utilizada por las abejas consiste en néctar de flores compuesto de agua y azúcares o los mielatos que son excreciones azucaradas de insectos succionadores que se alimentan de la savia de las plantas tales como pulgones, cochinillas y otros himenópteros. La materia prima recolectada, es transportada en el estómago, donde las abejas adicionan enzimas necesarias para la transformación de los azúcares, tales como glucosidasas, diastasas e invertasas, estas últimas encargadas de la conversión de la sacarosa en los monosáridos glucosa y fructosa (**Figura 2**).



**Figura 1. Elaboración de la miel.** La elaboración de la miel se da en cuatro pasos principales: la recolección de la materia prima, depósito en los alveolos hexagonales, concentrado y protección con opérculo de cera. Modificada de Jean-Prost & Médori (2007).

Durante el procesamiento de la materia prima a miel, los azúcares se concentran, mientras que otros componentes de la miel, principalmente el agua, se eliminan del néctar. La evaporación del agua se lleva a cabo mediante manipulaciones que aumentan su área de superficie, así como por el mantenimiento de una corriente de aire caliente a través de la colmena (Crane & Kirk Visscher, 2009) (**Figura 2**). Este proceso permite reducir el agua a porcentajes cercanos al 20% de la composición de la miel que es un factor clave para que las abejas posteriormente sellen las celdas del panal con opérculos de cera. La composición final de la miel es diversa y depende de factores como el origen botánico ya sea de néctares de flores o de mielatos, la región geográfica, así como de factores externos a las abejas como la manipulación por parte del hombre o las condiciones de almacenamiento (Czipa et al., 2008; Escuredo et al., 2014).



**Figura 2. Transformación de la miel.** La miel es una sustancia producida a partir del néctar o mielatos al eliminar la mayoría del agua, convirtiendo Sacarosa en fructosa y glucosa a través de la acción de la enzima invertasa. La acción de la glucosa oxidasa permite la conversión de la glucosa en ácido glucónico que tiene como subproducto el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), importante para la acción antimicrobiana de la miel. Modificada de Crane & Kirk Visscher (2009).

La miel es un producto que se ha usado desde épocas antiguas; se estima que el hombre empezó a utilizarla hace 10,000 años, dato que se corrobora con el descubrimiento de la pintura rupestre encontrada en la Cueva de la Araña, ubicada en Valencia, España, donde se observa a un hombre recolectando miel. En tiempos antiguos la miel era utilizada por los egipcios como edulcorante y en procesos funerarios, principalmente para el embalsamamiento de los muertos y ofrendas religiosas. Los romanos utilizaron el líquido viscoso como tratamiento de enfermedades estomacales, para tratar heridas con pus y hemorroides, así como moneda de cambio y conservador de alimentos. En la civilización Griega fue considerada alimento de los dioses del Olimpo, mientras que la cultura China encontró en la miel un objetivo cosmético (Nayik et al., 2014).

En México el uso de la miel data de épocas prehispánicas, culturas mesoamericanas como la Azteca, Olmeca y Maya ya utilizaban la miel y habían desarrollado técnicas para la crianza de las abejas. Evidencia del códice de Mendocino demuestran que la miel era dada como tributo al emperador Moctezuma, estaba presente en rituales religiosos y se utilizó como edulcorante de bebidas tradicionales (Crane, 1986). Los Mayas tenían un amplio conocimiento sobre el cultivo de abejas del género *Melipona* que tienen como característica principal no tener aguijón. La miel de estas abejas sirvió para la preparación de bebidas como el *balché* y *xtabentún* que tenían papeles ceremoniales.

Actualmente México ocupa un lugar importante en la producción mundial de miel; según reportes de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México exporta cerca de 26 mil toneladas de miel al año teniendo como principales compradores países como Inglaterra, Alemania y Estados Unidos que genera ingresos anuales en promedio de 32.4 millones de dólares (Soto-Muciño et al., 2017). SAGARPA, indica que en México existen cinco regiones apícolas que varían en condiciones como el clima y suelos entre las que se incluyen la región Norte,

Pacífico, Oriente, Centro, Golfo y Península, siendo esta última la de mayor producción nacional.

## 1.2 Composición de la miel.

La composición de la miel puede depender de factores como el clima, las especies florales de las que se extrajo la materia prima, la naturaleza del suelo, el género de las abejas, así como el estado fisiológico de las abejas (Soto-Muciño et al., 2017). Sin embargo, la miel es en general una solución sobresaturada de azúcares más agua (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Composición química de la miel.** Tomado de Álvarez-Suárez (2017).

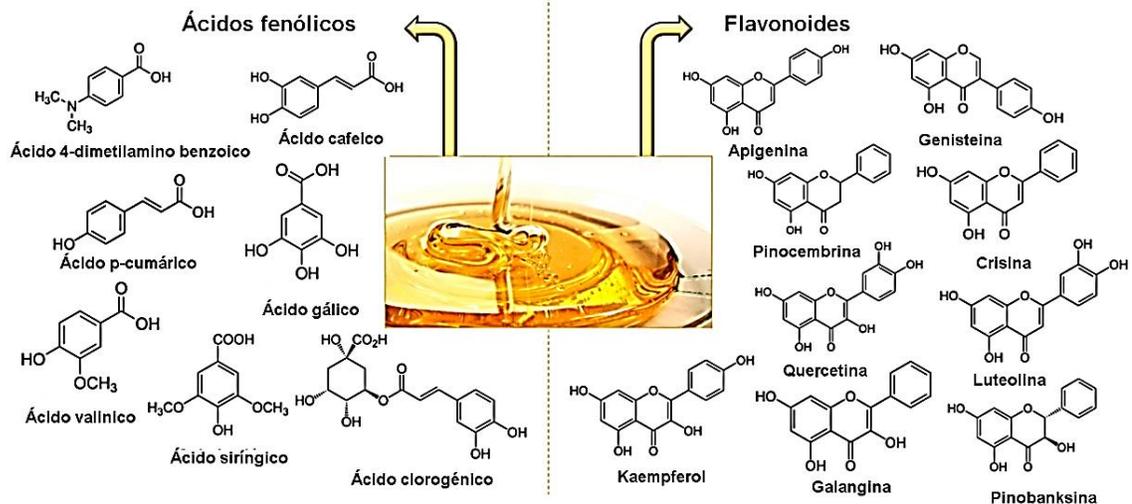
	Media	SD	Rango
<b>Constituyentes mayoritarios (%)</b>			
Agua	17.90	3.16	13.21-26.50
Fructosa	39.44	2.11	37.07-42.65
Glucosa	28.15	5.74	18.20-32.10
Sacarosa	3.19	3.81	0.36-16.57
Otros azúcares	8.5	-	0.1-16.0
<b>Constituyentes minoritarios (%)</b>			
Minerales	0.36	0.18	0.11-0.72
Proteína total	1.13	1.22	0.22-2.93
Ácidos (como ácido glucónico)			0.17-1.17
Vitaminas, enzimas, aroma	<0.1		
Compuestos fenólicos	0.1		0.02-0.2

Como se observa en la **Tabla 1**, la miel tiene una composición de 70-80% carbohidratos, cuyos principales componentes son los monosacáridos glucosa (28%) y fructosa (39%). Además de los monosacáridos, contiene disacáridos como sacarosa, maltosa, isomaltosa, turanosa y gentiobiosa y trisacáridos maltotriosa, erlosa, isomaltotriosa, y kestosa. El porcentaje de glucosa y fructosa puede afectar el proceso de cristalización de la miel; se ha demostrado que mieles con una proporción mayor de fructosa son líquidas, mientras que mieles con una mayor proporción de glucosa son sólidas, esto se debe a que la glucosa pierde agua convirtiéndose en monohidrato de

glucosa por lo que cristaliza (Assil et al., 1991). La velocidad con la que puede ocurrir este proceso depende del origen de la miel, así como el método por el que se procesa y maneja (White, 1978). Después de los azúcares el agua es el segundo compuesto mayoritario en las mieles y su presencia es un parámetro importante para determinar la calidad de la miel, debido a que la cantidad de agua presente en la miel determina su estabilidad frente a la fermentación (Singh & Singh, 2018).

El contenido de proteínas en la miel es de aproximadamente 0.4%. La prolina es el aminoácido más abundante, seguido de la lisina, ácido glutámico y ácido aspártico (Davies, 1975; Davies & Harris, 1982). Las enzimas también están presentes en la miel; tanto los néctares, los fluidos salivales y las secreciones de las glándulas faríngeas de las abejas añaden a la miel enzimas que tiene funciones, tal como la invertasas ( $\alpha$ -glucosidasa, sacarasa) que se encuentran en el tracto gastrointestinal de las abejas y su incorporación a las mieles es responsable de desdoblar sacarosa en glucosa, la enzima glucosa oxidasa que con acción de agua produce peróxido de hidrógeno un componente esencial para la actividad antimicrobiana de la miel y la amilasa una enzima encargada de la descomposición del almidón (Bankar et al., 2009).

Las vitaminas y minerales son componentes minoritarios en la miel. El ácido ascórbico y vitaminas del complejo B como tiamina, riboflavina y niacina son vitaminas presentes con mucha frecuencia. El contenido mineral puede variar entre 0.02 a 1%, siendo el potasio el más abundante el cual excede 10 veces el contenido de sodio calcio y magnesio (Kumul et al., 2015). Los ácidos fenólicos son otros compuestos minoritarios presentes en la miel, siendo los más comunes de encontrar ácido cafeico, clorogénico, cumárico, gálico, y flavonoides como apigenina, crisina, galangina, kaempferol, luteolina y quercetina; sustancias que han sido reconocidas como las principales responsables de la actividad antioxidante de las mieles (Cianciosi et al., 2018) **(Figura 3)**.



**Figura 3. Estructura de los principales ácidos fenólicos y flavonoides presentes en la miel.** Obtenido Cianciosi et al. (2018).

### 1.3 Actividades biológicas de la miel.

Desde la antigüedad a la miel se le han atribuido diversos efectos nutricionales y biológicos. Los egipcios, griegos y romanos utilizaban la miel como edulcorante, ingrediente de bebidas fermentadas, tratamiento de la calvicie, cicatrizante de heridas, para enfermedades del intestino así como para mantener sanos los dientes y las encías (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Sin embargo, una de las propiedades más importantes atribuidas a la miel es la actividad antimicrobiana la cual es imputada principalmente a que es una solución sobresaturada de azúcares, característica que impide el crecimiento microbiano debido al efecto osmótico producido entre las moléculas de agua y azúcar que dejan muy poca agua para el crecimiento de microorganismos, presenta un pH ácido (3.2 y 4.5), contiene peróxido de hidrógeno que es producido por la acción de la enzima glucosa oxidasa y fitoquímicos que poseen actividad antimicrobiana (Ahmed et al., 2003).

Se estima que las mieles tienen efecto antimicrobiano en más de 60 especies bacterianas entre las que se incluyen Gram-positivas y Gram-negativas. Se ha descrito su efecto bactericida sobre géneros como *Salmonella* (Alnaqdy et al., 2005), *Shigella* (Al-Waili, 2004), y algunas bacterias enteropatógenas como

*Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (Wilkinson & Cavanagh, 2005). Además de la propiedad bactericida, a la miel se le han atribuido propiedades antioxidantes, antifúngicas y antiinflamatorias estas últimas ya han sido comprobadas tanto en modelos animales, cultivos celulares y ensayos clínicos (Almasaudi et al., 2016; Alzahrani et al., 2012; Beretta et al., 2007; Hussein et al., 2013; Moussa et al., 2012). Las propiedades antiinflamatorias de la miel se deben principalmente a su contenido fenólico y flavonoides que disminuyen la acción de actividades proinflamatorias de la ciclooxigenasa-2 (COX2) mediante la atenuación de la translocación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) al núcleo (Al-waili, 2004). Además se ha comprobado que la miel estimula el aumento de linfocitos T y B, así como también se ha confirmado su participación en la regulación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Ahmed et al., 2018).

#### **1.4 Microbiota intestinal.**

El tracto gastrointestinal (TG) representa una de las interfaces más grandes entre el huésped, los factores ambientales y los antígenos. Está conformado por órganos y cavidades, lugares en los que habitan una alta diversidad de microorganismos que varían según los diferentes microambientes y de las funciones que tienen en el huésped.

Las funciones del TG son diversas, entre las que destacan su participación en la nutrición y como defensa contra patógenos extraños debido a que posee estructuras como sensores, receptores y glándulas que permiten la recepción de los estímulos (Guarner, 2007); sin embargo, en la actualidad se ha informado que tales funciones son dependientes del conjunto de microorganismos que habitan estos nichos, siendo un complejo ecosistema microbiano, estrechamente relacionado con la salud del huésped.

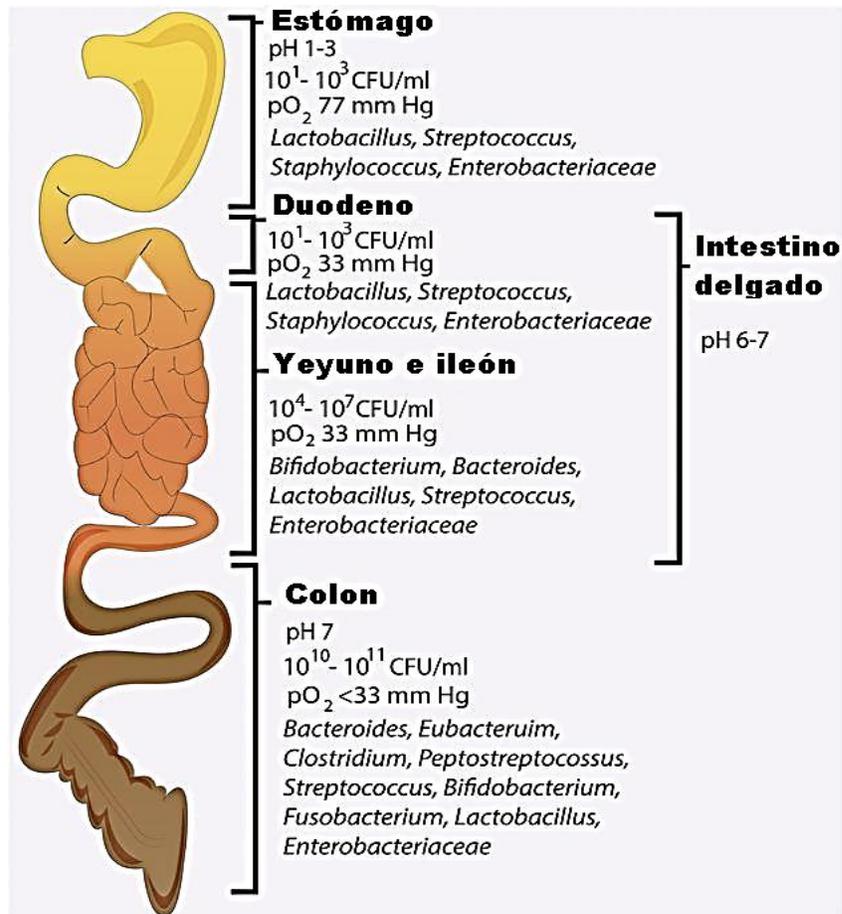
El TG humano tiene un área aproximada de 400 m<sup>2</sup>, y es el órgano con mayor densidad de comunidades microbianas (D'argenio, 2018). Se estima la presencia de aproximadamente 10<sup>14</sup> microorganismos, principalmente bacterias que representan cerca del 90% de la comunidad presente. A este

conjunto de microorganismos se le conoce como microbiota intestinal (MI) y mantiene con el huésped una relación compleja y mutuamente beneficiosa (Guarner, 2007). Estas comunidades están involucradas en procesos biológicos básicos requeridos para en el estado saludable del huésped, por lo que una desregulación de la abundancia de microorganismos puede llevar al desarrollo y la progresión de múltiples enfermedades (Wang et al., 2017).

### **1.5 Composición de la microbiota intestinal.**

Existe una amplia variedad de microorganismos en el TG, que varían debido a factores como la localización anatómica del intestino, la edad, el consumo de antibióticos y la dieta. Se ha demostrado que la concentración bacteriana y el tipo de bacterias cambian drásticamente y va aumentando de manera descendente en el tubo digestivo, siendo el colon el que más microorganismos posee (**Figura 4**), esto debido a factores como el pH (Duncan et al., 2009) y el oxígeno, ya que se ha demostrado que la mayoría de las bacterias encontradas en el colon no pueden crecer a unidades mayores de  $5 \times 10^{-3}$  atmósferas de oxígeno (Flint et al., 2012). Otros factores que puede afectar la abundancia de microorganismos son las enzimas secretadas y la disponibilidad de los nutrientes (Moszal et al., 2020).

La colonización de microorganismos de la MI se da inicialmente en el líquido amniótico del útero, la placenta, la sangre del cordón umbilical y en las membranas fetales (Aagaard et al., 2016; Collado et al., 2016; Joon Oh et al., 2011), sin embargo el modo de nacimiento es otro factor que puede modificar la MI. La vagina es una región rica en *Lactobacillus*. la cual domina e inhibe el crecimiento de bacterias patógenas debido a que genera un ambiente ácido y compite por nutrientes (Huang et al., 2014); por lo anterior, los bebés que nacen por vía vaginal tienen un predominio de estas bacterias. Los nacidos por cesárea tienen un predominio de bacterias como *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* que son derivadas del ambiente hospitalario y la piel de la madre (Domínguez-Bello et al., 2010).



**Figura 4. Localización y organización espacial de la microbiota intestinal.** Modificado de Clarke et al. (2019). La densidad más grande de bacterias se encuentra en el intestino grueso ( $10^{11}$  células bacterianas), seguido del yeyuno e íleon ( $10^7$  células bacterianas), duodeno ( $10^3$  células bacterianas) y el estómago ( $10^3$  células bacterianas), abundancias relacionadas con el pH y la presión de oxígeno ( $PO_2$ ).

El consumo de antibióticos es otro factor que puede variar la composición de la MI ya que disminuye la diversidad microbiana y reduce la microbiota filogenética (Panda et al., 2014), debido a que algunos antibióticos pueden aumentar la posibilidad de colonización de ciertos tipos de bacterias (Schubert et al., 2015), este efecto puede ser influenciado por el espectro de actividad, la formulación, vía de administración y la duración de la administración. La MI no es constante durante la vida, sino que cambia por factores como la edad, sin embargo un factor particularmente importante que modifica la composición de la MI es la dieta, la cual se cree explica más del 50% de estas variaciones estructurales microbianas en ratones (Leeming et al., 2019). La alimentación

en cada individuo es variable, es el resultado de una mezcla de macro y micronutrientes que tienen efecto sobre la MI, después del primer día de consumo (Turnbaugh et al., 2009) y estas alteraciones transitorias ocurren independientemente del peso corporal y la adiposidad del huésped (Gentile & Weir, 2018). Los macronutrientes como los carbohidratos modifican la MI. Se ha demostrado que carbohidratos como la sacarosa y la fructosa de manera simple y en conjunto con una dieta alta en grasa, causan una rápida desregulación de la MI y una disfunción metabólica en el huésped. Una dieta rica en grasas o alta en grasas y azúcares se asocia con la disminución en la abundancia de Bacteroidetes y un aumento en Firmicutes y Proteobacterias de una manera dependiente de la dosis, independientemente del genotipo estudiado (rata o ratón) y provocan una disminución de la diversidad bacteriana (Hildebrandt et al., 2009; Zmora et al., 2019). Además de los macronutrientes principales, carbohidratos, lípidos y proteínas, la composición de MI puede verse influenciada por el contenido de sustancias bioactivas como los polifenoles en la dieta. Los polifenoles están presentes principalmente en las frutas y verduras que son comunes a las dietas cotidianas, alimentos que se han asociado a una mayor alfa diversidad microbiana que se cree proporciona mayor variedad de sustratos para la proliferación de numerosos taxones (Heiman & Greenway, 2016; Leeming et al., 2019; McDonald et al., 2018). Ya se ha descrito la acción de estos compuestos bioactivos como los polifenoles sobre la MI. Se ha demostrado su efecto beneficioso al aumentar la abundancia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y elevar la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la reducción en las bacterias patógenas *Clostridium perfringens* y *Clostridium histolyticum* (Moszal et al., 2020).

### **1.6 Funciones de la microbiota intestinal.**

La MI mantiene una relación simbiótica con la mucosa intestinal (Jandhyala et al., 2015) y desempeña papeles importantes en el funcionamiento del huésped; incluyendo funciones fisiológicas, metabólicas e inmunológicas

como la digestión de los alimentos, generación de energía, diferenciación y maduración de la mucosa del huésped y su sistema inmune. La MI participa en la modulación de la patogénesis, progresión y el tratamiento de diversas enfermedades que van desde trastornos metabólicos y enfermedades neurológicas (Kolodziejczyk et al., 2019). La disbiosis o desequilibrio en la MI está altamente correlacionada con afecciones como obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del intestino, cáncer colorrectal y el crecimiento anormal en diversos órganos (Icaza-Chávez, 2013). En general los estudios de colonización intestinal controlada han logrado identificar tres funciones principales de la MI: funciones metabólicas, funciones de protección y funciones tróficas. La función metabólica involucra la participación en la obtención de energía, síntesis de vitaminas y algunos aminoácidos. La MI ayuda a la fermentación de hidratos de carbono no digeribles que tiene como productos AGCC que pueden ser absorbidos por el anfitrión. Los AGCC más abundantes son acetato, propionato y butirato que tienen efectos locales en el intestino y en los tejidos espláncnicos y periféricos, que en conjunto parecen inducir una mejor regulación metabólica (Chambers et al., 2018). El butirato forma la fuente de energía clave para los colonocitos humanos, el propionato es una fuente de energía para las células epiteliales y participa en rutas metabólicas como la gluconeogénesis en la que hay una conversión del propionato en glucosa, y el acetato es un metabolito que puede actuar como cofactor esencial para el crecimiento de bacterias, tiene participación en el metabolismo del colesterol y en la regulación del apetito central (Frost et al., 2014; Rowland et al., 2018). En general se puede mencionar que la mayor función en el metabolismo de los AGCC es su papel en el mantenimiento de la barrera epitelial para mantener la integridad intestinal y evitar la translocación de moléculas bacterianas proinflamatorias a través de la pared intestinal (Chambers et al., 2018).

La MI además de los AGCC produce otros metabolitos a partir de componentes de la dieta, entre ellos se incluyen indol y poliaminas que pueden tener propiedades inmunológicas (Postler & Ghosh, 2017). En lo que respecta

a la síntesis de vitaminas, las bacterias de la MI son las encargadas de la producción de la vitamina C, K, B12, niacina, ácido pantoténico y ácido fólico que son cofactores para enzimas del metabolismo de grasas y carbohidratos (Steinert et al., 2020). Por otro lado, la MI ejerce efectos tróficos sobre el epitelio intestinal, el cual es responsable de la absorción de nutrientes y agua, debido a que favorece el desarrollo de microvellosidades intestinales, además se ha descrito que desempeña un papel fundamental en la maduración del sistema inmune innato y adaptativo del huésped (Montalto et al., 2009). En estudios en animales libres de gérmenes se ha evidenciado que la MI tiene un papel importante en la promoción de la estructura y función del intestino, ejemplo de ello son ratones libres de gérmenes colonizados con *Bacteroides theiotaomicron* que mostraron que esta bacteria modula la expresión de genes involucrados en varias funciones intestinales importantes, incluida la absorción de nutrientes, la fortificación de la barrera mucosa y la maduración intestinal posnatal (Hooper et al., 2001).

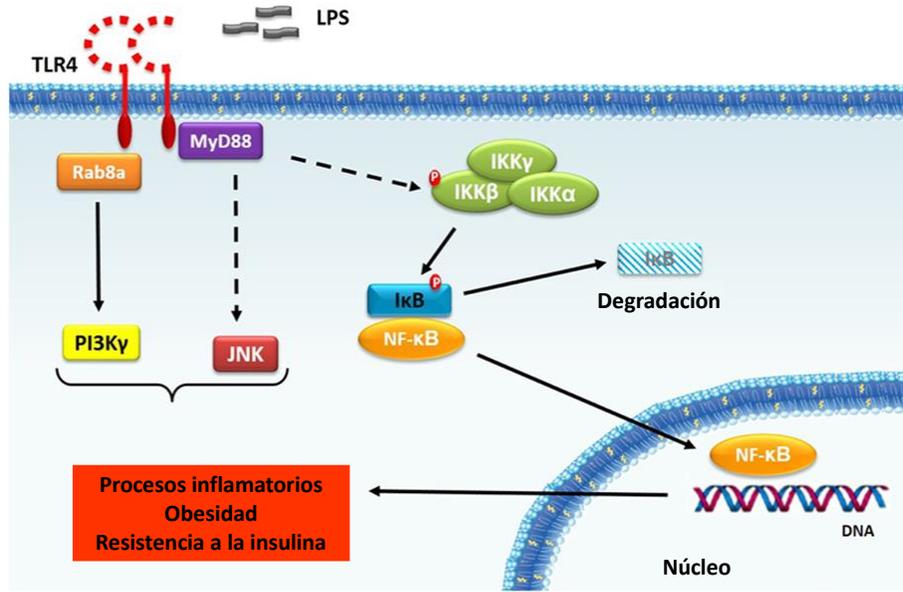
Finalmente, las funciones de protección atribuidas a la MI, son las que se deben a la secreción de bacteriocinas por las bacterias, que inhiben la proliferación de otras bacterias; compiten por nutrientes y participan en la estimulación de la producción de citocinas que resultan en una función protectora. Se ha demostrado que las bacterias Gram-negativas como *Bacteroides*, activan las células dendríticas intestinales, lo que induce a las células plasmáticas en la mucosa intestinal a expresar Inmunoglobulina A secretora (IgAs), que participa como defensa para la protección del epitelio intestinal de toxinas entéricas y microorganismos patógenos (Jandhyala et al., 2015).

### **1.7 Microbiota e inflamación**

La MI participa en la respuesta inmunológica. Los cambios en la dieta pueden alterar el tipo de metabolitos producidos por las bacterias (Cannon, 1921), que sirven como señales que contribuyen a un adecuado funcionamiento de la barrera epitelial y las células inmunitarias. Estos metabolitos pueden ser

producidos por bacterias directamente a partir de componentes dietéticos, metabolitos producidos por el huésped y modificados bioquímicamente por bacterias intestinales y los metabolitos que son sintetizados *de novo* por los microbios intestinales (Postler & Ghosh, 2017). Cuando se produce un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal (disbiosis) al igual que los metabolitos producidos o procesados por ella, hay una alteración del sistema inmune del huésped, lo que conlleva a un estado de enfermedad (Lobionda et al., 2019; Shen et al., 2018; Zhang et al., 2015).

En la actualidad, debido a cambios en los patrones de alimentación tradicionales, se ha incrementado la ingesta de alimentos con un alto contenido energético, endulzados principalmente de azúcares como jarabe de maíz alto en fructosa y sacarosa los cuales, se postula, promueven menos saciedad que otros alimentos y pueden inducir una desregulación metabólica e inflamación en el intestino debido a alteraciones en la microbiota intestinal (Do et al., 2018). La inflamación es un proceso que está controlado por el sistema inmune, endócrino y nervioso (Cavalcante-Silva et al., 2015). Los lipopolisacáridos (LPS) son endotoxinas bacterianas que inducen la inflamación a través de una cascada de respuestas inflamatorias tras el reconocimiento del lípido A del LPS por las células inmunes (Salguero et al., 2019) y pueden promover la expresión de receptores tipo toll 4 (TLR4), que se han asociado con un aumento en la expresión de la proteína de *respuesta primaria* a la diferenciación *mieloide 88* (MyD88) y la actividad de NF- $\kappa$ B que cumple una función clave en la señalización para producción de citocinas proinflamatorias (**Figura 5**) que, a su vez, se han asociado con la progresión de la resistencia a la insulina, obesidad y otros procesos inflamatorios.



**Figura 5. Cascada de inflamación mediada por lipopolisacáridos.** El estímulo por lipopolisacáridos (LPS) activa al receptor tipo toll 4 (TLR4) que conduce a la transducción de señales, que implica la vía clásica IKK- $\beta$  – NF- $\kappa$ B. Después de la estimulación, la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) se puede mediar la señalización aguas abajo, incluida la fosforilación del inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta (IKK- $\beta$ ). Una vez activado, IKK- $\beta$  fosforila la proteína I $\kappa$ B, que a su vez libera el complejo NF- $\kappa$ B. Además de esta vía, la señalización TLR4 también da como resultado la activación de fosoinositol 3-quinasa  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) y las quinasas c-Jun N-terminal (JNK), que en conjunto juegan un papel fundamental en la relación de inflamación, obesidad y resistencia a la insulina. Modificado de Cavalcate-Silva et al. (2015).

La miel es un alimento alto en carbohidratos sin embargo tiene muy bajas concentraciones de sacarosa y posee características que le confieren actividad antiinflamatoria entre los que se incluyen el alto contenido de compuestos fenólicos los cuales actúan suprimiendo las actividades proinflamatorias de la COX-2 y/o la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el contenido de polifenoles además le confieren actividades antimicrobianas característica que podrían modular la microbiota ejerciendo un papel protector, por lo que es interesante estudiar el efecto de mieles sobre la MI.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

El uso de las mieles como edulcorantes se ha reducido debido a la introducción de nuevas fuentes, principalmente azúcares refinados.

En la actualidad no existen estudios del efecto que tiene el consumo de mieles sobre la microbiota intestinal, por lo que este estudio tiene la finalidad de conocer las propiedades de mieles mexicanas y evaluar su efecto en la microbiota intestinal y los marcadores de inflamación.

## **III. HIPÓTESIS**

El consumo de mieles tendrá un efecto benéfico en la composición de la microbiota intestinal que repercutirá en la disminución de los marcadores moleculares asociados a inflamación debido al consumo de dietas ricas en azúcares.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes mieles naturales sobre la microbiota intestinal y marcadores de inflamación en un modelo de ratas Wistar.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides de las mieles.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de la miel en diversas cepas patógenas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *E. coli*)
3. Evaluar el efecto de las mieles sobre la ingesta de alimento y ganancia de peso en un modelo animal.
4. Evaluar el efecto de las mieles sobre la composición corporal.
5. Determinar en un modelo animal el efecto de las mieles sobre la concentración de los parámetros bioquímicos glucosa, insulina, leptina, triglicéridos y colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (LDL).
6. Evaluar los niveles de leptina, LPS e IgA secretora en suero de ratas alimentadas con diferentes mieles.
7. Determinar el gasto energético y el coeficiente respiratorio de los animales alimentados con diferentes tipos de mieles.
8. Determinar la abundancia de a nivel de phylum, género y especie de bacterias del microbiota intestinal después del tratamiento con diferentes tipos de mieles.
9. Determinar la expresión marcadores de inflamación en animales alimentados con diferentes tipos de mieles en íleon.
10. Determinar el efecto de las mieles sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta en heces.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Reactivos

Los reactivos 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH), ácido gálico, carbonato de sodio y cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ), quercetina, albúmina de suero bovino (ASB) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). El reactivo Folin-Ciocalteu y las membranas de polivinilideno se adquirieron de Merck Millipore (Burlington, MA, EUA). Los anticuerpos contra TLR4 (SC-293072), NF- $\kappa$ B (SC-372), actina (sc-1615) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, EUA). El anticuerpo p-NF- $\kappa$ B (ab86299) se adquirió de Abcam (Cambridge, MA, EUA).

### 5.2 Edulcorantes.

Se adquirieron sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa comerciales. Las muestras de mieles naturales fueron obtenidas de diferentes regiones de México, las cuales se presentan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Nombres científicos de las abejas y región de producción de las mieles.**

	Especie	Estado
Miel Mantequilla (M-Mtq)	<i>Apis mellifera</i>	Estado de México
Miel Melipona (M-Mel)	<i>Melipona beecheii</i>	Yucatán

### 5.3 Actividad antioxidante

Se determinó usando el método de Capacidad de Absorbancia de Radicales Libres de Oxígeno (ORAC), que se evaluó en el espectrofluorómetro Biotek Synergy HT (Biotek, Winooski, VA, EUA). Para ello, se colocó 1 g de miel en 10 mL de agua desionizada. Se adicionaron 25  $\mu$ L de la muestra diluida de mieles a la mezcla de reacción, la cual contenía 150  $\mu$ l de fluoresceína (40 nM) y 25  $\mu$ l de AAPH (150 mM), se leyó la cinética durante 90 min en el

espectrofluorómetro a longitudes de excitación 485 nm y de emisión de 520 nm. Los datos se expresaron como equivalentes trolox /g de miel.

#### **5.4 Contenido de polifenoles.**

Para ello, se utilizó una solución de reactivo Folin-Ciocalteu 1 N, carbonato de sodio 8% m/v y ácido gálico a 200 ppm para construir la curva de calibración en un rango de concentración de 0.5 a 200 ppm. Se colocaron de manera independiente 50 µl de cada las diluciones de las mieles, 50 µl del reactivo Folin-Ciocalteu y 100 µl de carbonato de sodio al 8%. Se incubó la mezcla durante 60 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 760 nm. Los datos se expresaron como mg de ácido gálico/g de miel.

#### **5.5 Contenido de flavonoides.**

Para la cuantificación de flavonoides se utilizó una curva de calibración de quercetina en un rango de 0.4 a 25 ppm. Las muestras de miel se diluyeron en agua para tener concentraciones de 1 g/ml, se colocaron 100 µl de la sustancia prueba o estándares y 100 µl de una solución etanólica de  $\text{AlCl}_3$  al 2%, posteriormente se incubó en obscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó a 490 nm. Los resultados se presentaron como mg quercetina/g de muestra (Kumazawa et al., 2004).

#### **5.6 Análisis bromatológico.**

La determinación de humedad, cenizas, grasa, proteína, fibra dietética, carbohidratos digeribles y contenido energético de las mieles utilizadas se determinó a partir de los métodos de la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (Association of Official Agricultural Chemists por sus siglas en inglés o AOAC) en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### 5.7 Grados Brix.

Los grados Brix se determinaron de acuerdo a la metodología descrita en la NMX-103-NORMEX-2009 "Determinación de grados Brix en alimentos y bebidas" en el departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

### 5.8 Actividad antimicrobiana de la miel.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las mieles, se utilizó *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *E. coli* obtenidas del laboratorio de Infectología del INCMNSZ. Las muestras de miel se disolvieron en medio Mueller-Hinton a diferentes porcentajes (10%, 20% y 50%). Se colocaron en cada una de las placas 100 µl de muestra de cada una de las cepas bacterianas a 0.5 de McFarland. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se procedió a realizar el conteo. La actividad antibacteriana se expresó como el número de unidades formadoras de colonia en porcentaje (%) de miel. Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

### 5.9 Modelo experimental.

Se utilizaron ratas Wistar macho proporcionadas por el bioterio del INCMNSZ. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22±2°C), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad, en cajas individuales. Para la realización del experimento, las ratas se dividieron aleatoriamente en cinco grupos alimentados con dieta control de mantenimiento basada en las recomendaciones del Instituto Americano de la Nutrición (Reeves et al., 1993) (**Tabla 3**) y 10 grados Brix (sólidos disueltos en un líquido) de sacarosa (S), jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), miel mantequilla (M-Mtq), y miel Melipona (M-Mel), disueltos en la bebida, con el fin de obtener el mismo contenido de azúcares comparados con la sacarosa que ya se ha reportado puede repercutir negativamente en la salud (Rosas-Villegas et al., 2017). Los tratamientos se compararon con el grupo control (C) que

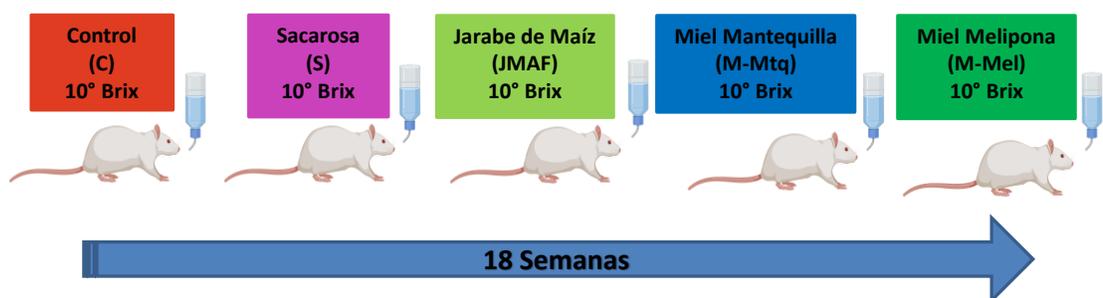
consumió, agua en la bebida durante todo el desarrollo experimental de 18 semanas (**Figura 6**).

**Tabla 3. Composición de la dieta AIN-93M, según las recomendaciones de la Asociación Americana de Nutrición para roedores.**

Ingredientes	g/Kg
Caseína	140
L-Cistina	1.8
Almidón	465.692
Maltodextrina	155
Sacarosa	100
Aceite de Soya	40
Celulosa	50
Mezcla de Minerales	35
Mezcla de Vitaminas	10
Colina	2.5
TBHQ	0.013

**Tabla 4. Grados Brix.** Grados Brix y gramos utilizados en cada una de las muestras por L de líquido.

	S	JMAF	M-Mtq	M-Mel
Grados Brix	100	75	85	75
Gramos utilizados para completar 10 Brix	100g/L	125g/L	115g/L	125 g/L



**Figura 6. Diseño experimental.**

### **5.10 Determinación ganancia de peso y consumo de alimento.**

Se llevó un registro del crecimiento de las ratas a través de la ganancia de peso y consumo de alimento para obtener un promedio de cambio de peso y la ingesta calórica promedio. Para determinar la ingesta se midió el consumo de alimento y volumen de agua. Los datos se reajustaron a calorías considerando que un gramo de carbohidratos proporciona 4 Kcal, la proteína 4 Kcal y los lípidos 9 Kcal.

### **5.11 Composición corporal por resonancia magnética nuclear.**

La composición corporal de las ratas se evaluó en intervalos de 15 días utilizando un equipo de resonancia magnética (EchoMRI, Echo Medical Systems, Houston, TX, EUA). Los animales se colocaron en un tubo de acceso adecuado de la rata sin ocasionarle ninguna molestia, el cual se introduce al equipo de resonancia magnética nuclear. El equipo emite una radiofrecuencia a cierta longitud y el software del equipo registra el espectro de cada rata por 47 segundos. Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje (%) masa magra, y porcentaje (%) masa grasa, calculados con respecto al peso total del animal.

### **5.12 Curva de tolerancia a la glucosa.**

La curva de tolerancia a la glucosa fue realizada a las ratas en el estudio después de un ayuno de 10 horas. El procedimiento consistió realizar una punción en la cola para obtener sangre y medir la glucosa basal (tiempo 0) con ayuda del glucómetro FreeStyle Optium. Posteriormente se administró una dosis de 2 g/kg de glucosa vía intraperitoneal, y se midieron las concentraciones de glucosa sanguínea a partir de sangre obtenida a través de una punción en la cola, en los minutos 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Los resultados obtenidos se graficaron para obtener el área bajo la curva de cada tratamiento.

### 5.13 Gasto energético por calorimetría indirecta.

Para determinar el consumo de oxígeno y coeficiente respiratorio, se procedió a la realización de una calorimetría indirecta, a través de un sistema de monitoreo de animales de Laboratorio Oxymax (CLAMS, Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA). Las ratas se colocaron en cajas individuales por un periodo de 12 horas de luz, cuando que estuvieron en ayuno y 12 horas de oscuridad, periodo en el cual se les colocó la comida. Al final del experimento se obtuvieron los valores del volumen de oxígeno ( $VO_2$ ) y volumen de  $CO_2$  ( $VCO_2$ ), con los cuales se puede obtener el coeficiente de intercambio respiratorio (RER) que indica el sustrato que se está utilizando (Tabla 5).

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

➤ **Carbohidratos (glucosa)**

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

➤ **Lípidos (ácido palmítico)**

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

**Tabla 5. Tipo de sustrato utilizado según la relación  $VCO_2/VO_2$**

>1	Sobrealimentación y lipólisis
1	Utilización neta de carbohidratos
0.7	Utilización neta de lípidos
<0.7	Subalimentación y cetogénesis
0.8-0.9	Utilización mixta de sustratos (lo ideal)

#### **5.14 Parámetros bioquímicos**

Se determinaron glucosa, colesterol, triglicéridos, LDL a partir del suero mediante el analizador COBAS C111 de Roche™.

#### **5.15 Determinación de insulina, leptina, IgAs y lipopolisacáridos en suero.**

Los LPS (Cloud-Clone Corp, Houston, TX, USA), IgAs (MyBioSource, San Diego, CA, USA), leptina (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA) e insulina (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA) se midieron utilizando kits comerciales de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### **5.16 Análisis del gen 16S ribosomal por secuenciación utilizando la plataforma de Miseq Illumina.**

Para el análisis de la microbiota se recolectaron heces frescas de las ratas al final del estudio. Se guardaron en 1 ml de RNAlater® (QIAGEN, Hilden, Alemania) y almacenó a -80°C hasta su análisis. Se purificó el ácido desoxirribonucleico (DNA) de la muestra de heces con un kit comercial para la extracción de DNA QIAamp Mini Stool Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) La absorbancia del DNA obtenido se midió mediante un espectrofotómetro (NanoDrop) y la pureza del DNA, se cuantificó con el fluorómetro Qubit y se verificó la integridad mediante electroforesis capilar con la plataforma QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Para el análisis del gen 16S ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) se amplificó la región V3-V4 (aproximadamente 490 bp) a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los siguientes primers: Forward (5'TCGTCCGGCAGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCW GCAG3') y Reverse (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG GACTACHVGGGTATCTAATCC3').

Posteriormente se procedió a la limpieza de los productos de PCR con perlas Ampure XP (Beckman, Brea, CA, USA) y su respectiva verificación del

producto de aproximadamente 550 pb por electroforesis capilar. Se realizó el indexado del producto de PCR mediante el kit Nextera XT v2 y se realizó limpieza del producto de PCR con perlas magnéticas. Una vez obtenidas las librerías se cuantificaron por un método fluorométrico (Qubit v3.0) y se verificó el peso molecular mediante electroforesis capilar. Posteriormente se realizó una mezcla equimolar de todas las librerías y el pool fue secuenciado en la plataforma MiSeq de Illumina. Las secuencias se analizaron utilizando la tubería QIIME 1.9 (Caporaso et al., 2010). Fueron filtradas las secuencias de baja calidad (<200 bp o >620 bp), secuencias con calidad <30 y las secuencias de bases ambiguas >0. Se realizó la búsqueda de Quimeras con Gold.fa. Las secuencias se agruparon en diferentes OTU, utilizando un límite de 97% de identidad de secuencia de nucleótidos. La afiliación taxonómica de cada OTU se determinó utilizando la base de datos GreenGenes v.13.9.

Se evaluaron medidas de alfa diversidad Chao, Simpson y Shannon. El análisis de coordenadas principales (PCA) de las distancias Unifrac weighted (cuantitativo) and unweighted (cualitativo), fueron utilizadas para comparar los diferentes tratamientos.

### **5.17 Western Blot.**

Para la determinación de la abundancia de proteínas involucradas en los procesos inflamatorios se procedió a la extracción de proteína usando aproximadamente 50 mg de tejido (Íleon) y amortiguador de lisis de radioinmunoprecipitación (RIPA). Se realizó el homogenizado con ayuda del equipo Tissue Lyser, se incubaron por 40 minutos en refrigeración y en un homogenizador rotatorio, después se centrifugó a 14000 rpm (radio del rotor = 10 cm) por 20 min y separó el sobrenadante que fue almacenado a -80°C hasta su análisis.

Se usaron 30 µg del extracto proteico obtenido, el cual se separó por electroforesis en un gel de poliacrilamida durante 30 min a 75 V y 120 minutos a 100 V. Posteriormente fueron transferidos por electrotransferencia húmeda a 100 V por 80 minutos a una membrana de polivinilo. Las membranas se

bloquearon con ASB al 3% en solución salina amortiguada con Tris (TBS)-Tween 0.1% durante 1 hora. Se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (TLR4 1:1,000, NF- $\kappa$ B 1:1,000, p-NF- $\kappa$ B 1:10,000), posteriormente se lavó con TBS-Tween al 0.1% y se incubó durante 90 minutos con el respectivo anticuerpo secundario. Se realizaron tres lavados de 10 minutos y se procedió al revelado mediante quimioluminiscencia. Se usó actina como proteína estructural para normalizar los datos.

### **5.18 Análisis histológico.**

Para la determinación de la morfología de los tejidos se procedió a la fijación de estos en formalina al 10%. Los tejidos se deshidrataron con diversos porcentajes de alcohol que aumentaron de manera ascendente de 50% a 100% de alcohol. Enseguida se procedió al aclaramiento a través de concentraciones de xiloles de manera descendiente hasta llegar a la inclusión con parafina.

Los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina para posteriormente obtener secciones de los tejidos de cuatro micras. Las laminillas se sometieron a la tinción hematoxilina-eosina. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe las estructuras ácidas en color azul o púrpura, mientras que la eosina, que es un colorante ácido, tiñe las estructuras básicas de color rosa.

Las laminillas se montaron para su visualización en el microscopio Leica (Leica DM750 Wetzlar, Alemania) con aumento 20X. Para el análisis del tamaño de los adipocitos se utilizó el software de análisis de Image J-Adiposoft (Image J, 1.14 versión, NIH, Bethesda, MD, EUA).

### **5.19 Contenido de ácidos grasos de cadena corta en heces.**

La cuantificación de ácidos grasos de cadena corta se evaluó a través de la técnica de cromatografía de gases. La metodología consistió en la suspensión de cada miligramo de muestra en 5  $\mu$ l de agua acidificada. La muestra se homogenizó y se centrifugó para obtener el sobrenadante que se inyectó en el

cromatógrafo de gases, el ácido 2-etilbutírico (1 mM) se añadió como estándar al sobrenadante.

### **5.20 Análisis estadístico.**

Los resultados se expresan en media±error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Tukey. La correlación entre dos variables se evaluó mediante una prueba de Pearson empleando el software GraphPad Prisma 8 (San Diego, CA, EUA). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.  $a < b < c$ . (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## VI. RESULTADOS

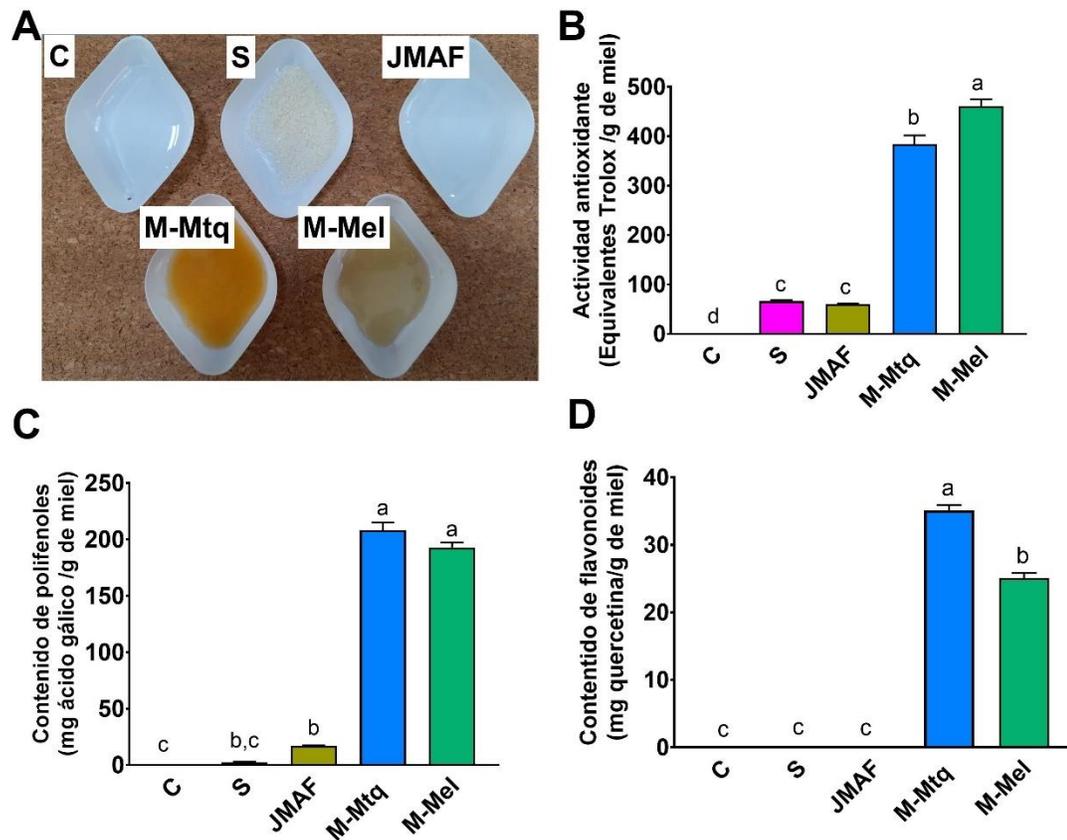
### 6.1 Actividad antioxidante, contenido de polifenoles, flavonoides y análisis bromatológico

La miel es una sustancia con características distintivas, que puede apreciarse de manera visual (**Figura 7A**) y química con respecto a otros edulcorantes. Posee fitoquímicos que le pueden conferir cualidades benéficas con respecto a otros edulcorantes.

En el presente trabajo se evaluó de la actividad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides en muestras de agua (C), sacarosa (S), jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), miel Mantequilla (M-Mtq) y miel Melipona (M-Mel). La prueba de actividad antioxidante por el método ORAC reveló que las muestras de mieles naturales (M-Mtq y M-Mel) presentan las actividades antioxidantes más altas,  $383.9 \pm 17.82$  y  $461 \pm 13.76$  Equivalentes Trolox/g de muestra respectivamente, con respecto a las muestras de JMAF y S que presentaron una actividad antioxidante de  $60.17 \pm 3.01$  y  $60.06 \pm 1.32$ , respectivamente. En lo que respecta al agua, esta no presentó actividad antioxidante (**Figura 7B**).

Dado que la actividad antioxidante de la miel puede deberse al contenido de polifenoles y flavonoides, se evaluó su contenido en las muestras. Los resultados arrojaron que, como era de esperarse, las muestras de mieles presentaron concentraciones de estos compuestos significativamente mayores que las muestras de S y JMAF ( $p < 0.0001$ ). El contenido de polifenoles en las muestras M-Mtq ( $208.4 \pm 6.58$  mg. ácido gálico/g muestra) fue 79 veces mayor que las concentraciones en S ( $2.61 \pm 0.27$  mg. ácido gálico/g muestra) y 12 veces mayor que en la muestra de JMAF ( $16.65 \pm 0.73$  mg. ácido gálico/g muestra), por su parte la muestra de M-Mel ( $192.9 \pm 4.47$  mg. ácido gálico/g muestra) presentó una concentración de polifenoles 72 veces mayor con respecto al grupo S y 11 veces con respecto al JMAF (**Figura 7C**). En lo que respecta al contenido de flavonoides, las muestras de M-Mtq presentaron una concentración de  $35.11 \pm 0.80$  y M-Mel  $25.03 \pm 0.79$  mg de

quercetina/g muestra. En las muestras S y JMAF no se identificó este compuesto (**Figura 7D**).



**Figura 7. Actividad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides en las muestras de estudio.** (A) Edulcorantes, (B) Contenido de polifenoles, (C) Contenido de flavonoides y (D) Actividad antioxidante de agua (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan como media±EEM (n=3). a<b<c<d.

Se determinó el contenido de carbohidratos digeribles, proteína, ácidos grasos, fibra dietética y el contenido energético de los edulcorantes utilizados en el estudio (**Tabla 6**). Los análisis revelaron que las mieles están en un rango de humedad de 12-22%, poseen altas concentraciones de azúcares digeribles que representan el mayor porcentaje de la masa de la miel, siendo el porcentaje de carbohidratos digeribles mayor en M-Mtq (87%), con respecto a M-Mel (77%) sin embargo, como era de esperarse poseen un porcentaje bajo de proteínas y grasa. En lo que respecta al contenido energético M-Mtq aporta 352 kcal por 100 gramos de miel, mientras que la M-Mel 311kcal, de manera

muy interesante, el JMAF presenta una concentración de carbohidratos de 75 g cercana a la presentada en M-Mel. La presencia de proteínas y grasas no fue detectada.

**Tabla 6. Análisis de la composición de los edulcorantes utilizados, en 100 g de muestra.**

	S	JMAF	M-Mtq	M-Mel
<b>Humedad</b>	ND	25	11.78	22.11
<b>Cenizas</b>	ND	ND	ND	ND
<b>Grasa</b>	ND	ND	ND	ND
<b>Proteína</b>	ND	ND	1.14	0.91
<b>Fibra dietética</b>	ND	ND	ND	ND
<b>Carbohidratos digeribles</b>	100	75	87.08	76.98
<b>Contenido energético</b>	400 kcal	300 Kcal	352 Kcal	311 Kcal

\*Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel).ND (No Detectado).

## 6.2 Actividad antimicrobiana de la miel

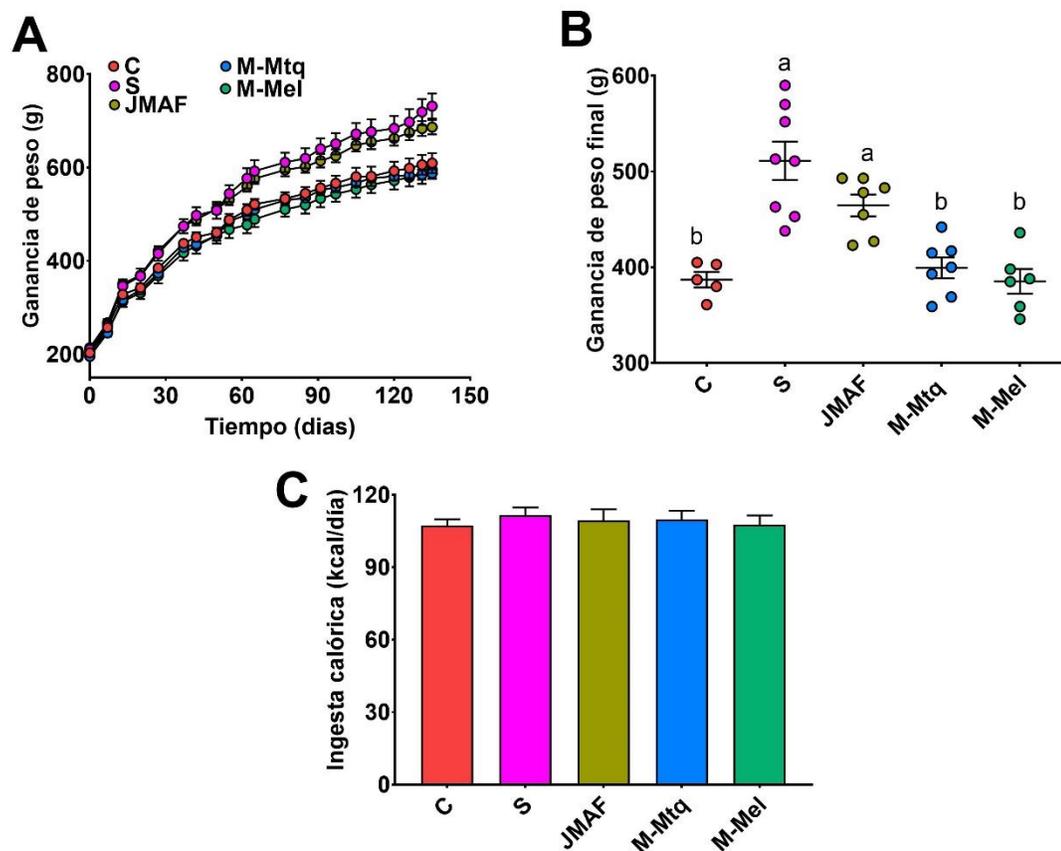
Se ha demostrado que la miel posee actividad antimicrobiana sobre diversas cepas patógenas, por lo que se decidió determinar si las mieles en estudio poseían actividad antimicrobiana sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *E. coli*, para ello, se utilizaron diversas concentraciones de las mieles en medio Eosina azul de metileno (EMB) las cuales fueron incubadas por 24 horas a 37°C. Los resultados expusieron que las mieles inhibieron el crecimiento de las bacterias, sin embargo, el porcentaje en la que inhiben es diferente dependiendo el tipo de miel. La miel M-Mtq tiene un potencial antimicrobiano total cuando se aplica al cultivo a una concentración de 10% en *E.coli* y *S. aureus*, 20% para *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, mientras que la miel M-Mel posee este efecto en *P. aeruginosa* al 20% y *S. aureus* al 50%, respectivamente (**Tabla 7**).

**Tabla 7. Efecto de diferentes concentraciones de miel sobre diversas cepas patógenas.**

<b>Miel mantequilla (M-Mtq)</b>				
<b>Microorganismo</b>	<b>Control</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>
<i>E. coli</i>	7.64x10 <sup>8</sup>	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	5.54x10 <sup>8</sup>	4.15x10 <sup>8</sup>	0	0
<i>E. faecalis</i>	3.85x10 <sup>8</sup>	3.39x10 <sup>8</sup>	0	0
<i>S. aureus</i>	1.03x10 <sup>8</sup>	0	0	0
<b>Miel Melipona (M-Mel)</b>				
	<b>Control</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>
<i>E. coli</i>	4.61x10 <sup>8</sup>	1.37x10 <sup>9</sup>	3.5 x10 <sup>6</sup>	1.5 x10 <sup>1</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	8.49 x10 <sup>8</sup>	5.18 x10 <sup>8</sup>	0	0
<i>E. faecalis</i>	2.74 x10 <sup>8</sup>	6.48 x10 <sup>8</sup>	6.0 x10 <sup>6</sup>	2.1 x10 <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i>	1.22 x10 <sup>9</sup>	7.65 x10 <sup>2</sup>	2.5 x10 <sup>1</sup>	0

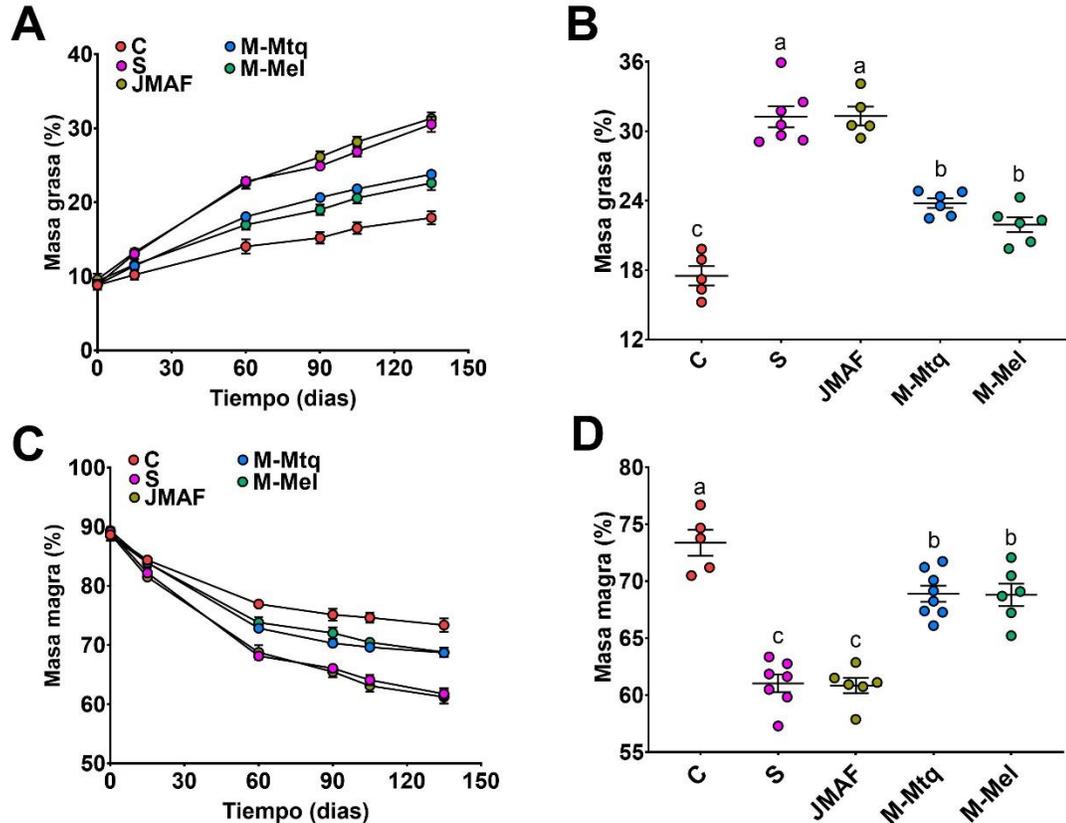
### **6.3 Curva de crecimiento y composición corporal**

Después de 18 semanas de tratamiento se encontró que los grupos que consumieron mieles presentaron pesos similares al grupo C, sin embargo, las ratas alimentadas con JMAF y S ganaron más peso (**Figura 8A**). Al final del estudio, las ratas que consumieron M-Mtq o M-Mel no tuvieron una diferencia significativa en el aumento de peso corporal, mientras que las alimentadas con S o JMAF ganaron un 32% y un 20% más de peso corporal en comparación con el grupo C ( $P < 0,05$ ) (**Figura 8B**). Con el fin de evaluar si los cambios se debían a la ingesta de alimento, a lo largo de tratamiento se midió la ingesta de comida y el consumo de agua para obtener la ingesta calórica promedio. El consumo calórico promedio al final del ensayo no presentó diferencias significativas entre los grupos C, S, JMAF, M M-Mtq y M-Mel (**Figura 8C**).



**Figura 8. Ganancia de peso e ingesta calórica en los diferentes tratamientos.** (A) Cambios en el peso corporal durante los días de tratamiento, (B) Ganancia de peso promedio final, (C) Ingesta calórica promedio final. Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se presentan como media±EEM (n= 5-8). a<b<c

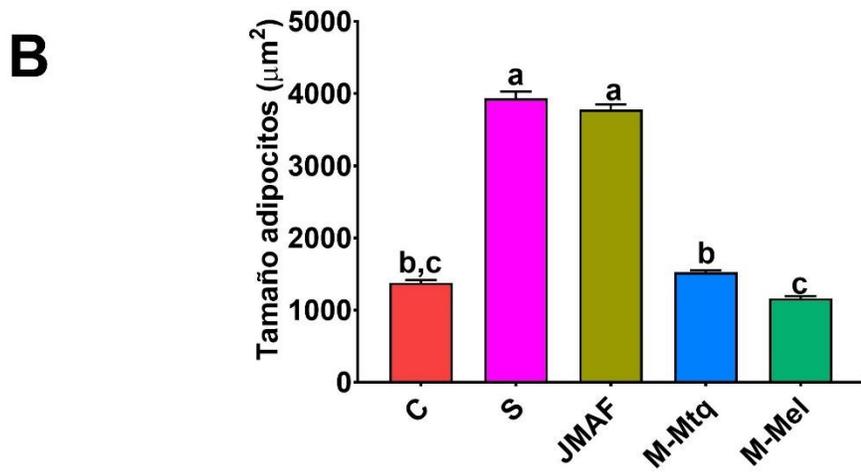
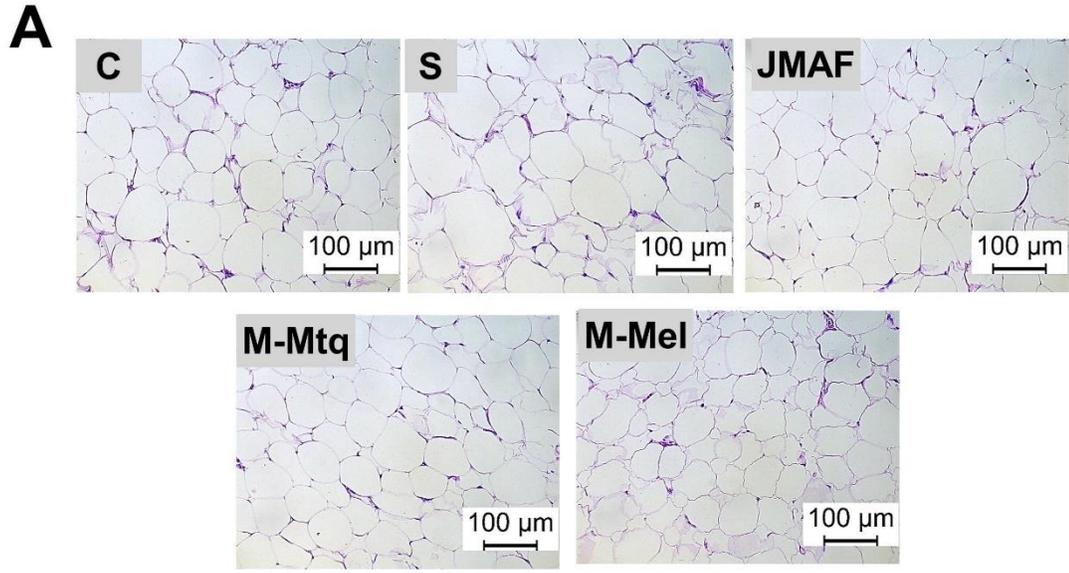
Después de las semanas de consumo de los edulcorantes, el porcentaje de masa de grasa promedio del grupo S y JMAF fue +79% respectivamente más alto que el grupo C de manera significativa ( $p < 0.0001$ ), sin embargo, los grupos tratados con mieles presentaron un aumento de 35% ( $p < 0.0001$ ) y 25% ( $p < 0.05$ ) para los tratamientos de M-Mtq y M-Mlp respectivamente (**Figura 9A-B**). Para determinar si el consumo de mieles podría tener efectos sobre la pérdida de masa magra, se determinó su porcentaje en los grupos de tratamiento. La comparación del porcentaje (%) de masa magra reveló que los grupos alimentados con S y JMAF (-13%) perdieron más masa magra que las ratas alimentadas con mieles que fue de aproximadamente -6% (**Figura 9C-D**).



**Figura 9. Composición corporal en los diferentes tratamientos.** (A) % masa grasa a través de los días de tratamiento, (B) % masa grasa final, (C) % masa magra a través de los días de tratamiento, (D) % masa magra final. Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), miel Mantequilla (M-Mtq) y miel Melipona (M-Mel). Los resultados se presentan como media±EEM (n= 5-8). a<b<c.

#### 6.4 Morfología y tamaño del tejido adiposo.

El aumento de adiposidad y cambios morfológicos se detectó usando tinción hematoxilina-eosina. Como se observa en la **Figura 10**, las ratas alimentadas con S y JMAF exhibieron un incremento de grasa severo en comparación con los demás tratamientos, aumentando 1.8 veces el tamaño de los adipocitos con respecto al grupo C ( $p<0.0001$ ), seguido de JMAF con 1.7 veces de incremento ( $p<0.0001$ ). El tratamiento M-Mtq exhibió un incremento más leve que no presentó diferencias, mientras que el grupo M-Mel disminuyó su tamaño de manera no significativa con respecto al control.

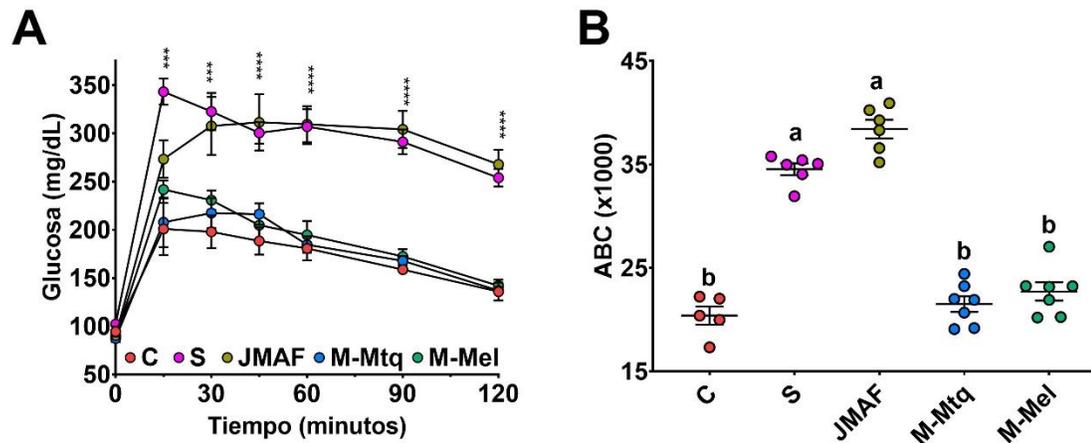


**Figura 10. Análisis histomorfológico de los adipocitos.** Imágenes representativas de los cambios histomorfológico presentados después del consumo de los tratamientos. Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan como media±EEM. a<b<c.

### 6.5 Efecto de las mieles sobre la tolerancia a la glucosa.

En la **Figura 11** se puede observar que las concentraciones iniciales de glucosa, fueron similares entre los tratamientos con aproximadamente 100 mg/dL, sin embargo, las concentraciones de glucosa fueron significativamente diferentes después de los 15 minutos de haber sido administrada la glucosa, fenómeno que se conservó hasta el minuto 120 de la curva.

El análisis del área bajo la curva (ABC) de todos los tiempos de CTG, reveló que como era de esperarse las mieles presentaron ABC similares al grupo control, mientras que los alimentados con S y JMAF presentaron un aumento del ABC significativo de 69% ( $p=0.0001$ ) y 88% ( $p=0.0001$ ) respectivamente.



**Figura 11. Curva de tolerancia a la glucosa.** (A) Curva de tolerancia a la glucosa después del consumo de diferentes edulcorantes, (B) Área bajo la curva de glucosa. Control (C), Sacarosa (S), jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), miel mantequilla (M-Mtq) y miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM,  $n=5-7$ . ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ ).  $a < b$ .

## 6.6 Parámetros bioquímicos.

Dados los resultados en la curva de tolerancia a la glucosa y el aumento en la adiposidad era de esperarse que existiera una modificación en los parámetros bioquímicos, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol total y LDL (**Tabla 8**). Las concentraciones de leptina e insulina también se determinaron. Las ratas alimentadas con S y JMAF presentaron un aumento de 2.5 y 1.5 veces las concentraciones de leptina de manera significativa con respecto al control ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.005$  respectivamente). En lo que respecta a la insulina, las ratas que consumieron M-Mtq o M-Mel mostraron niveles séricos de insulina similares a los del grupo C, mientras que las alimentadas con S o JMAF tenían 1,4 ( $p < 0.0001$ ) y 0,9 veces ( $p < 0.05$ ) más insulina sérica en comparación con el grupo C de manera significativa.

**Tabla 8. Parámetros bioquímicos en suero, al final de los tratamientos.**

	C	S	JMAF	M-Mtq	M-Mel
Glucosa (mg/ml)	135.3±1.40	138.7±2.67	129.8±2.34	132.9±2.78	131.5±2.71
Triglicéridos (mg/ml)	104.4±14.6	125.4±10.97	104.7±16.18	80.7±12.16	90.46±7.81
Colesterol total (mg/ml)	63.05±7.05	57.64±3.55	44.93±3.40	54.04±3.46	56.51±5.42
Colesterol LDL (mg/ml)	12.69±2.36	10.47±1.04	10.27±1.85	11.13±1.94	11.04±1.88
Leptina (ng/ml)	1.98±0.39 <sup>b</sup>	6.80±0.61 <sup>a</sup>	5.40±0.55 <sup>a</sup>	2.70±0.24 <sup>b</sup>	2.65±0.39 <sup>b</sup>
Insulina (ng/ml)	1.55±0.25 <sup>b</sup>	3.83±0.40 <sup>a</sup>	2.91±0.23 <sup>ab</sup>	1.71±0.09 <sup>b</sup>	1.88±0.19 <sup>ab</sup>

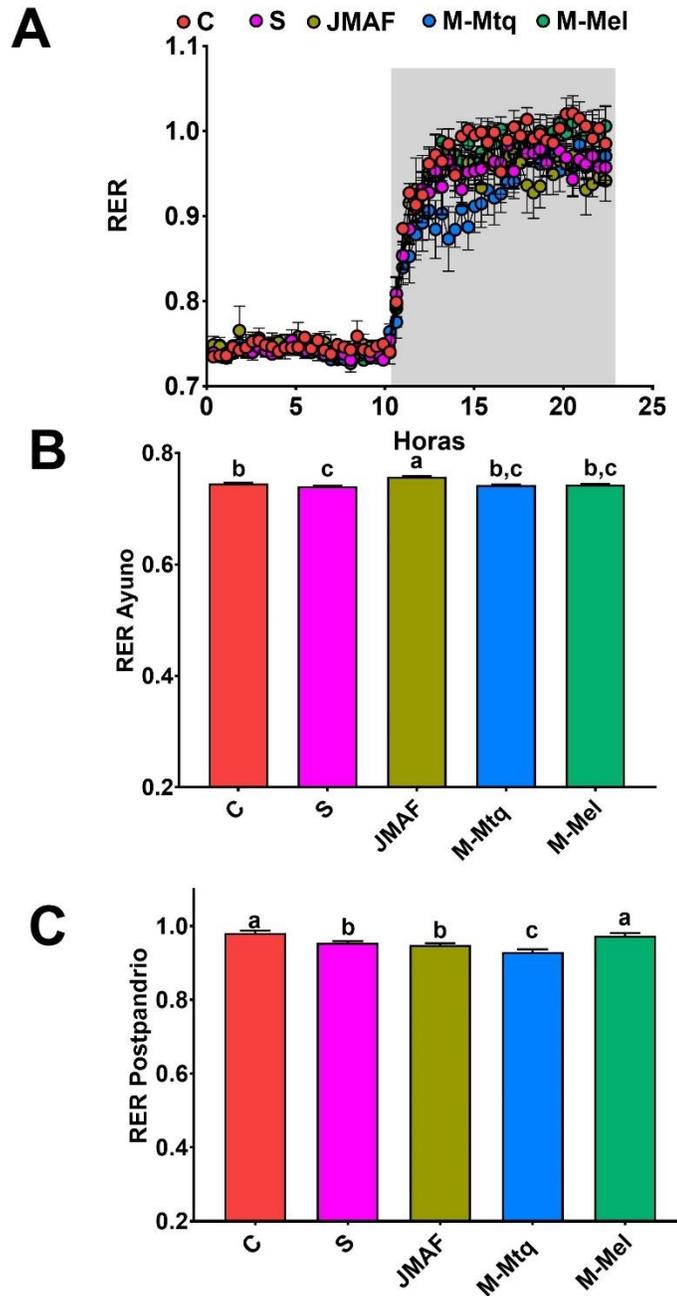
\*Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan como media±EEM. a<b.

### 6.7 Gasto energético y coeficiente respiratorio.

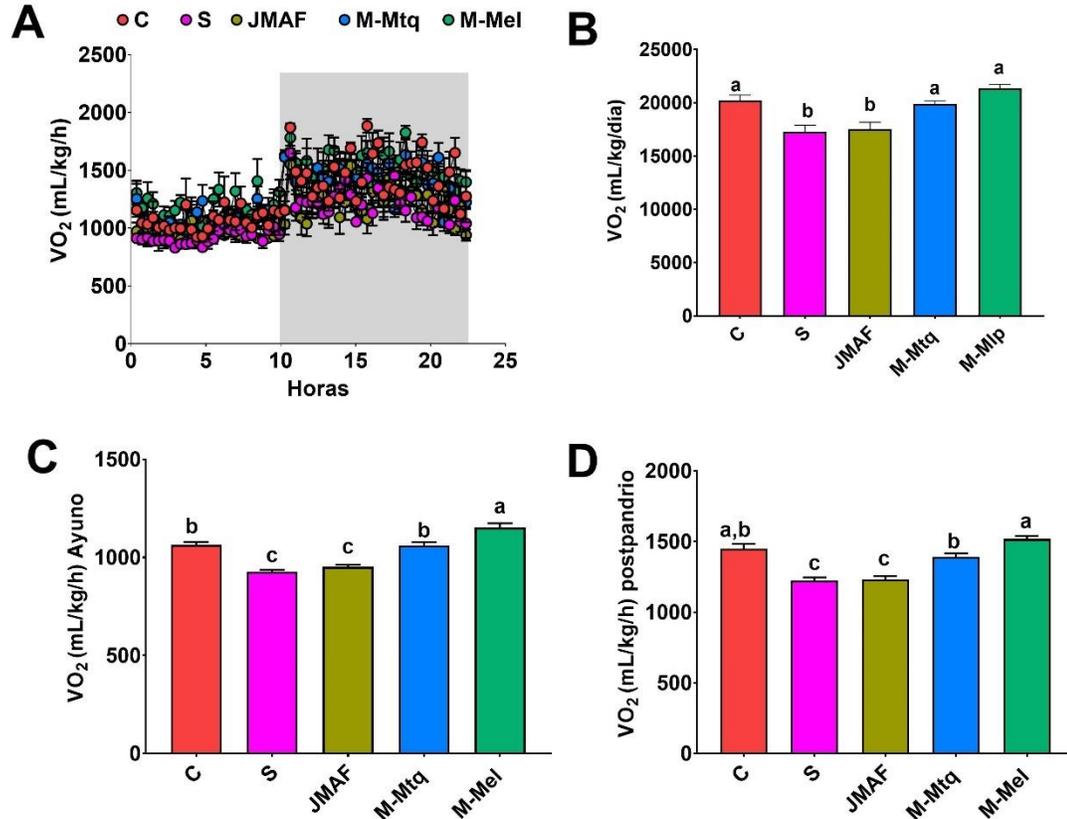
Para determinar el efecto que tuvieron las mieles sobre el gasto energético y el uso de sustrato, se realizó calorimetría indirecta. En la **Figura 12** se puede observar los valores de recambio respiratorio (RER) en la etapa de ayuno y postprandio (sombreado gris). Los resultados muestran que los tratamientos tienen un RER cercano a 0.7 en el ayuno lo que significa que todos los grupos están utilizando como sustrato lípidos, mientras que en el postprandio todos los grupos tienen un RER cercano a entre 0.9 y 1 por lo que el sustrato de consumo fue la glucosa o una utilización mixta de sustratos que es considerado lo ideal, lo que significa que las ratas fueron capaces de realizar el cambio de lípidos a carbohidratos.

El volumen de oxígeno (VO<sub>2</sub>) consumido a lo largo del día de las ratas alimentadas con mieles son los más altos lo que indica un mayor gasto energético, mientras que los grupos S y JMAF presentan los menores volúmenes de oxígeno. Este fenómeno también se repitió en la etapa de ayuno y postprandio (**Figura 13**). Los resultados anteriores sugieren al gasto energético como uno de los causantes de las diferencias presentadas en la

composición corporal, que no pudieron ser explicadas por la ingesta de alimento.



**Figura 12. Coeficiente respiratorio** A) RER a través de las 22 horas B) RER ayuno C) RER postpandrio. Control(C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), miel mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan como media±EEM (n=4-6).

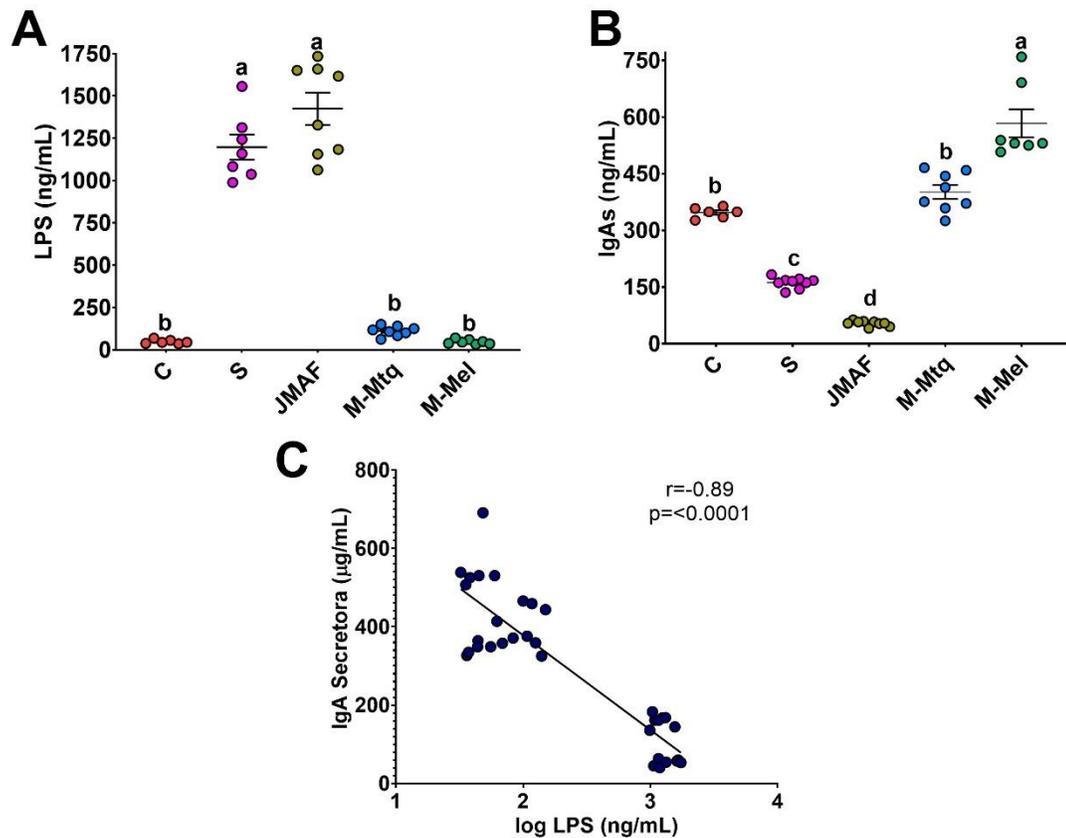


**Figura 13. Volumen de oxígeno.** A) Volumen de oxígeno 22 horas, B) Volumen de oxígeno total, C) Volumen de oxígeno ayuno, D) Volumen de oxígeno postpandrio. Control(C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan como media±EEM (n= 4-6). a<b<c.

### 6.8 Efecto de las mieles sobre las concentraciones de LPS e IgAs.

Altas concentraciones de lipopolisacáridos se han asociado con una inflamación de bajo grado o endotoxemia metabólica (P. Cani & Delzenne, 2009), por lo anterior se determinó su concentración en suero. En la **Figura 14A** se muestran las concentraciones de LPS en suero y se puede observar que aumentaron significativamente en S y JMAF ( $p < 0.0001$ ), en relación con el grupo control y las mieles; esto sugiere que las mieles ejercen un efecto protector contra la endotoxemia metabólica que puede estar regulando la MI. La IgA secretora es una inmunoglobulina que se ha relacionado con el efecto inhibitorio de LPS, por lo que alimentos que promuevan la producción de esta inmunoglobulina son una alternativa de consumo comparado con la sacarosa

Los resultados de la **Figura 14B**, muestran que M-Mtq presenta concentraciones similares de IgAs que el control, interesantemente, las ratas tratadas con M-Mel aumentaron las concentraciones de IgAs en suero 60% de manera significativa ( $p < 0.0001$ ). Los tratamientos S (-54%,  $p < 0.0001$ ) y JMHF (-85%,  $p < 0.0001$ ) presentaron disminución en las concentraciones de esta inmunoglobulina. De manera interesante, se encontró una correlación significativa entre las concentraciones de LPS e IgA secretora ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 14 C**).



**Figura 14.** Concentración de LPS e IgA secretora en suero. (A) LPS, (B) IgA secretora, (C) Correlación IgAs vs LPS. Control (C), sacarosa (S), jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan en media  $\pm$  EEM,  $n=5-8$ .  $a < b < c < d$ .

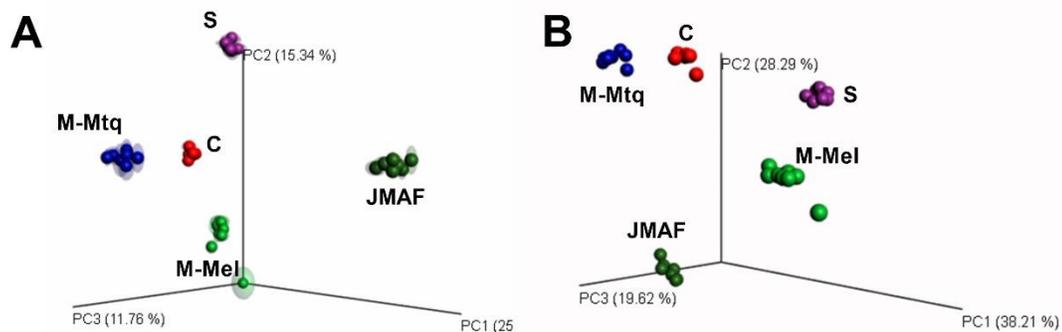
### 6.9 Modulación de la microbiota intestinal por los diferentes tratamientos.

Los cambios observados tanto en LPS como en la IgAs indicaban que probablemente los tratamientos modifican la microbiota de manera diferente. Por lo tanto, se analizó el gen 16S ribosomal en el DNA de las heces de los animales que consumieron los diferentes edulcorantes. Se obtuvieron un total de 726,811 secuencias (18,636±4613 por muestra). El análisis de la alfa diversidad reveló diferencias entre los grupos de tratamiento (**Tabla 9**), siendo las ratas alimentadas con sacarosa las que mayor alfa diversidad (riqueza biológica) poseen de acuerdo a los índices de Shannon, Chao y Simpson, sin embargo, todos los tratamientos poseen alfa diversidad alta. En lo que respecta a la beta diversidad (magnitud de cambio), el análisis de componentes principales reveló una separación entre los grupos alimentados con mieles y los tratamientos JMAF y S (**Figura 15**).

**Tabla 9. Alfa diversidad.**

	C	S	JMAF	M-Mtq	M-Mel
<b>Chao</b>	211.03±4.33 <sup>b</sup>	226.33±3.65 <sup>a</sup>	212.75±5.55 <sup>b</sup>	213.23±6.17 <sup>b</sup>	214.89±3.88 <sup>b</sup>
<b>Simpson</b>	0.96±0.004 <sup>c</sup>	0.98±0.0004 <sup>a</sup>	0.97±0.001 <sup>a</sup>	0.97±0.001 <sup>c</sup>	0.97±0.005 <sup>b</sup>
<b>OTUS observadas</b>	208.33±2.16 <sup>c</sup>	223.2±2.25 <sup>a</sup>	205±5.25 <sup>c</sup>	211.87±5.51 <sup>c,b</sup>	213±2.50 <sup>c,b</sup>
<b>Shannon</b>	6.24±0.07 <sup>b</sup>	6.68±0.01 <sup>a</sup>	6.35±0.07 <sup>b</sup>	6.20±0.02 <sup>b</sup>	6.37±0.27 <sup>b</sup>

\*Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel).



**Figura 15. Beta diversidad.** (A) Análisis de coordenadas principales unweighted; (B) weighted. Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel).

En lo que respecta a la microbiota, a nivel de phyla (**Figura 16**), Bacteroides, Firmicutes y Verrucomicrobia son las más abundantes. El grupo M-Mel presentó una abundancia de Firmicutes del 70%, M-Mtq 40% y el grupo control del 50%; mientras que los grupos S y JMAF del 53%; siendo la abundancia de M-Mel significativamente mayor que todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Para el phylum Bacteroidetes las abundancias más altas se presentaron en el grupo M-Mtq (44%), seguido de S y JMAF (35%), C (31%) y M-Mel (18%), siendo este último menor que las abundancias de los demás tratamientos.

El análisis a nivel de género (**Figura 17**) reveló que las muestras de mieles presentan un aumento del género Coprococcus y disminuyeron en los grupos S y JMAF con respecto al control. Mientras que las ratas alimentadas con S y JMAF aumentaron la abundancia de Alistipes y SMB53. En este estudio, *Ruminococcus flavefaciens*, *Defluvitalea sacharophila*, *Blautia producta*, *Allistipes massillensis*, y *Bacteroides acidifaciens*, son las principales especies cambiantes y las abundancias relativas de estas especies se alteraron significativamente (**Figura 18, 19**). Siendo la especie *Defluvitalea sacharophila* la que presenta mayor abundancia en las ratas que consumieron las mieles y de menor abundancia en las que consumieron S o JMAF. En lo que respecta al análisis discriminante lineal (LDA), nuevamente comprobó a *Defluvitalea sacharophila* como una de las principales especies representativas de las ratas alimentadas con mieles, además que pudo identificarse a *Blautia producta* y *Coprococcus eutactus* en el grupo alimentado con M-Mtq, mientras que las alimentadas M-Mel tienen a *Muscispirillum schaedleri* como la especie más representativa.

Se examinó si la abundancia de estas especies, correlacionaban con el porcentaje de masa magra en las ratas en estudio (**Figura 20A-B**). De manera interesante, se encontró una correlación significativa entre la abundancia de *Defluvitalea Saccharophila* y el porcentaje de grasa corporal. Como consecuencia también se encontró una correlación inversa con el porcentaje de masa magra. Contrario a los resultados anteriores mayor abundancia de

*Allistipes massillensis* especie más abundante en el grupo de JMAF se correlaciona con menor masa grasa y mayor masa magra (Figura 20C-D).

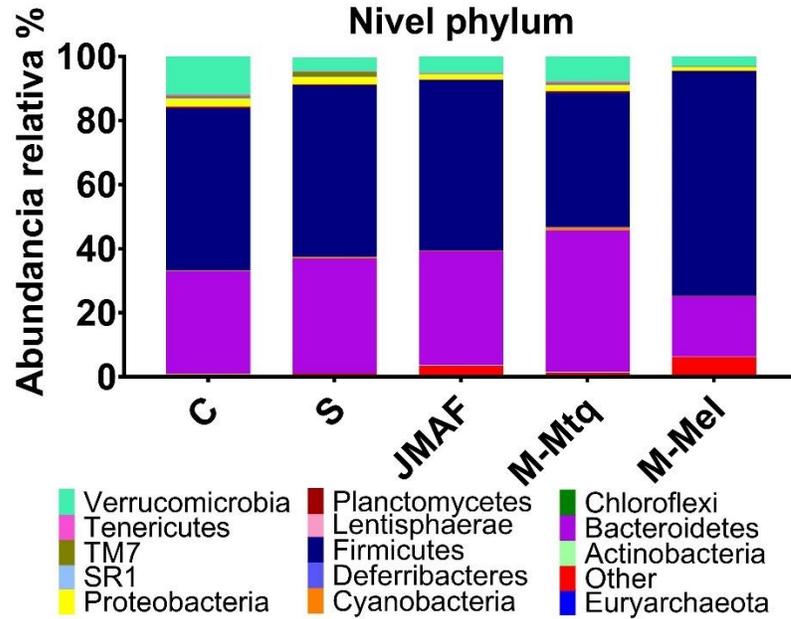
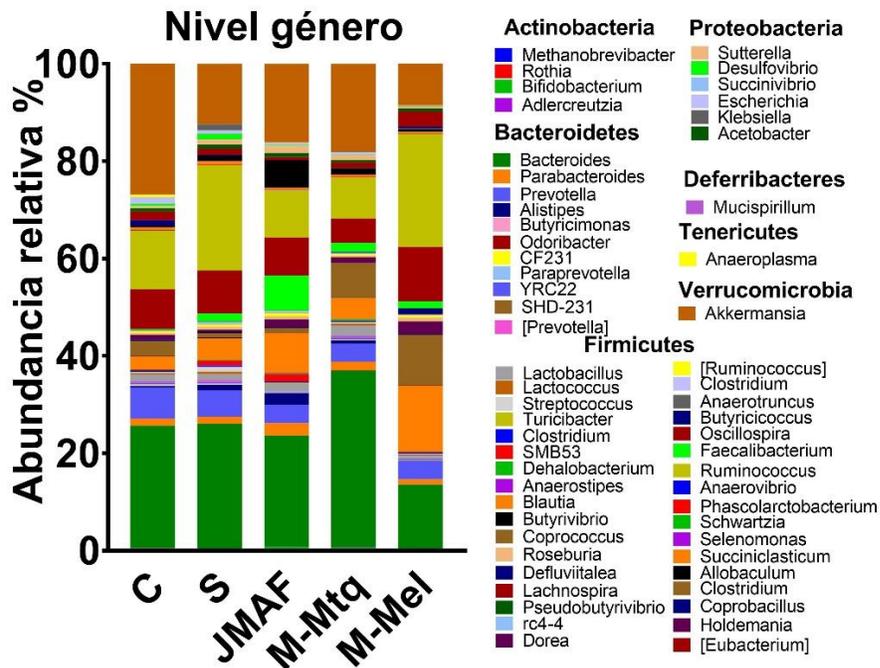
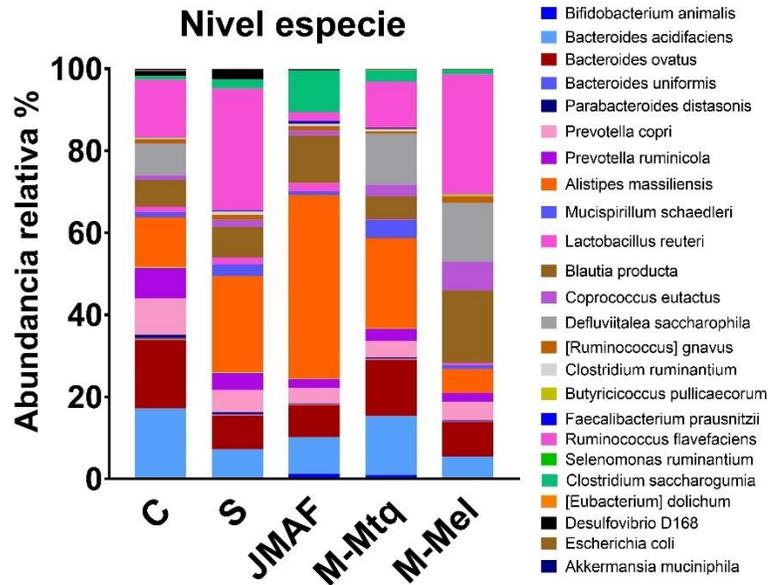


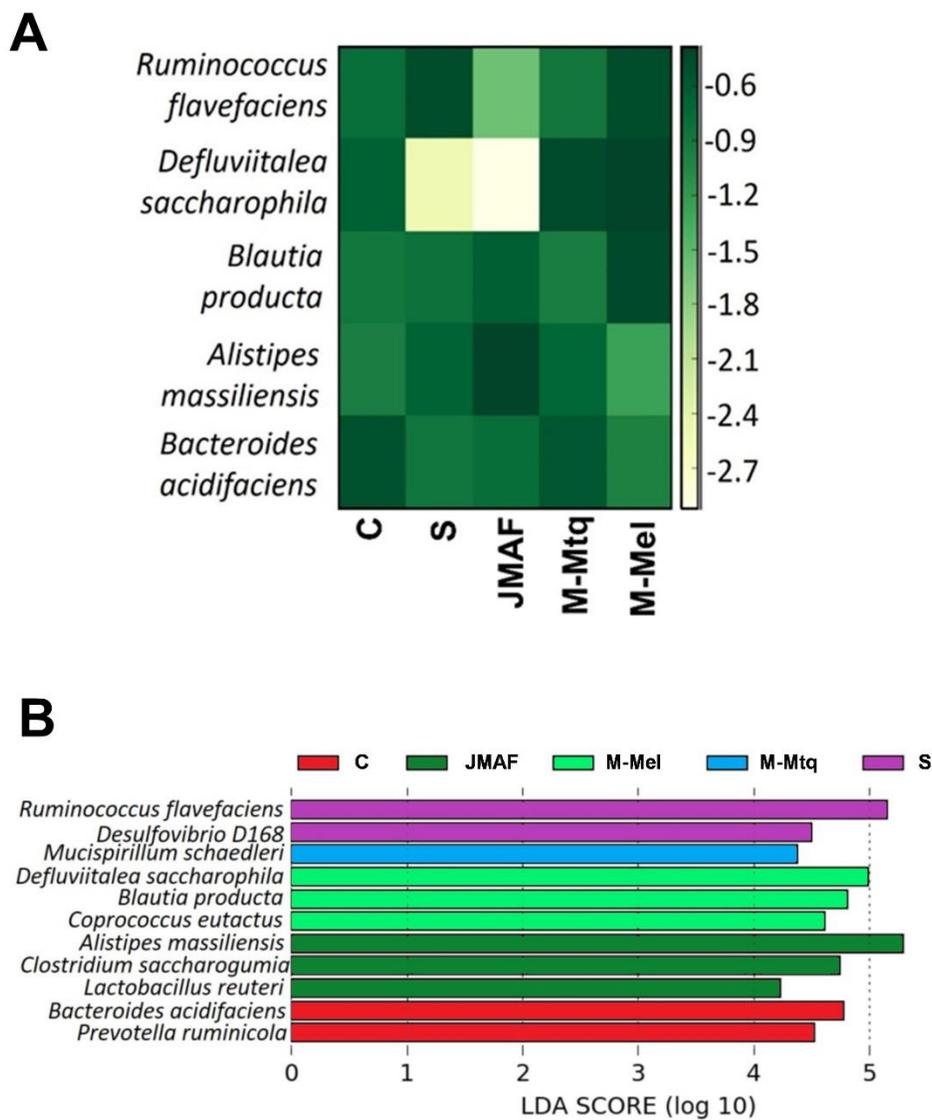
Figura 16. Abundancia relativa de las principales phylas. Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel).



**Figura 17. Abundancia relativa de los principales géneros.** Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel).



**Figura 18. Abundancia relativa de las principales especies.** Control (C), Sacarosa (S), jarabe de maíz (JMAF), miel mantequilla (M-Mtq) y miel Melipona (M-Mel).



**Figura 19. Principales especies cambiantes. A** )Heat map de las 5 principales especies cambiantes, QIIME "otu\_category\_significance.py", que utiliza un ANOVA para utilizando QIIME "otu\_category\_significance.py" (ANOVA) Escala normalizada logarítmicamente. **B**) Análisis discriminante lineal (LDA). Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel).

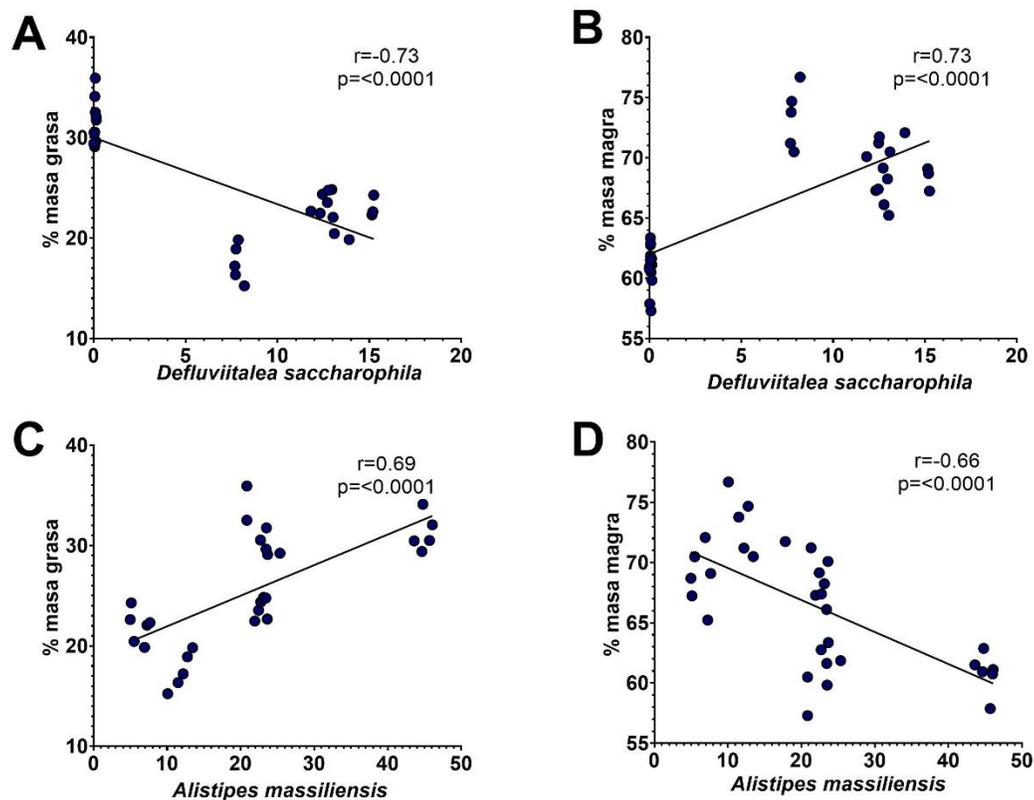
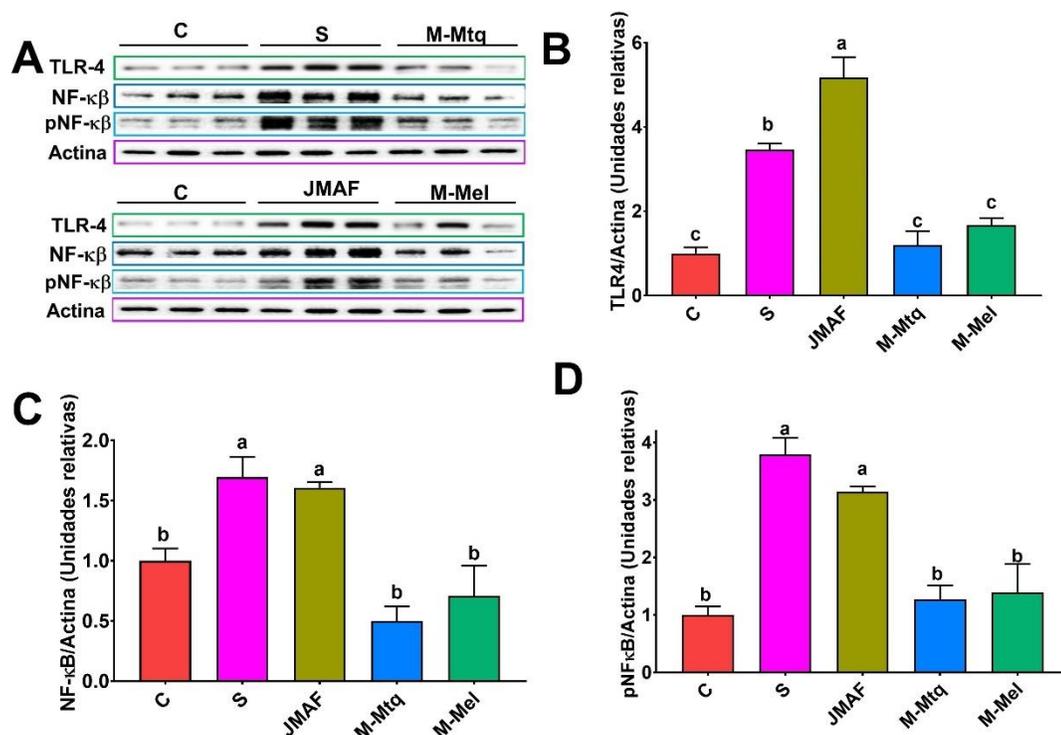


Figura 20. Correlación de las principales especies cambiantes y el porcentaje de masa grasa y magra.

### 6.10 Efecto de las mieles sobre la abundancia de proteínas involucradas en la inflamación.

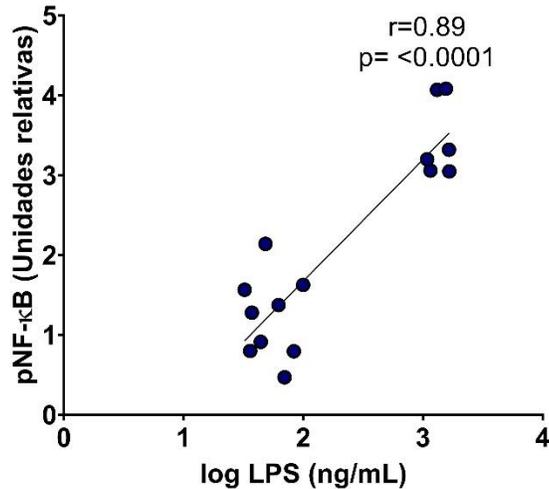
Diversos estudios han demostrado que un aumento de LPS puede desencadenar procesos inflamatorios (P. D. Cani et al., 2012; Ngkelo et al., 2012), dado que los resultados anteriormente mostraban que los grupos de tratamiento que consumieron JMAF y S tuvieron altos niveles de LPS se decidió determinar la abundancia de proteínas involucradas en la inflamación entre los que se incluyen TLR4, NF- $\kappa$ B y pNF- $\kappa$ B - con respecto a actina a través de la técnica de Western Blot en íleon.



**Figura 21. Abundancia relativa de proteínas involucrada en la inflamación en íleon.** A) Abundancia relativa de proteínas involucradas en la inflamación, B) Receptor tipo Toll 4 (TLR-4) C) Factor Nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas (NF-κB) D) Factor Nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas fosforilada (pNF-κB). Control (C), Sacarosa (S), Jarabe de maíz (JMAF), Miel Mantequilla (M-Mtq) y Miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan en media±EEM. a<b.

Los datos revelaron que las ratas alimentadas con S y JMAF aumentan 2.4 y 4.17 veces la expresión de TLR4, mientras, mientras que los grupos que consumieron mieles presentan expresiones similares al control (**Figura 21B**). La activación de TLR4 puede activar la expresión de la cascada de inflamación a través de NF-κβ, por lo que su expresión fue determinada. Se encontró que como era de esperarse las expresiones de NF-κβ en las ratas alimentadas con S y JMAF aumentaron 0.6 veces de manera significativa con respecto al control, sin embargo, los grupos de mieles presentan expresiones de NF-κβ similares al control (**Figura 21C**). El similar fenómeno se observó al evaluar la expresión de p-NF-κβ en las que se observó que las mieles presentan expresiones similares al control, mientras que los grupos alimentados con S y

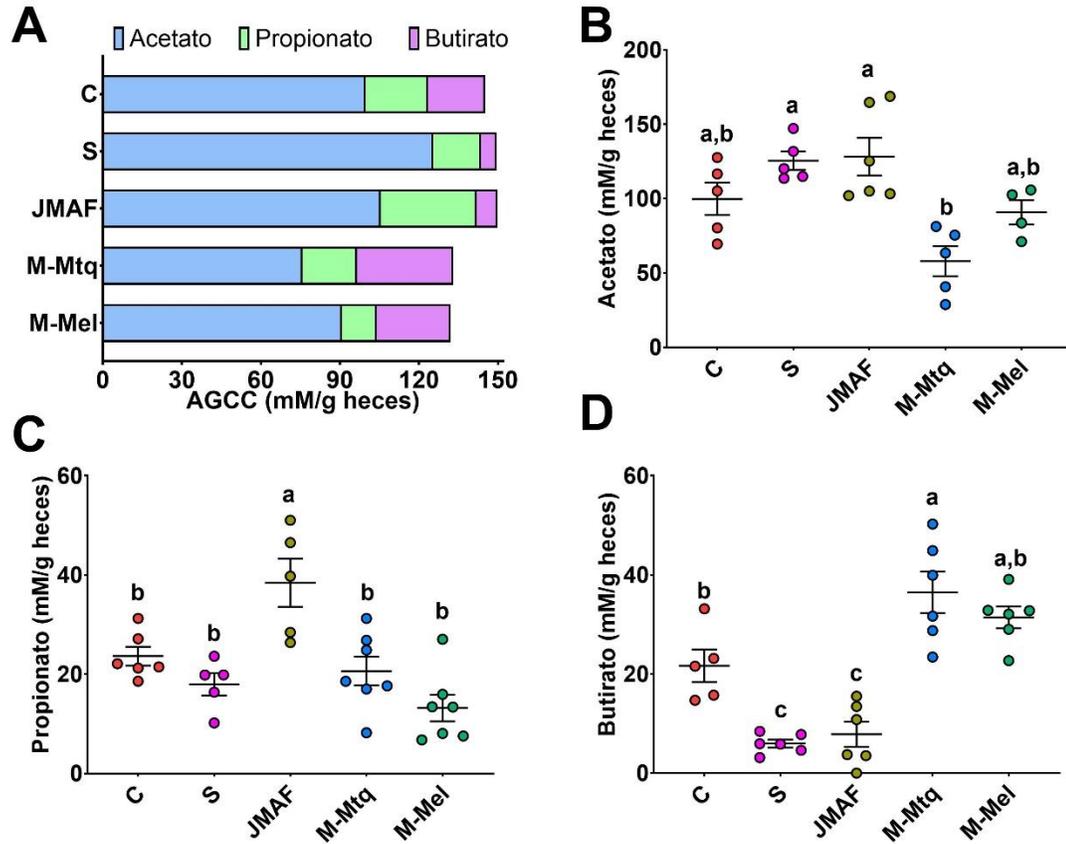
JMAF presentan las expresiones más altas (2.7 y 2.1 veces respectivamente) (**Figura 21D**), los datos anteriores además se correlacionaron positivamente con los niveles de LPS, siendo los grupos que consumieron S y JMAF los que presentan las concentraciones más altas (**Figura 22**).



**Figura 22. Correlación entre la abundancia de p-NF-κβ y la concentración LPS en suero.**

### 6.11 Ácidos grasos de cadena corta.

La dieta puede afectar los AGCC que se producen por lo anterior se determinaron sus concentraciones en muestras de heces al final del tratamiento. En la **Figura 23A** se puede observar que el grupo C presentó una concentración de AGCC de 145.125 mM/g mientras que las concentraciones del grupo S son más altas (149.45 mM/g heces) y en JMAF (149.71 mM/g heces). Las mieles M-Mtq y M-Mel presentaron concentraciones de 132.93 y 132 mM/g heces respectivamente. En lo que respecta a los tipos de AGCC no se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de acetato entre los grupos de tratamiento con respecto al control (**Figura 23B**). Sin embargo, las concentraciones de propionato de las ratas que consumieron S, presentan las concentraciones más altas con respecto a los demás tratamientos (**Figura 23B**). En lo que respecta al butirato este se presentó en menor concentración en las ratas que consumieron S y JMAF, sin embargo, las mieles presentan las concentraciones más altas.



**Figura 23. Concentraciones de acetato, propionato y butirato en muestras fecales de ratas alimentadas con diferentes mieles.** Control(C), Sacarosa (S), jarabe de maíz (JMAF), miel mantequilla (M-Mtq) y miel Melipona (M-Mel). Los resultados se expresan en media±EEM.

## VII. DISCUSIÓN

En la actualidad hay un creciente consumo de bebidas con alto contenido de azúcar que supera las ingestas recomendadas, lo cual se ha sugerido como una causa de diversas enfermedades frecuentes hoy en día y que han modificado la microbiota intestinal de forma negativa (Di Rienzi & Britton, 2019). Los edulcorantes naturales como la miel parecen ser una alternativa para el consumo de la población en general. Se ha descrito además de su poder edulcorante, efectos benéficos sobre el mantenimiento de peso corporal y la sensibilidad a la insulina (Ramli et al., 2018), así como propiedades antimicrobianas, que pueden modular el crecimiento de bacterias, debido a la presencia de compuestos minoritarios como polifenoles (Rodríguez et al., 2012).

En el presente estudio exploramos el efecto de diferentes tipos de mieles en la MI. Debido a que la miel es una sustancia compuesta mayoritariamente de azúcares principalmente monosacáridos, se compararon con otros edulcorantes ricos en sacarosa o glucosa y fructosa. El jarabe de maíz alto en fructosa es un edulcorante derivado de la hidrólisis del almidón de maíz (45% glucosa-55%fructosa), que posee efectos sobre la ganancia de grasa corporal a corto y largo plazo (Bocarsly et al., 2010) y la sacarosa, un disacárido formado de 50% glucosa y 50% fructosa, edulcorante al que se le han atribuido el desarrollo de múltiples anormalidades bioquímicas (Muoio, 2017).

Con el objeto de conocer cuáles serían los compuestos que le dan a la miel el efecto benéfico sobre la salud, a pesar de tener el mismo contenido energético que la sacarosa o el JMAF se evaluó la actividad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides, así como el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de los edulcorantes en estudio. Los resultados revelaron que las mieles naturales con respecto a la S y JMAF presentan actividad antioxidante entre 6 y 7 veces más, esto debido a la presencia de polifenoles y flavonoides que se detectaron en bajas o nulas concentraciones en los demás tratamientos, sin embargo, M-Mel presenta mayor actividad antioxidante y menor porcentaje de carbohidratos en comparación con la miel M-Mtq. Los

resultados anteriores confirman que las mieles a pesar de ser una solución mayoritariamente de azúcares son una fuente de compuestos fenólicos en comparación con otros edulcorantes (Grabek-Lejko & Tomczyk-Ulanowska, 2013). Además de actividad antioxidante, las mieles poseen efectos antibacterianos contra diferentes cepas patógenas (Alnaqdy et al., 2005; Wilkinson & Cavanagh, 2005). Con el fin de determinar el potencial antimicrobiano de las mieles se compararon sus efectos sobre las cepas patógenas usando diferentes concentraciones de las mieles. Los resultados demostraron que tal como se ha reportado en estudios previos (Deepak Kumar et al., 2014; Wilkinson & Cavanagh, 2005), inhiben el crecimiento de cepas patógenas del tracto gastrointestinal como *E. coli* y *E. fecallis*; sin embargo, su potencial es diferente; esto pudo deberse a la diferencia de hipertonidad de las mieles. Los resultados anteriores sugirieron que las mieles podían ejercer efectos variados sobre el microbiota intestinal al ser suplementado a un modelo animal.

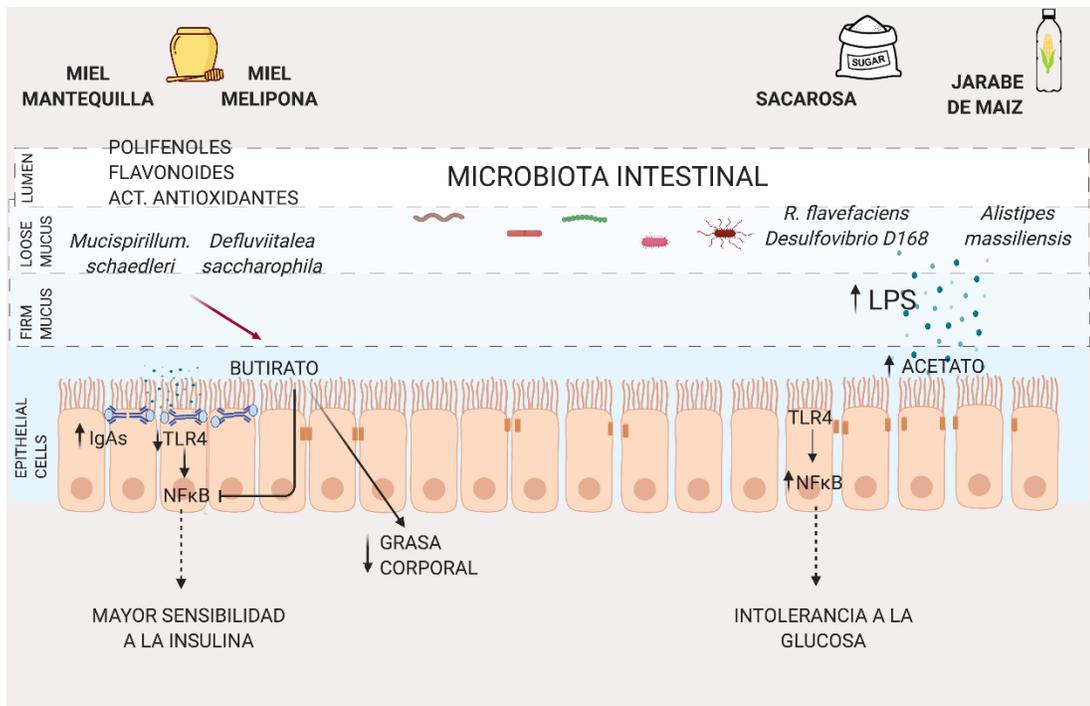
Al evaluar el efecto de las mieles, sobre el modelo animal de ratas Wistar macho se observó que después de las 18 semanas de tratamiento los grupos de mieles no presentaron diferencias significativas en la ganancia de peso con respecto al grupo C. De manera muy interesante, las ratas que consumieron M-Mtq y M-MLP (24%) mostraron una ganancia de masa grasa menor comparado con el grupo que consumió S, el cual tuvo una media final de 30% de grasa. Estos resultados son consistentes con lo informado en estudios previos en ratas que recibieron un tratamiento a largo plazo con miel ganan menos peso que otros tratamientos (Chepulis & Starkey, 2008). El aumento de la masa grasa se puede asociar con un aumento en el tamaño de los adipocitos. El análisis histológico del tamaño de los adipocitos confirmó lo anterior. En nuestro estudio, se observó que el tratamiento con M-Mtq mantiene el tamaño promedio de los adipocitos al final del estudio, mientras que el tratamiento con M-Mel disminuyó el tamaño de los adipocitos de manera significativa; caso contrario es el de los grupos de S y JMAF. Los resultados pueden sugerir efectos protectores de las miel sobre la hipertrofia del tejido

adiposo (Ramli et al., 2019), que pueden desencadenar efectos metabólicos. Por lo anterior se determinó el efecto de las mieles sobre parámetros bioquímicos, CTG y el gasto energético. Los niveles de glucosa y triglicéridos, no presentaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, sin embargo indujeron cambios en los niveles de insulina y leptina que se presentaron en menor concentración en los grupos de mieles con respecto a grupo S, lo que es consistente con estudios previos (Al-waili, 2004; Erejuwa et al., 2012; Münstedt et al., 2008). Esto sugiere que las ratas alimentadas con S y JMAF podrían desarrollar resistencia a la insulina como se demostró después de realizar una curva de tolerancia a la glucosa. Los resultados revelaron que las mieles mejoraron significativamente la tolerancia a la glucosa con respecto al grupo de S y JMAF que aumentó su ABC significativamente con respecto al control durante el tratamiento. Además, las ratas alimentadas con mieles presentaron gastos energéticos mayores a las ratas alimentadas con S y JMAF, lo que corrobora que las mieles aumentan el gasto de energía y por consiguiente hay una disminución de la masa grasa en las ratas tratadas con estos edulcorantes. Estos resultados sugieren que los cambios en la MI podrían estar involucrados en estos efectos. Por lo anterior en este estudio se examinaron los cambios en la MI debido a la ingesta de mieles. Después de 18 semanas de tratamiento la abundancia de *Defluviitalea sacharophila*, aumento en los grupos de mieles con respecto a los demás tratamientos. El aumento la abundancia de *Defluviitalea sacharophila*, si bien hasta el momento no hay estudios que asocien esta bacteria y su papel en la adiposidad y en enfermedades metabólicas, en el presente estudio se demostró que su abundancia correlaciona con la disminución de la masa grasa y el aumento de la masa magra en las ratas en estudio. Caso contrario a lo anterior *Allistipes massillensis* presentó mayor abundancia en los grupos alimentados con JMAF especie que se correlacionó con el aumento de la masa grasa.

Un desequilibrio en la MI puede promover la inflamación de bajo grado llamando endotoxemia metabólica, debido a la exposición de productos bacterianos como los lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos (LPS) son

potentes endotoxinas presentes en la membrana de las bacterias Gram negativas, que se ha reportada su asociación con diversas patologías (Cani et al., 2007). Se ha descrito que una dieta alta en carbohidratos promueve el aumento de LPS circulantes (Rosas-Villegas et al., 2017), estos datos son similares a lo encontrado en el presente estudio donde los grupos S y JMAF presentaron los niveles más elevados de LPS. Sin embargo, las mieles presentan niveles similares al control, lo que sugiere un efecto protector de las mieles sobre la inflamación de bajo grado debido probablemente a la presencia de fitoquímicos que le pueden conferir efectos protectores. Los niveles de LPS e IgAs están correlacionados y parecen ser modulados por la abundancia relativa de especies en la MI. En este estudio *Defluvitalea sacharophila* y *Mucispirillum shaedleri* parecen ser especies estimuladoras de la producción de IgA y por tanto consecuencia de la disminución de los lipopolisacáridos circulantes en suero en las ratas alimentadas con miel en el agua de bebida, mientras que las especies *Allistipes massillensis*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Desulfovibrio D168* parecen tener el efecto contrario. En modelos *in vitro* de células epiteliales intestinales se ha determinado la existencia de un mecanismo antiinflamatorio mediado por IgAs. Se ha determinado que IgAs neutralizan a los LPS por lo que se limita la inflamación local aguda inducida por patrones moleculares asociados a patógenos proinflamatorios (Fernandez et al., 2003). Los datos anteriores sugieren que las mieles actúan estimulando la producción de IgAs, por lo que su consumo puede beneficiar a la salud intestinal. El LPS es una endotoxina bacteriana que está involucrada en la activación de la vía de señalización de TLR4 el cual juega un papel importante en el inicio de la respuesta inmune innata (Kuzmich et al., 2017). La activación de este receptor es responsable de trastornos inflamatorios activados a través del reconocimiento del lípido A del LPS. Para corroborar si los niveles de lipopolisacáridos pudieran estar provocando un proceso inflamatorio en las ratas en estudio, se determinó la abundancia de proteínas involucradas en la inflamación. Con respecto a las proteínas se observó una sobreexpresión de TLR4 en los tratamientos de S y JMAF, sin embargo, en las ratas del grupo M-

Mtq presenta una expresión similar al control. En lo que respecta a las expresiones de NF- $\kappa$ B y p-NF-  $\kappa$ B, se elevaron en los grupos de JMAF y S, mientras en los grupos de mieles las concentraciones fueron similares al control. La MI es capaz de transformar los alimentos que normalmente consumimos, ejemplo de ellos son los AGCC que son metabolitos producidos por el huésped y modificados bioquímicamente por bacterias intestinales. En el presente trabajo se observó que al final del tratamiento solo presentaron diferencias la producción de butirato en los grupos alimentados con mieles con respecto a S y JMAF, metabolito que se ha relacionado por poseer un efecto antiinflamatorio al inhibir la activación NF- $\kappa$ B (Inan et al., 2000), los datos anteriores sugieren la participación de butirato en el bloqueo de la respuesta inflamatoria en las ratas que consumieron mieles. En general, la miel parece ser un buen agente edulcorante que proporciona beneficios para la salud comparado con la S y JMAF, nuestros resultados sugieren que la miel puede ser un compuesto que actúa principalmente a nivel intestinal.



**Figura 24. Resumen integrativo.** La miel es un edulcorante que posee propiedades distintivas comparado con edulcorantes como la sacarosa y el jarabe de maíz alto en fructosa. Evidencia del presente trabajo ha demostrado su efecto en la microbiota intestinal y en la prevención de la inflamación inducida por lipopolisacáridos, teniendo como consecuencias una mayor sensibilidad a la insulina, comparada con la sacarosa y el jarabe de maíz alto en fructosa.

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ El consumo de mieles no modificó la ganancia de peso
- ❖ El grupo alimentado con mieles ganaron menos masa grasa y perdieron menos masa magra comparados con sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa.
- ❖ Las ratas que consumieron sacarosa y jarabe de maíz presentan intolerancia a la glucosa, contrario a las mieles que son similares al grupo control
- ❖ Los niveles de leptina e insulina tienen una tendencia a ser mayores para los grupos alimentados con sacarosa y jarabe de maíz y menores en las mieles
- ❖ Los niveles de lipopolisacárido de las ratas alimentadas con mieles son similares al grupo control, mientras que las que consumieron sacarosa o JMHF presentan una endotoxemia metabólica.
- ❖ Se presentó un aumento en la abundancia de *DeFluviitalea Sacharophila* en los grupos alimentados con mieles y una disminución en los grupos de sacarosa y jarabe de maíz.
- ❖ La miel tiene un efecto antiinflamatorio dado que disminuye proteínas como TLR4, NF- $\kappa$  $\beta$  y aumenta butirato.

## IX. PERSPECTIVAS

- Considerando que los resultados muestran que las mieles poseen actividad antimicrobiana y la presencia de la enzima glucosa oxidasa añadida por las abejas produce como producto intermediario peróxido de hidrogeno, es recomendable medir la concentración de este compuesto en las mieles.
- Determinar el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa, así como el tipo de polifenoles presentes en los tratamientos, para determinar la influencia de los monosacáridos y disacáridos en los efectos presentados.
- Dado que las mieles poseen actividad antioxidante, determinar su efecto sobre las enzimas antioxidantes.
- Fundamentado en que los resultados presentados muestran que las ratas tratadas con sacarosa o jarabe de maíz alto en fructosa inducen intolerancia a la glucosa, dilucidar el mecanismo implicado en este fenómeno, estudiando la señalización de la insulina.
- Determinar el efecto de los tratamientos sobre los marcadores de inflamación en tejido adiposo.
- Determinar a través de un análisis PICRUST, el potencial genético funcional de la microbiota intestinal, después del consumo de los edulcorantes.

## X. REFERENCIAS

- Aagaard, K., Ma, J., Kathleen, M. A., Ganu, R., Petrosino, J., Versalovic, J., & Versalovic, J. (2016). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med*, 6(237), 1–22. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>.
- Ahmed, Hoekstra, Hage, & Karim. (2003). Honey-medicated dressing: Transformation of an ancient remedy into modern therapy. *Annals of Plastic Surgery*, 50(2), 143–147. <https://doi.org/10.1097/01.SAP.0000032306.44107.C1>
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N., & Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
- Al-waili, N. S. (2004). Natural Honey Lowers Plasma Glucose, C-Reactive Protein, Homocysteine, and Blood Lipids in Healthy, Diabetic, and Hyperlipidemic Subjects: Comparison with Dextrose and Sucrose. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 100–107. All Papers/A/Al-waili 2004 - Comparison with Dextrose and Sucrose.pdf
- Al-Waili, N. S. (2004). Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *Journal of Medicinal Food*, 7(2), 210–222. <https://doi.org/10.1089/1096620041224139>
- Almasaudi, S. B., El-Shitany, N. A., Abbas, A. T., Abdel-Dayem, U. A., Ali, S. S., Al Jaouni, S. K., & Harakeh, S. (2016). Antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer potential of manuka honey against gastric ulcer in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3643824>
- Alnaqdy, A., Al-Jabri, A., Al Mahrooqi, Z., Nzeako, B., & Nsanze, H. (2005). Inhibition effect of honey on the adherence of Salmonella to intestinal epithelial cells in vitro. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3),

- 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.042>
- Alvarez-Suarez, J. M. (2017). Bee products - chemical and biological properties. In *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1>
- Alzahrani, H. A., Boukraa, L., Bellik, Y., Abdellah, F., Bakhotmah, B. A., Kolayli, S., & Sahin, H. (2012). Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of honey from different botanical and geographical origins. *Global Journal of Health Science*, 4(6), 191–196. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v4n6p191>
- Assil, H. I., Sterling, R., & Sporns, P. (1991). Crystal Control In Processed Liquid Honey. *Journal of Food Science*, 56(4), 1034–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb14635.x>
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489–501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>
- Beretta, G., Orioli, M., & Facino, R. M. (2007). Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Medica*, 73(11), 1182–1189. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981598>
- Bocarsly, M. E., Powell, E. S., Avena, N. M., & Hoebel, B. G. (2010). High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(1), 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.02.012>
- Cani, Amar, Iglesias, Poggi, Knauf, Bastelica, & Burcelin. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 56(July), 386–389. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00332-9>
- Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., & Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*, 3(4), 279–288. <https://doi.org/10.4161/gmic.19625>
- Cani, P., & Delzenne, N. (2009). The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Current Pharmaceutical Design*,

- 15(13), 1546–1558. <https://doi.org/10.2174/138161209788168164>
- Cannon. (1921). *The Effects of Diet on the Intestinal Flora*. 29(4), 369–385.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., Mcdonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Cavalcante-Silva, L. H. A., Galvão, J. G. F. M., da Silva, J. S. de F., de Sales-Neto, J. M., & Rodrigues-Mascarenhas, S. (2015). Obesity-driven gut microbiota inflammatory pathways to metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*, 6(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00341>
- Chambers, E. S., Preston, T., Frost, G., & Morrison, D. J. (2018). Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Current Nutrition Reports*, 7(4), 198–206. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0248-8>
- Chepulis, L., & Starkey, N. (2008). The long-term effects of feeding honey compared with sucrose and a sugar-free diet on weight gain, lipid profiles, and DEXA measurements in rats. *Journal of Food Science*, 73(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00592.x>
- Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Lamas, L. B., Flórez, S. M., Toyos, P. A., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 23(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Clarke, G., Sandhu, K. V., Griffin, B. T., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Hyland, N. P. (2019). Gut reactions: Breaking down xenobiotic–microbiome interactions. *Pharmacological Reviews*, 71(2), 198–224. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015768>

- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, 6(February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep23129>
- Crane. (1986). *The archeology of beekeeping*. minesota:Duckworth
- Crane, E., & Kirk Visscher, P. (2009). Honey. *Encyclopedia of Insects*, 459–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00130-2>
- Czipa, N., Borbély, M., & Kovács, B. (2008). The effect of geographical origin on the composition of honey. *Cereal Research Communications*, 36(SUPPL. 5), 1435–1438. <https://doi.org/10.1556/CRC.36.2008.Suppl.3>
- D'argenio, V. (2018). The prenatal microbiome: A new player for human health. *High-Throughput*, 7(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ht7040038>
- Davies, A. M. C. (1975). Amino acid analysis of honeys from eleven countries. *Journal of Apicultural Research*, 14(1), 29–39. <https://doi.org/10.1080/00218839.1975.11099798>
- Davies, A. M. C., & Harris, R. G. (1982). Free Amino Acid Analysis of Honeys from England and Wales: Application to the Determination of the Geographical Origin of Honeys. *Journal of Apicultural Research*, 21(3), 168–173. <https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100536>
- Deepak Kumar, N., Kalluru, R. S., Ahmed, S., Abhilashini, A., Jayaprakash, T., Garlapati, R., Sowmya, B., & Narasimha Reddy, K. (2014). Comparison of the antibacterial efficacy of manuka honey against E.faecalis and E.coli - An in vitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(8), 48–50. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9676.4738>
- Di Rienzi, S. C., & Britton, R. A. (2019). Adaptation of the Gut Microbiota to Modern Dietary Sugars and Sweeteners. *Advances in Nutrition*, 1–14. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz118>
- Do, M. H., Lee, E., Oh, M. J., Kim, Y., & Park, H. Y. (2018). High-glucose or fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. *Nutrients*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/nu10060761>

- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M., & Flint, H. J. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *11*(8), 2112–2122. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x>
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2012). Honey - A novel antidiabetic agent. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(6), 913–934. <https://doi.org/10.7150/ijbs.3697>
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, *149*, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.097>
- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *16*(6), 731–742. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2013.988>
- Fernandez, M. I., Pedron, T., Tournebize, R., Olivo-Marin, J. C., Sansonetti, P. J., & Phalipon, A. (2003). Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity*, *18*(6), 739–749. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00122-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00122-5)
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *9*(10), 577–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Thomas, E. L., & Bell, J. D.

- (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
- Gentile, C. L., & Weir, T. L. (2018). The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*, 362(6416), 776–780. <https://doi.org/10.1126/science.aau5812>
- Grabek-Lejko, D., & Tomczyk-Ulanowska, K. (2013). Phenolic content, antioxidant and antibacterial activity of selected natural sweeteners available on the Polish market. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(12), 1089–1096. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.824236>
- Guarner, F. (2007). Role of intestinal flora in health and disease. *Nutricion Hospitalaria*, 22(SUPPL. 2), 14–19.
- Heiman, M. L., & Greenway, F. L. (2016). A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *Molecular Metabolism*, 5(5), 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.02.005>
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y. Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F., & Wu, G. D. (2009). High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*, 137(5), 1716-1724.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.042>
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881–884. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>
- Huang, B., Fettweis, J. M., Brooks, J. P., Jefferson, K. K., & Buck, G. A. (2014). The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(4), 747–761. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.08.006>
- Hussein, S. Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S., & Mohd Yusof, Y. A. (2013). Gelam Honey Attenuates Carrageenan-Induced Rat Paw Inflammation via NF- $\kappa$ B Pathway. *PLoS ONE*, 8(8).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072365>

- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
- Inan, M. S., Rasoulpour, R. J., Yin, L., Hubbard, A. K., Rosenberg, D. W., & Giardina, C. (2000). The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-κB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*, 118(4), 724–734. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)70142-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(00)70142-9)
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jean-Prost, & Médori. (2007). *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena* (Mundi\_Prensa (ed.)).
- Joon Oh, K., Jung, H., Kim, G., Romero, R., & Yoon, B. H. (2011). Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., & Elinav, E. (2019). Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 742–753. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0256-8>
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Kumul, R. C., Ruiz, J. C. R., Vázquez, E. O., & Campos, M. R. S. (2015). Potencial antioxidante de la miel de melipona beecheii y su relación con la salud: Una revisión. *Nutricion Hospitalaria*, 32(4), 1432–1442. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9312>
- Leeming, E. R., Johnson, A. J., Spector, T. D., & Roy, C. I. L. (2019). Effect of diet on the gut microbiota: Rethinking intervention duration. *Nutrients*, 11(12), 1–28. <https://doi.org/10.3390/nu11122862>

- Lobionda, S., Sittipo, P., Kwon, H. Y., & Lee, Y. K. (2019). The role of gut microbiota in intestinal inflammation with respect to diet and extrinsic stressors. *Microorganisms*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080271>
- McDonald, D., Hyde, E., Debelius, J. W., Morton, J. T., Gonzalez, A., Ackermann, G., Aksenov, A. A., Behsaz, B., Brennan, C., Chen, Y., DeRight Goldasich, L., Dorrestein, P. C., Dunn, R. R., Fahimipour, A. K., Gaffney, J., Gilbert, J. A., Gogul, G., Green, J. L., Hugenholtz, P., ... Goldasich, D. L. (2018). An Open Platform for Citizen Science Microbiome Research. *MSystems*, 3(3), 1–28. <http://humanfoodproject.com/>
- Montalto, M., D'Onofrio, F., Gallo, A., Cazzato, A., & Gasbarrini, G. (2009). Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3(2), 30–34. [https://doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60016-4](https://doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60016-4)
- Moszal, M., Szulinska, M., & Bgdanski, P. (2020). You Are What You Eat — The Relationship between. *Nutrients*, 12(4), 1–30.
- Moussa, A., Nouredine, D., Saad, A., Abdelmelek, M., & Abdelkader, B. (2012). Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(7), 554–557. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60096-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60096-3)
- Münstedt, K., Sheybani, B., Hauenschild, A., Brüggmann, D., Bretzel, R. G., & Winter, D. (2008). Effects of basswood honey, honey-comparable glucose-fructose solution, and oral glucose tolerance test solution on serum insulin, glucose, and C-peptide concentrations in healthy subjects. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 424–428. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0608>
- Nayik, G. A., Shah, T. R., Muzaffar, K., Wani, S. A., Gull, A., Majid, I., & Bhat, F. M. (2014). Honey: its history and religious significance: a review. *Universal Journal Pharmacy*, 3(1), 5–8.
- Ngkelo, A., Meja, K., Yeadon, M., Adcock, I., & Kirkham, P. A. (2012). LPS

- induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G $\alpha$  dependent PI-3kinase signalling. *Journal of Inflammation*, 9, 2–8. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-1>
- Panda, S., El Khader, I., Casellas, F., López Vivancos, J., García Cors, M., Santiago, A., Cuenca, S., Guarner, F., & Manichanh, C. (2014). Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095476>
- Postler, T. S., & Ghosh, S. (2017). Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metabolism*, 26(1), 110–130. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.008>
- Ramli, N. Z., Chin, K. Y., Zarkasi, K. A., & Ahmad, F. (2018). A review on the protective effects of honey against metabolic syndrome. *Nutrients*, 10(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu10081009>
- Ramli, N. Z., Chin, K. Y., Zarkasi, K. A., & Ahmad, F. (2019). The beneficial effects of stingless bee honey from *Heterotrigona itama* against metabolic changes in rats fed with high-carbohydrate and high-fat diet. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(24), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph16244987>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Rodríguez, B. A., Mendoza, S., Iturriga, M. H., & Castaño-Tostado, E. (2012). Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *Journal of Food Science*, 77(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02487.x>
- Rosas-Villegas, A., Sánchez-Tapia, M., Avila-Nava, A., Ramírez, V., Tovar, A. R., & Torres, N. (2017). Differential effect of sucrose and fructose in combination with a high fat diet on intestinal microbiota and kidney oxidative stress. *Nutrients*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/nu9040393>

- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- Salguero, M., Al-Obaide, M., Singh, R., Siepmann, T., & Vasylyeva, T. (2019). Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3461–3469. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7943>
- Schubert, A. M., Sinani, H., & Schloss, P. D. (2015). Antibiotic-induced alterations of the murine gut microbiota and subsequent effects on colonization resistance against *Clostridium difficile*. *MBio*, 6(4), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00974-15>
- Shen, Z. H., Zhu, C. X., Quan, Y. S., Yang, Z. Y., Wu, S., Luo, W. W., Tan, B., & Wang, X. Y. (2018). Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, 24(1), 5–14. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.5>
- Singh, I., & Singh, S. (2018). Honey moisture reduction and its quality. *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 3861–3871. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3341-5>
- Soto-Muciño, L. E., Elizarras-Baena, R., & Soto-Muciño, I. (2017). Situación apícola en México y perspectiva de la producción de miel en el Estado de Veracruz. *Revista de Estrategias Del Desarrollo Empresarial*, 3(7), 40–64.
- Steinert, R. E., Lee, Y. K., & Sybesma, W. (2020). Vitamins for the Gut Microbiome. *Trends in Molecular Medicine*, 26(2), 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.11.005>
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., & Gordon, J. I. (2009). Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine*, 1(6), 1–19. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>.The

- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., & Li, L. (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, 3(1), 71–82. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008>
- White, J. W. (1978). Honey. *Advances in Food Research*, 24(C), 287–374. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60160-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3)
- Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. A. (2005). Short Communication Antibacterial Activity of 13 Honeys Against. *Journal Of Applied Bacteriology*, 8(1), 100–103.
- Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. Bin. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7493–7519. <https://doi.org/10.3390/ijms16047493>
- Zmora, N., Suez, J., & Elinav, E. (2019). You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(1), 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>