



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE *LEUCONOSTOC MENTEROIDES* P45  
AISLADA DE PULQUE, COMO MODULADOR DE ALTERACIONES  
METABÓLICAS EN RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN  
GRASA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ERANDI AKETZALLI SERRANO CARBAJAL**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. SOFÍA MORÁN RAMOS**



**Ciudad Univesitaria, Cd.Mx., 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** M. en C. Lucía Cornejo Barrera  
**VOCAL:** Dr. José Adelfo Escalante Lozada  
**SECRETARIO:** Dra. Sofía Morán Ramos  
**1er. SUPLENTE:** M. en C. Tania Sierra Gómez  
**2° SUPLENTE:** Dr. Alberto Ortega Vázquez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE GENÓMICA DE POBLACIONES APLICADA A LA SALUD, INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. SOFÍA MORÁN RAMOS**

**SUSTENTANTE:**

**ERANDI AKETZALLI SERRANO CARBAJAL**

# Índice

Resumen .....	1
1. Introducción.....	3
2. Microbiota intestinal.....	4
2.1. Funciones de la microbiota intestinal.....	5
2.2. Disbiosis.....	5
2.3. Relación de la microbiota intestinal con alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. ....	6
2.3.1. Resistencia a la insulina.....	6
2.3.2. Hígado graso no alcohólico (HGNA).....	6
3. Probióticos.....	7
3.1. Mecanismos de acción de los probióticos.....	8
3.1.1. Inhibición de patógenos.....	8
3.1.2. Mecanismo de función de barrera intestinal. ....	9
3.1.3. Modulación de la respuesta inmune. ....	10
3.1.4. Modulación del metabolismo del hospedero .....	11
3.2. Probióticos y alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. ....	12
3.2.1. Probióticos e hígado graso no alcohólico (HGNA).....	13
3.3. Fuentes de probióticos .....	14
4. Pulque.....	14
5. Características del género <i>Leuconostoc</i> .....	15
5.1. Capacidad probiótica de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> aislada de pulque.....	16
6. Modelos animales en dietas altas en grasa.....	17

<b>Justificación</b> .....	<b>18</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>20</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>20</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>21</b>
<b>Preparación de cultivo.</b> .....	<b>21</b>
<b>Diseño del estudio</b> .....	<b>22</b>
<b>Formación de grupos de estudio</b> .....	<b>22</b>
<b>Obtención de muestras fecales.</b> .....	<b>24</b>
<b>Curva de tolerancia oral a la glucosa (OGTT).</b> .....	<b>24</b>
<b>Obtención de suero, grasa abdominal, hígado e intestino grueso</b> .....	<b>24</b>
<b>Porcentaje de adiposidad</b> .....	<b>25</b>
<b>Análisis de parámetros bioquímicos en suero.</b> .....	<b>25</b>
<b>Cálculo del índice HOMA-IR</b> .....	<b>25</b>
<b>Contenido de lípidos en hígado</b> .....	<b>25</b>
<b>Extracción de RNA total de colon.</b> .....	<b>26</b>
<b>Reacción en cadena de la polimerasa- Transcripción reversa (RT-PCR)</b> .....	<b>26</b>
<b>Expresión génica de citocinas proinflamatorias</b> .....	<b>27</b>
<b>Extracción de ADN de muestras fecales</b> .....	<b>28</b>
<b>Amplificación por PCR tiempo real.</b> .....	<b>29</b>
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>29</b>

<b>Resultados .....</b>	<b>30</b>
<b>Ganancia de peso y consumo de alimento .....</b>	<b>30</b>
<b>Efecto en la homeostasis de glucosa .....</b>	<b>33</b>
<b>Efecto sobre los lípidos en sangre.....</b>	<b>36</b>
<b>Lípidos en hígado .....</b>	<b>37</b>
<b>Inflamación en colon. ....</b>	<b>38</b>
<b>Presencia de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> P45. ....</b>	<b>40</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>46</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>47</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>48</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Valores de los nutrimentos e ingredientes que componen la dieta control [10 % de grasa (kcal)] en gramos y en porcentaje de kilocalorías..... 23

Tabla 2. Valores de los nutrimentos e ingredientes que componen la dieta alta en grasa [60 % de grasa (kcal)] en gramos y en porcentaje de kilocalorías .... 23

Tabla 3. Volumen de los reactivos empleados para la transcripción reversa ... 27

Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para la expresión de ARNm. . 27

## Índice de figuras

Figura 1. Preparación del cultivo de L. mesenteroides P45. ....	21
Figura 2. Diseño del estudio.....	23
Figura 3. a) Peso total durante las 6 semanas. b) Ganancia de peso total.. ....	30
Figura 4. a) Consumo de alimento por día (g). b) Consumo de alimento acumulado (kcal). c) Consumo de alimento total (kcal).....	31
Figura 5. Porcentaje de adiposidad.....	32
Figura 6. a) Curva de tolerancia oral a la glucosa. b) Área bajo la curva. c) Concentración de glucosa en suero en ayuno, posterior al sacrificio. d) Concentración de insulina en suero. ....	34
Figura 7. Índice HOMA-IR. ....	35
Figura 8. a) Concentración de colesterol total en suero. b) Concentración de triglicéridos en suero. ....	36
Figura 9. Peso relativo del hígado.....	37
Figura 10. Concentración en hígado de a) triglicéridos y b) colesterol.....	38
Figura 11. Longitud del colon entre los grupos.....	39
Figura 12. Expresión de la citocina IL-1 $\beta$ . ....	39

Figura 13. Concentración de bacterias de *L. mesenteroides* en las heces de  
ratón. .... 40

## Resumen

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que desencadena comorbilidades como resistencia a la insulina, esteatosis hepática y enfermedades cardiovasculares. El consumo de dietas altas en grasa promueve el aumento de adiposidad, niveles elevados de triglicéridos y colesterol en sangre, que a su vez conlleva al desarrollo de alteraciones metabólicas que producen obesidad y sus consecuentes complicaciones.

La microbiota intestinal, junto con la dieta, interviene en el desarrollo de la obesidad y subsecuentes comorbilidades, de tal modo, la modulación de la microbiota intestinal se ha propuesto como blanco para la prevención de anomalías metabólicas. Diversos estudios han encontrado que microorganismos probióticos con capacidad de inhibir patógenos, mejoran parámetros metabólicos en ratones obesos resistentes a leptina y con diabetes mellitus tipo 2, y que estas mejoras correlacionan con la abundancia y la diversidad de diferentes taxones microbianos (Everard *et al.*, 2014)

Los alimentos fermentados tanto de origen lácteo como vegetal han sido tradicionalmente usados para la identificación de cepas probióticas. En este sentido el Dr. Escalante y colaboradores caracterizaron la diversidad microbiana presente en el pulque, una bebida alcohólica tradicional mexicana elaborada a partir del aguamiel extraído de diferentes especies de agave. Esta caracterización mostró que *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc mesenteroides* son los microorganismos con mayor abundancia en esta bebida (Escalante *et al.*, 2004). Estudios posteriores probaron la capacidad probiótica de algunas cepas de estos microorganismos, entre las que destacó *Leuconostoc mesenteroides* P45 (Campos 2010; Giles-Gómez *et al.*, 2016).

La cepa P45 de *L. mesenteroides* presentó propiedades probióticas *in vitro* de supervivencia en medios ácidos y en altas concentraciones de sales biliares, actividad antimicrobiana contra patógenos, crecimiento abundante en cultivo (Campos, 2010), producción de exopolisacárido con posible capacidad

antimicrobiana y adhesión celular (Cerón, 2014); e *in vivo* de reducir las células patógenas de una infección por *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium (Matus, 2011; Giles-Gómez *et al.*, 2016). Por ello en este estudio se probó el efecto probiótico de *L. mesenteroides* P45 en un modelo murino alimentado con dieta alta en grasa (60 % de grasa en kcal).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración de *L. mesenteroides* P45 sobre rasgos metabólicos en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Para esto, se realizó la comparación entre 4 grupos con diferentes tratamientos. El primero grupo se nombró “control”, el cual se alimentó con una dieta baja en grasa (10 % de grasa en kcal); el segundo grupo denominado “HFD”, se alimentó con una dieta alta en grasa (60 % de grasa en kcal); el tercer y cuarto grupo se alimentaron con dieta alta en grasa y se les administró un cultivo de *L. mesenteroides* P45; para el tercer grupo, nombrado “HF-PF”, el cultivo se administró en fresco, mientras que al cuarto grupo llamado “HF-PC” se administró un cultivo congelado. Durante las 6 semanas de estudio se midió la ganancia de peso, y al término del estudio se midieron la concentración de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos en suero, así como el contenido de colesterol y triglicéridos en hígado. Además, se midió la expresión génica de algunas citocinas proinflamatorias en colon.

Los resultados no evidenciaron cambios significativos en el grupo HFD en comparación con el grupo control, en ninguno de los parámetros medidos; sin embargo, el grupo HF-PF al que se administró el probiótico fresco presentó mayor ganancia de peso y alteraciones en la homeostasis de glucosa y de colesterol sérico. Esto sugiere que contrario a nuestra hipótesis la administración de *L. mesenteroides* P45, junto con una dieta alta en grasa podría acelerar la ganancia de peso y así el desarrollo de alteraciones metabólicas.

## 1. Introducción

La obesidad es la enfermedad no transmisible más prevalente en el mundo, siendo México uno de los países más afectados por este padecimiento. En 2014, la prevalencia mundial de esta enfermedad fue aproximadamente del 13% (OMS, 2016), mientras que, en 2012 a nivel nacional, ya era superior al 32% (ENSANUT, 2012).

La obesidad involucra una interacción entre factores genéticos, ambientales, neurales, endocrinos, hábitos dietarios y de actividad física que causan un balance energético positivo, produciendo una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2016). Esto incrementa el riesgo de discapacidad funcional y produce alteraciones metabólicas que pueden desencadenar enfermedades crónico degenerativas, como enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2 que a su vez reducen la calidad de vida (Shoelson *et al.*, 2007).

La dieta es uno de los factores más relevantes en el desarrollo de obesidad, por ejemplo el consumo de dietas altas en grasa provoca resistencia a la insulina, que consecuentemente se ve reflejado en un aumento anormal en los niveles de lípidos en suero, que perjudica la regulación del peso corporal, y que puede ocasionar hiperglicemia e hiperlipidemia (Kim *et al.* 2012; Cani *et al.*, 2007).

Además, cuando se incrementa el consumo de grasa, la acumulación de ácidos grasos en el hígado, células adiposas, páncreas y músculo esquelético interfiere en el funcionamiento normal de la insulina. En el tejido adiposo la acumulación excesiva de lípidos, puede contribuir a la disfunción del adipocito, dando lugar a un incremento de la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo y citocinas proinflamatorias, que contribuyen a la resistencia a la insulina local y sistémica (Shoelson *et al.*, 2007; Barrientos Alvarado, 2010).

La resistencia a la insulina en hígado promueve, a su vez, una acumulación de triglicéridos en el tejido hepático, ocasionando la enfermedad conocida como hígado graso no alcohólico. El desarrollo de esta enfermedad a estadios más

severos desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias y ocasiona un daño en los hepatocitos (Mohammadmoradi *et al.* 2014).

En años recientes, se ha considerado a la microbiota intestinal como un factor ambiental importante que influye en el desarrollo de la obesidad. Esto es debido a que existen estudios que demuestran la capacidad de la microbiota intestinal para extraer energía de la dieta a partir de polisacáridos no hidrolizables por enzimas humanas, y su contribución en la regulación del almacenamiento de lípidos mediante la modulación de genes del hospedero, entre otros mecanismos descritos (Bäckhed *et al.*, 2007). Además, ciertos cambios en la composición y función de la microbiota intestinal provocan un desbalance que se asocia con mayor permeabilidad intestinal induciendo alteraciones en el metabolismo del hospedero (Cani *et al.*, 2007).

## **2. Microbiota intestinal**

El tracto gastrointestinal humano se encuentra colonizado por alrededor de  $10^{14}$  microorganismos que en conjunto se denominan microbiota intestinal. Esta se encuentra compuesta por bacterias, arqueas, levaduras, virus y protozoarios, de más de 500 especies diferentes (Mowat & Agace, 2014). En animales y humanos las filas bacterianas dominantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, que conforman el 90 % de la microbiota intestinal (Delzenne & Cani, 2011; Turnbaugh *et al.*, 2008).

Se ha descrito que la composición de la microbiota intestinal está influenciada por factores ambientales como la forma de nacimiento, la localización geográfica y los hábitos dietarios, entre otros (Fuller, 1989). La dieta se considera uno de los factores más influyentes en la composición de la microbiota intestinal, ya que estudios en humanos y modelos animales han mostrado que cambiar de una dieta normal a una dieta alta en grasa, modifica profundamente la estructura de la microbiota (Tilg & Kaser, 2011).

## 2.1. Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal presenta múltiples funciones, entre las que destacan la defensa contra patógenos, la respuesta inmune, disminución del pH, aumento de la motilidad intestinal, síntesis de vitaminas y la extracción de energía de la dieta. Esta última, se da por la hidrólisis y fermentación de polisacáridos dietarios que producen monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta, como acetato, propionato y butirato, metabolitos empleados como recursos energéticos por otras bacterias y/o el hospedero (Everard & Cani, 2013; Turnbaugh *et al.*, 2006; Hajela *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2013). Además la microbiota intestinal interactúa con el hospedero a diferentes niveles que van desde la modulación de la expresión de genes, hasta el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo, el metabolismo de sales biliares y el metabolismo de glucosa entre otros (Neish 2009; Zhu *et al.*, 2015).

Este efecto simbiótico contribuye a un óptimo funcionamiento en el organismo sin embargo en condiciones desfavorables la microbiota intestinal puede presentar un desbalance conocido como disbiosis (Neish, 2009).

## 2.2. Disbiosis

La disbiosis es el resultado de alteraciones en la composición y/o función de la microbiota intestinal que modifican las interacciones con el hospedero. La disbiosis está asociada al desarrollo de alteraciones y enfermedades metabólicas tales como la resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2, así como enfermedades intestinales agudas y crónicas (de Almada *et al.*, 2015; Tojo, 2014)

Aunque los mecanismos son muy diversos, se sugiere que a consecuencia de la disbiosis, la función de barrera intestinal se daña permitiendo el tránsito tanto de metabolitos y componentes bacterianos, como de bacterias del intestino al torrente sanguíneo. Esto puede producir un estado de inflamación local y sistémico, de bajo grado que se denomina endotoxemia metabólica (Everard & Cani, 2013; Brun *et al.*, 2007; Luche *et al.*, 2013)).

## **2.3. Relación de la microbiota intestinal con alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.**

La endotoxemia metabólica puede contribuir tanto a la obesidad como a alteraciones asociadas a la misma. La inflamación de bajo grado presente en este estado contribuye a hiperplasia en adipocitos, disminución de la función de las células  $\beta$  y resistencia a la insulina (Cani & Delzenne, 2009).

### **2.3.1. Resistencia a la insulina.**

La resistencia a la insulina es la principal alteración ocasionada por la endotoxemia metabólica, que a su vez se asocia con otros desórdenes metabólicos.

Un aumento de LPS en el torrente sanguíneo estimula la secreción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6). Esta sobreexpresión de citocinas actúa perjudicialmente sobre la acción de la insulina. Específicamente a través de la inactivación de los receptores de insulina dirigida por TNF- $\alpha$ , originando así la resistencia a la insulina (Cani *et al.*, 2007). Esta resistencia a la insulina ocasiona una hiperinsulinemia y mayor almacenamiento en tejido graso e hígado (Cani *et al.*, 2007).

### **2.3.2. Hígado graso no alcohólico (HGNA).**

En el contexto de obesidad y dietas altas en grasa, en donde existe una acumulación de grasa en el hígado, la aparición de endotoxemia metabólica puede acelerar la progresión de la enfermedad.

El hígado es irrigado, en gran parte, por sangre proveniente del intestino, por lo cual, las endotoxinas derivadas del intestino activan en hígado vías inflamatorias que estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno, contribuyendo así al estrés oxidante y posiblemente a la evolución de hígado graso a esteatohepatitis (Farhadi *et al.*, 2008; Aron-Wisnewsky *et al.*, 2013). Otro mecanismo por el cual la disbiosis puede contribuir a la fisiopatología del hígado graso es a través de la producción de metabolitos tóxicos, como el

etanol producido por *Escherichia coli* (Förster & Gescher, 2014) y la trimetil amina, ambas producidas por la microbiota intestinal (Aron-Wisnewsky *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). La liberación de estos metabolitos al hígado activa al sistema inmune lo que desemboca en inflamación. A parte, el etanol se transforma principalmente en acetato y acetaldehído. El primero funciona como sustrato para la síntesis de ácidos grasos, y el segundo probablemente activa la producción de especies reactivas de oxígeno (Cesaro *et al.*, 2010; Aron-Wisnewsky *et al.*, 2013).

Debido a la participación de la disbiosis en el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas, se ha propuesto la modulación de la composición de la microbiota con el fin de prevenir la aparición y/o ayudar al tratamiento de estas enfermedades. Las bacterias ácido lácticas presentes en el tracto gastrointestinal pueden promover un efecto benéfico en la salud, por ello, se ha planteado el uso de algunas especies como probióticos (Andersson *et al.*, 2010).

### **3. Probióticos**

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en dosis adecuadas proporcionan beneficios a la salud del hospedero (FAO/WHO, 2001). Entre los efectos que han demostrado tener, se encuentran mejoras en el sistema inmunológico, digestivo y respiratorio, propiedades antioxidantes y protección contra patógenos gastrointestinales (Mohammadmoradi *et al.*, 2013; Hirayama & Rafter, 2000). De manera interesante estudios recientes muestran que algunas cepas probióticas confieren también, un efecto positivo en alteraciones metabólicas (Kirpich & McClain, 2012; Sanz *et al.*, 2013)

Para que un microorganismo pueda considerarse como probiótico requiere presentar algunas de las características que se describen a continuación.

- No patógenos y no tóxicos (Castro-Rodríguez *et al.*, 2015). Los microorganismos administrados como probióticos no deben causar daño alguno al individuo que los ingiera

- Poseer estatus GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro, por sus siglas en inglés) (Collins *et al.*, 1998).
- Resistencia a sales biliares, ácido gástrico y enzimas pancreáticas. La bacteria debe ser capaz de viajar a través del tracto gastrointestinal y permanecer viable hasta llegar al intestino, conservando la integridad de las células epiteliales y manteniendo su actividad metabólica (Ouwehand *et al.*, 1999; Pfeiler & Klaenhammer, 2007)
- Capacidad de adherencia al epitelio intestinal y proliferación en el intestino. Permite la colonización del probiótico en el intestino, para ejercer su efecto benéfico
- Producción de bacteriocinas y otras enzimas como hidrolasas. Estos péptidos presentan un efecto antimicrobiano, que protege contra patógenos.
- Producción de compuestos antimicrobianos como ácido láctico o peróxido de hidrógeno

### **3.1. Mecanismos de acción de los probióticos**

Los probióticos ejercen su efecto interactuando directamente con el hospedero o promoviendo cambios en la microbiota intestinal, mediante diversos mecanismos

#### **3.1.1. Inhibición de patógenos**

Algunas bacterias empleadas como probióticos son capaces de modificar la composición de la microbiota intestinal por medio de la secreción de compuestos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, etanol y bacteriocinas. La producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico, disminuyen el pH en el intestino inhibiendo el crecimiento de bacterias sensibles a medios ácidos y permea la membrana externa de bacterias Gram negativas (Drosinos *et al.*, 2006; Wohlgemuth *et al.*, 2010). Quizás el producto bacteriano mayormente estudiado son las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos que actúan sobre bacterias cercanamente relacionadas permeando la membrana de estas o interfiriendo en la función de enzimas esenciales (Bierbaum & Sahl, 2009).

Finalmente mediante la adhesión al epitelio intestinal, confiere una ventaja competitiva de las bacterias benéficas disminuyendo así el área en donde patógenos pudiesen adherirse (Kos *et al.*, 2003). Tal es el caso de algunas cepas de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* y *L. paracasei*) que colonizan la mucosa intestinal durante el tiempo de administración inhiben la adherencia y por ende la acción de bacterias patógenas (Spiller, 2008)

### **3.1.2. Mecanismo de función de barrera intestinal.**

El epitelio intestinal es una barrera que permite la entrada de nutrimentos, iones y agua entre otros componentes presentes en el lumen, e impide el paso de elementos dañinos como bacterias y sus productos (Vajro *et al.*, 2013). El mantenimiento de esta barrera esta mediado por las proteínas en las uniones estrechas y las uniones adherentes como ocludinas, claudinas y cadherinas, que permiten sellar los espacios entre células adyacentes. Además está protegida por una capa mucosa que contiene glicoproteínas llamadas mucinas que son tóxicas para algunas bacterias. La deficiencia de esta capa mucosa provoca que bacterias comensales y/o patógenas, así como sus productos, entren en contacto directo con el epitelio, provocando la ruptura de la barrera intestinal y la activación de la respuesta inmune que desemboca en inflamación (Mowat & Agace, 2014; Le Barz *et al.*, 2015).

Los probióticos regulan la permeabilidad intestinal induciendo una mayor síntesis de las proteínas presentes en las uniones estrechas y adherentes entre los enterocitos, y producen exopolisacáridos que aumentan la mucosa epitelial lo que fortalece la función de barrera intestinal (Bron *et al.*, 2011; Reiff & Kelly, 2010).

### 3.1.3. Modulación de la respuesta inmune.

El sistema inmune es esencial para la homeostasis intestinal. La microbiota intestinal modula el sistema inmune a través de la activación de receptores tipo Toll (TLR's, por sus siglas en inglés), que inducen la proliferación de células intestinales, expresión de péptidos antimicrobianos, recambio epitelial, fortalecimiento de uniones estrechas y mantenimiento del intestino (Hooper & Macpherson, 2015; Xu *et al.*, 2013). Además, algunas bacterias comensales estimulan la secreción de citocinas antiinflamatorias, como interleucina 10 (IL-10), o inhiben vías de señalización proinflamatorias (Kelly *et al.*, 2005; Oelschlaeger, 2010; Xu *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente cuando la función de barrera intestinal se encuentra dañada, existe una interacción directa entre patrones moleculares como lipopolisacárido (LPS), flagelina, ácido lipoteicoico y peptidoglucano de bacterias patógenas o comensales y el epitelio intestinal. Estos patrones, reconocidos por los TLR's promueven la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que a su vez induce producción de citocinas proinflamatorias como TNF-alfa, IL-1 $\beta$  e IL-6 entre otras, tanto a nivel intestinal como sistémico (Duseja & Chawla, 2014; O'Hara & Shanahan, 2007). En el contexto de la obesidad, las citocinas secretadas a nivel sistémico contribuyen a la inflamación crónica de bajo grado en el tejido adiposo, el páncreas y el hígado lo que puede contribuir al desarrollo de alteraciones metabólicas en el hospedero.

Los probióticos mimetizan el comportamiento de la microbiota endógena, aprovechando así, la interacción entre el hospedero y dicha microbiota. Se ha sugerido que los probióticos intervienen en las vías de señalización de NF- $\kappa$ B, por ejemplo, *Lactobacillus reuteri* produce moléculas que inhiben la activación de NF- $\kappa$ B evitando así, la liberación de citocinas proinflamatorias (Ma *et al.*, 2004; O'Hara & Shanahan, 2007). Otro mecanismo involucra el reconocimiento de ácido lipoteicoico, un componente de bacterias como *L. plantarum*, por medio de TLR's que estimulan la secreción de la citocina antiinflamatoria IL-10 (O'Hara & Shanahan, 2007; Grangette *et al.*, 2005).

### **3.1.4. Modulación del metabolismo del hospedero**

Los probióticos tienen la capacidad de activar o inhibir enzimas, factores de transcripción u otras proteínas asociadas al metabolismo del hospedero, dando como resultado la modulación de vías metabólicas involucradas en la homeostasis de glucosa y de lípidos. Aunque el uso más común de los probióticos ha sido para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, en los últimos años han emergido como posible coadyuvantes en el tratamiento y la prevención de enfermedades metabólicas. Es importante mencionar que las funciones de los probióticos son muy diversas y dependerán de las propiedades específicas de cada cepa (Matus, 2010), por lo que es muy importante estudiar minuciosamente la capacidad probiótica de cada de estas.

#### ***3.1.4.1. Disminución de niveles séricos de colesterol***

Los ácidos biliares son sintetizados a partir del colesterol en el hígado. Después de la conjugación a un péptido, estos son transportados a la vesícula biliar para posteriormente ser secretados al intestino delgado. Algunas bacterias presentes en el intestino, poseen la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH, por sus siglas en inglés), cuya función es la desconjugación de los mismos. Los ácidos biliares conjugados son reabsorbidos por los enterocitos y liberados al torrente sanguíneo para ser devueltos al hígado y comenzar nuevamente el ciclo. Sin embargo, los ácidos biliares desconjugados son menos solubles y no son reabsorbidos a la circulación por lo que pasan al colon para ser excretados en las heces (Begley *et al.*, 2005; Joyce & Gahan, 2016; Yoo & Kim, 2016). Algunas bacterias empleadas como probióticos que poseen la enzima BSH, inducen un aumento en la excreción de ácidos biliares que a su vez puede promover la reducción de colesterol sérico, debido al aumento de la demanda de colesterol para síntesis de novo de ácidos biliares (Nguyen *et al.*, 2007; Yoo & Kim, 2016).

#### **3.1.4.2. Homeostasis del metabolismo de glucosa.**

La glucosa es el principal recurso energético del cuerpo y proviene en parte, de la degradación de hidratos de carbono complejos presentes en los alimentos. Su absorción se da del intestino hacia la circulación portal y posteriormente al hígado, en donde se metaboliza o redistribuye a tejidos en donde existe un requerimiento energético (cerebro, tejido adiposo y músculo entre otros) (Inoue, 2015; Gerich, 2000)

Se ha reportado que algunos probióticos pueden mejorar la homeostasis de glucosa. Pese a que el mecanismo no se ha dilucidado completamente, algunos autores sugieren que los probióticos modifican la composición de la microbiota intestinal suprimiendo procesos inflamatorios que afectan la homeostasis de glucosa y además regulan hormonas intestinales relacionadas con el crecimiento y la supervivencia de las células  $\beta$ , siendo estas últimas responsables de la secreción de la insulina. (Firouzi *et al.*, 2013).

Por otro lado, probióticos como *L. casei* Shirota han mostrado la habilidad de modular el peso corporal en modelos animales de obesidad, sugiriendo que a través de este cambio podrían también influir en la homeostasis de glucosa (Naito *et al.*, 2011).

### **3.2. Probióticos y alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad**

Estudios recientes han demostrado que un desbalance en la composición de la microbiota intestinal incrementa la permeabilidad intestinal y el desarrollo de endotoxemia metabólica en ratones alimentados con dieta alta en grasa, lo que conduce a alteraciones metabólicas (Le Barz *et al.*, 2015).

En diferentes modelos murinos alimentados con dietas altas en grasa, se ha observado que cepas específicas de lactobacilos y bifidobacterias como *L. plantarum* KY1032, *L. curvatus*, HY7601 o *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis 420, contrarrestan el desarrollo de alteraciones metabólicas, disminuyendo la ganancia de peso corporal, la acumulación de masa grasa en tejido adiposo e hígado, niveles en plasma de glucosa, insulina, triglicéridos y

colesterol, y la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (Yoo *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Stenman *et al.*, 2014).

Además la disminución del contenido de lípidos en hígado por otras cepas de estos géneros bacterianos previene e incluso mejoran la enfermedad de HGNA (Ritze *et al.*, 2014).

### **3.2.1 Probióticos e hígado graso no alcohólico (HGNA)**

Los probióticos han mostrado prevenir o mejorar el desarrollo de HGNA principalmente mediante la reducción de inflamación. En ratones con obesidad y diabetes tipo 2, el nivel de citocinas proinflamatorias y marcadores de inflamación hepática disminuyó significativamente con la administración de *Saccharomyces boulardii*, asociando estas mejoras a un cambio en la composición de la microbiota intestinal (Everard *et al.*, 2014). En otros estudios, *Lactobacillus rhamnosus* GG incrementó la cantidad de bacterias benéficas y restauró la función de barrera intestinal en ratones, con lo que se atenúo la inflamación hepática (Ritze *et al.*, 2014), mientras que *L. casei* Shirota ha mostrado proteger contra el desarrollo de HGNA atenuando la cascada de señalización de TLR4 en el hígado de ratones alimentados con una dieta alta en fructosa (Wagnerberger *et al.*, 2013)

El probiótico más estudiado por sus efectos benéficos en la enfermedad de HGNA es el VSL#3. Contiene 8 cepas de bacterias ácido lácticas (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*) que individualmente han presentado efectos sobre el HGNA, directamente disminuyendo citocinas proinflamatorias y LPS, reduciendo niveles de enzimas hepáticas, atenuando la acumulación lipídica o indirectamente mejorando las funciones de barrera intestinal (Paoletta *et al.*, 2014; Plaza-Diaz *et al.*, 2014; Aller *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2015; Shima *et al.*, 2008)

Se sugiere que VSL#3 modula la fibrosis hepática que se presenta en la progresión de HGNA, mediante la modulación de la microbiota intestinal (Duseja & Chawla, 2014). En pacientes con esta enfermedad, VSL#3 mejoró el perfil de citocinas, el estrés oxidativo y las enzimas hepáticas (Loguercio *et al.*,

2005), mientras que en modelos animales con obesidad, redujo el contenido de ácidos grasos totales en hígado y los niveles séricos de enzimas relacionadas con daño hepático (Li *et al.*, 2003).

### **3.3. Fuentes de probióticos**

Hasta el momento, la mayoría de los probióticos son bacterias ácido-lácticas generalmente de origen humano y animal que pueden ser aisladas de productos lácteos como el yogurt o leches fermentadas (Kandylis *et al.*, 2016; Le Barz *et al.*, 2015). No obstante, existen probióticos aislados de sustratos vegetales que se presentan como una alternativa más económica a los productos lácteos.

El chucrut es un platillo elaborado con col fermentada, del cual se han aislado bacterias como *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* y otras bacterias ácido-lácticas con capacidad probiótica. Otros platillos de origen asiático como el kimchi elaborados mediante la fermentación de vegetales, también son fuente de cepas probióticas de las especies *L. mesenteroides* y *L. plantarum* entre otras (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

Además, las bebidas tradicionales fermentadas de extractos vegetales también contienen una gran diversidad de microorganismos que pueden tener efecto benéfico y potencial probiótico, tal es el caso del pulque (Escalante *et al.*, 2016; Socol *et al.*, 2012).

## **4. Pulque**

El pulque es una bebida alcohólica fermentada de origen mexicano producida a partir del aguamiel, que se extrae de diferentes especies de maguey (Escalante *et al.*, 2016; Torres-Rodríguez *et al.*, 2014)).

En épocas prehispánicas, se empleaba por sus cualidades medicinales con el fin de combatir trastornos y enfermedades del sistema digestivo, y por sus propiedades nutrimentales (García-Garibay & López-Munguía, 1993; Correa-

Ascencio *et al.*, 2014; Torres-Maravilla *et al.*, 2015; Escalante *et al.*, 2016). La civilización Azteca consideraba al pulque como un alimento divino, una medicina y un elemento ritual que permitía una relación más estrecha con su cosmología (Escalante *et al.*, 2016) estableciendo como norma el consumo de esta bebida únicamente a niños, jóvenes, viejos, mujeres embarazadas o en lactancia, sacerdotes, guerreros o personas que serían sacrificadas.

Para su elaboración, el aguamiel extraído del maguey se coloca en tinacales por algunas horas y hasta toda la noche para su fermentación, la cual se acelera mediante la adición de pulque producido con anterioridad. El proceso en general se realiza en condiciones no asépticas que permiten la inoculación de una amplia diversidad de microorganismos, los cuales son los responsables de las 3 etapas fermentativas que se presentan, fermentación ácida, alcohólica y producción de polisacáridos extracelulares (Escalante *et al.*, 2016), siendo *Lactobacillus* spp., *Zymomonas mobilis*, *L. mesenteroides* y *Saccharomyces cerevisiae* los microorganismos esenciales para la fermentación del pulque. En 2008, Escalante y colaboradores caracterizaron la microbiota presente en el pulque, encontrando una gran diversidad de bacterias ácido-lácticas entre las que destacan, por su abundancia, el género de *Lactobacillus* y la especie *L. mesenteroides* (Escalante *et al.*, 2008). Esta última especie ha sido de interés como posible probiótico debido a su presencia en materia vegetal, ya que la mayoría de los probióticos provienen de productos lácteos.

## **5. Características del género *Leuconostoc***

Las bacterias del género *Leuconostoc* son firmicutes con un alto porcentaje de guanina y citocina en su genoma. Este género se encuentra clasificado dentro del grupo de bacterias ácido lácticas heterofermentativas, las cuales producen mayoritariamente ácido láctico a partir de la fermentación de hidratos de carbono simples. Estas bacterias han sido detectadas en procesos fermentativos tradicionales desarrollados desde la antigüedad y actualmente se conoce que tienen un importante papel en la conservación de alimentos (Acatzi-Silva, 2012).

*Leuconostoc* es un género de bacterias en forma de cocos Gram positivos que miden de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, aerobias y anaerobias facultativas, no móviles, sin capacidad de formación de esporas y, catalasa y oxidasa negativas. Presenta características quimiorganótrofas por lo que requiere de aminoácidos y factores complejos para su crecimiento, así como un pH óptimo cercano a la neutralidad. Este microorganismo se encuentra en vegetales y suelo (Acatzi-Silva, 2012).

Por su naturaleza heterofermentativa, esta bacteria además de ácido láctico produce etanol, ácido acético, dióxido de carbono y en ocasiones ácido fórmico como productos finales de la fermentación. Por otro lado a partir de sacarosa es capaz de producir dextrana y fructana, dos exopolisacáridos sintetizados mediante las enzimas glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, respectivamente (Carr *et al.*, 2012). En el pulque, esta bacteria es la responsable de la viscosidad de la bebida, posiblemente por la producción de dextrana (Torres-rodríguez *et al.*, 2014; Escalante *et al.*, 2016)

## **5.1 Capacidad probiótica de *Leuconostoc mesenteroides* aislada de pulque**

Estudios *in vitro* de *L. mesenteroides* como probiótico, reportaron a una cepa de esta especie con propiedades de modulación del sistema inmune a través de la inducción de citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  y linfocitos Th1 (Kekkonen *et al.*, 2008).

El grupo del Dr. Escalante en estudios posteriores probó la capacidad probiótica de la cepa P45 de *L. mesenteroides* en la inhibición, *in vitro*, de 4 diferentes patógenos; *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Salmonella enterica* Typhimurium y *Salmonella enterica* Typhimurium. Además, *L. mesenteroides* P45 presentó resistencia a la exposición de lisozimas, sales biliares y condiciones ácidas (Campos, 2010; Giles-Gómez *et al.*, 2016; Escalante *et al.*, 2016).

En estudios *in vivo* la administración *L. mesenteroides* P45 en un modelo de ratón previo a la inducción de infección con *Salmonella enterica* serovar Typhi, mostró una disminución de la concentración del patógeno en bazo e hígado (Matus, 2011; Giles-Gómez *et al.*, 2016)).

## **6. Modelos animales en dietas altas en grasa.**

El consumo prolongado de una dieta alta en grasa, provoca un aumento de peso anormal, un incremento en la masa grasa, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y elevación de triglicéridos y colesterol en plasma comparado con el consumo de una dieta (Vickers *et al.*, 2011). Se sugiere que los componentes de este tipo de dietas producen una inflamación intestinal, que posiblemente sea la responsable del comienzo de la obesidad y demás alteraciones mencionadas (Kim *et al.*, 2012).

En particular, los modelos murinos de obesidad inducida con dieta alta en grasa son usados por las características fisiológicas similares que presentan con los seres humanos, la facilidad de manejo de estos roedores por su tamaño y la velocidad con que evolucionan las patologías.

La cepa de ratón más utilizada para inducir obesidad por dieta alta en grasa es la C57BL/6 debido a que exhibe alteraciones metabólicas similares a las humanas, siendo la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina las alteraciones que se asemejan mayormente a la progresión en humanos (Kanasaki & Koya, 2011).

Diversos estudios indican que la alimentación con dieta alta en grasa a roedores podría ser un buen modelo para realizar experimentación relacionada con el tratamiento de las alteraciones metabólicas que desarrollan la obesidad y que a su vez desencadena otras enfermedades (Collins *et al.*, 2004; Serino *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015).

## Justificación

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que desencadena alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina, esteatosis hepática y enfermedades cardiovasculares. En México, la obesidad tiene una alta prevalencia, se estimó que para el 2012 el porcentaje de personas obesas mayores de 20 años era de 32.4 % de acuerdo con datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012). Por ello es necesario hallar estrategias dietarias que ayuden a prevenir el desarrollo de obesidad y las enfermedades que con esta se relacionan.

En humanos y en modelos animales se ha observado que ciertos probióticos, útiles para tratar enfermedades gastrointestinales, además tienen efecto benéfico en la prevención y tratamiento de alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. Sin embargo, en México los probióticos para tratar alteraciones metabólicas aún son escasos. De tal modo que resulta de interés evaluar si los probióticos de fácil obtención en México podrían ser de utilidad para este tipo de enfermedades.

*L. mesenteroides* P45, una bacteria con potencial probiótico aislado de pulque, es capaz de inhibir ciertos patógenos en el tracto gastrointestinal, sin embargo, su efecto en el desarrollo de alteraciones metabólicas aún no ha sido evaluado.

## Hipótesis

La administración de *Leuconostoc mesenteroides* cepa P45 en ratones alimentados con una dieta alta en grasa será capaz de prevenir el desarrollo de alteraciones metabólicas como, resistencia a la insulina y acumulación de lípidos, en hígado.

## Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de *Leuconostoc mesenteroides* cepa P45 sobre rasgos metabólicos en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

## Objetivos particulares

- Comparar la ganancia de peso y el porcentaje de adiposidad entre los diferentes grupos de estudio.
- Determinar si la administración de *L. mesenteroides* P45 a ratones alimentados con dieta alta en grasa previene la acumulación de lípidos hepáticos y alteraciones de parámetros bioquímicos.
- Identificar la presencia de inflamación en el colon de los ratones de estudio.
- Corroborar la presencia de *L. mesenteroides* P45 en las heces de los ratones de estudio.

## Metodología

### Preparación de cultivo.

Basándonos en las condiciones establecidas por Giles y colaboradores (Giles-Gómez *et al.*, 2016), se inoculó una colonia de *L. mesenteroides* cepa P45 en 5 mL de caldo APT (por su nombre en inglés All Purpose Tween, DIFCO) y se incubó a 30° C durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h se midió la densidad óptica (DO)<sub>600nm</sub> en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c, Thermo Scientific® para estimar la concentración de células presentes en el cultivo. A partir de éste, se prepararon 25 mL de un cultivo a 0.1 DO y se incubó a 30° C durante 20 h. Al término del tiempo de incubación se centrifugó por 4 minutos a 4500 rpm y 4° C en una centrifuga Sorvall ST 8R (Thermo Scientific®). Se aspiró el medio y el pellet se resuspendió en 22.5 mL de medio estéril y se agregaron 2.5 mL de glicerol al 10% para preservar la viabilidad de las células en congelación con el objetivo de determinar la efectividad de la administración de la cepa tanto en el cultivo fresco como congelado para posteriormente realizar alícuotas de 450 µL. Este procedimiento se realizó una vez por semana para obtener un cultivo que se mantuvo en congelación a -20 °C hasta su utilización; y diario una hora antes de la administración a los ratones, para obtener un cultivo fresco. Para los grupos control se preparó el medio de cultivo APT estéril con 10% de glicerol. El procedimiento se ilustra en la figura 1.

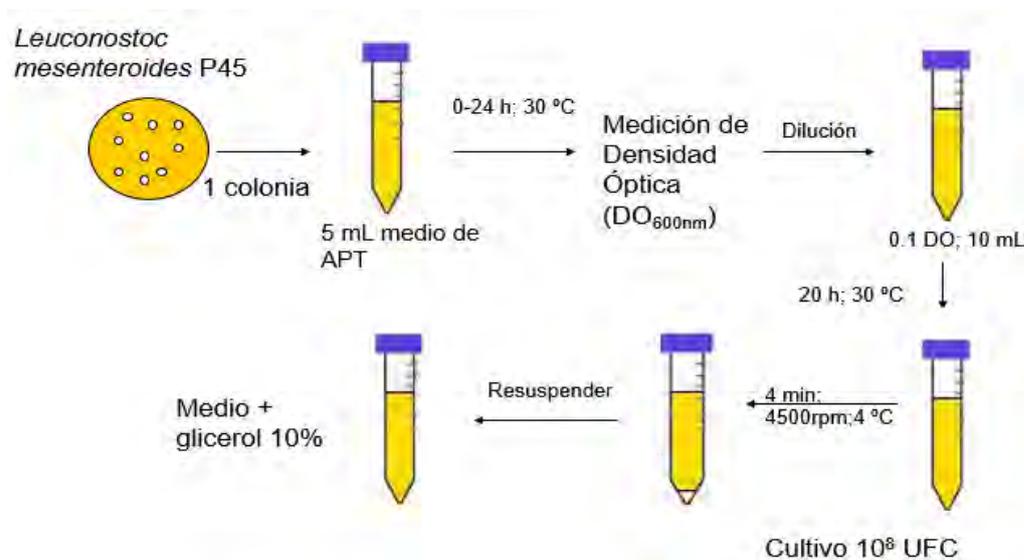


Figura 1. Preparación del cultivo de *L. mesenteroides* P45.

## Diseño del estudio

Se emplearon 29 ratones macho de la cepa C57BL/6N (20 a 24 g) de 6 a 8 semanas de edad proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco. Se acomodaron 2 o 3 ratones por caja en condiciones de laboratorio (12 h luz/ 12 h oscuridad;  $22 \pm 1$  °C) y se aclimataron una semana previa al estudio. Durante 6 semanas los ratones recibieron agua y alimento *ad libitum* y fueron tratados de acuerdo con el siguiente diseño experimental:

### Formación de grupos de estudio

Los ratones se dividieron en 4 grupos de 7 a 8 ratones por grupo, a los cuales se les administró, durante las 6 semanas de estudio, los tratamientos que se describen a continuación.

- Grupo Control. Dieta control [10 % de grasa (kcal); Research Diets Inc.] (Tabla 1) y administración diaria, vía intragástrica de 200  $\mu$ L del vehículo (caldo APT + 10 % de glicerol).
- Grupo Dieta alta en grasa (HFD). Dieta alta en grasa [60 % de grasa (kcal); Research Diets Inc.] (Tabla 2) y administración diaria vía intragástrica de 200  $\mu$ L del vehículo (caldo APT + 10 % de glicerol).
- Grupo Dieta alta en grasa + Probiótico fresco (HF-PF). Dieta alta en grasa [60 % de grasa (kcal); Research Diets Inc.] (Tabla 2) y administración diaria vía intragástrica de 200  $\mu$ L de cultivo fresco de *Leuconostoc mesenteroides* cepa P45 a una concentración de  $10^8$  UFC preparado el mismo día de la administración.
- Grupo Dieta alta en grasa + Probiótico congelado (HF-PC). Dieta alta en grasa [60 % de grasa (kcal); Research Diets Inc.] (Tabla 2) y se administró diariamente vía intragástrica, 200  $\mu$ L de cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* cepa P45 a una concentración de  $10^8$  UFC que previamente permaneció congelado hasta su uso.

El diseño de estudio se ilustra en la figura 2.

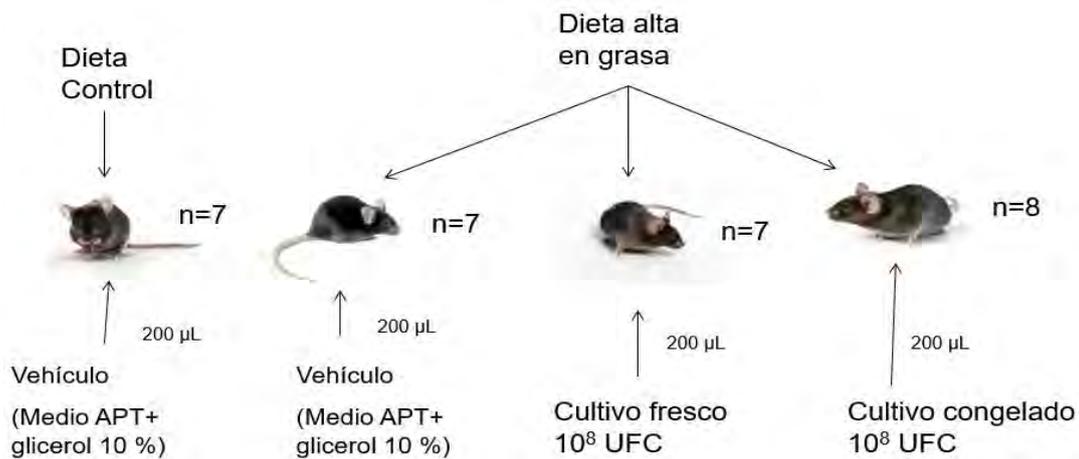


Figura 2. Diseño del estudio

Nutrientos	Gramos %	Kcal %
Proteína	19.2	20
Hidratos de carbono	67.3	70
Lípidos	4.3	10
Otros	9.2	0
Total	100	100
Kcal/g	3.85	
Ingrediente	Gramos	Kcal
Caseína malla 80	200	800
L-Cistina	3	12
Almidón de maíz	506.2	2024.8
Maltodextrina 10	125	500
Sacarosa	68.8	275.2
Celulosa BW200	50	0
Aceite de soya	25	225
Lardo	20	180
Mezcla mineral S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de calcio	5.5	0
Citrato de potasio hidratado	16.5	0
Mezcla de vitaminas V1001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Amarillo 5	0.04	0
Azul brillante FCF 1	0.01	0
Total	1055.5	4057

Tabla 1. Valores de los nutrientes e ingredientes que componen la dieta control [10 % de grasa (kcal)] en gramos y en porcentaje de kilocalorías.

Nutrientos	Gramos %	Kcal %
Proteína	26	20
Hidratos de carbono	26	20
Lípidos	35	60
Otros	13	0
Total	100	100
Kcal/g	5.24	
Ingrediente	Gramos	Kcal
Caseína malla 30	200	800
L-Cistina	3	12
Maltodextrina 10	125	500
Sacarosa	68.8	275
Celulosa BW200	50	0
Aceite de soya	25	225
Lardo	245	2205
Mezcla mineral S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de calcio	5.5	0
Citrato de potasio hidratado	16.5	0
Mezcla de vitaminas V1001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Azul brillante FCF	0.05	0
Total	773.85	4057

Tabla 2. Valores de los nutrientes e ingredientes que componen la dieta alta en grasa [60 % de grasa (kcal)] en gramos y en porcentaje de kilocalorías

Los ratones y el alimento consumido por estos, fueron pesados 2 veces por semana durante las 6 semanas de estudio. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL, UAM-Xochimilco).

### **Obtención de muestras fecales.**

Transcurridas 5 semanas se colocó a los ratones en jaulas metabólicas durante 24 horas conforme se acomodaron en sus cajas, para recolectar heces, con agua y alimento *ad libitum*.

### **Curva de tolerancia oral a la glucosa (OGTT).**

En la semana 5 del estudio se realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa. Para este procedimiento, se ayuno a los animales por un periodo de 5 horas durante la fase de descanso. Al término del ayuno se tomó una muestra de sangre de la cola de cada uno de los ratones y se midió la glucosa con un glucómetro (Abbott). Posteriormente se administraron 2 g de glucosa por kg de peso corporal vía intragástrica a partir de una solución de glucosa al 30 % v/v y se midió la glucosa en sangre a los 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos después de la administración de la solución.

### **Obtención de suero, grasa abdominal, hígado e intestino grueso**

A las 6 semanas se realizó la eutanasia de los animales. Se anestesió a los ratones en cámara con isoflurano al 3 % y se colectó la sangre por punción cardíaca. El suero se obtuvo por centrifugación a 3500 rpm, 4 °C por 15 minutos, y se congeló a -80 °C hasta su análisis.

Se diseccionó el tejido adiposo (subcutáneo y epididimal), el hígado y el colon. El hígado y el tejido adiposo fueron pesados y el colon se midió. Todos los tejidos diseccionados fueron lavados con solución salina estéril al 0.9 %, previo a su almacenamiento a -80° C.

## Porcentaje de adiposidad

Se calculó el porcentaje de adiposidad tomando el valor del peso de tejido adiposo total entre el peso corporal, ambos del ratón, multiplicado por 100.

$$\% \text{ de adiposidad} = \frac{\text{Peso del tejido adiposo (g)}}{\text{Peso corporal del ratón (g)}} \times 100$$

## Análisis de parámetros bioquímicos en suero.

Se determinó la concentración de glucosa, colesterol total y triglicéridos séricos por método enzimático-colorimétrico (ELITech Clinical Systems) y la concentración de insulina mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, ALPCO Diagnostics) en un espectrofotómetro para microplacas EPOCH (Bio Tek instruments, inc).

## Cálculo del índice HOMA-IR

El índice de resistencia a la insulina se calculó mediante la evaluación del modelo homeostático (HOMA) propuesto por Mathews et al. (1985), el cálculo de este modelo se muestra a continuación:

$$\text{Insulina (mUI/L)} * \text{Glucosa (mmol/L)} / 22.5$$

## Contenido de lípidos en hígado

La extracción de lípidos en hígado se realizó conforme al método de Folch (Folch *et al.* 1957). Se homogenizaron 50-70 mg de tejido en 1.4 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. La fase superior se eliminó y la fase inferior se colocó en un tubo nuevo, que posteriormente se evaporó a sequedad en evaporador con vacío a temperatura ambiente (Concentrator 5301, Eppendorf). El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de isopropanol/tritón X-100 (10 %) y se determinó la concentración de colesterol y triglicéridos por método enzimático-colorimétrico (ELITech Clinical Systems).

## **Extracción de RNA total de colon.**

La extracción de RNA se realizó mediante el kit TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies<sup>™</sup>). Se pesaron de 44 a 75 mg de tejido en tubos de microcentrifuga, a los que se les agregaron 1000  $\mu$ L de TRIzol<sup>®</sup> Reagent. Se homogeneizó el contenido de los tubos con Polytron PT 2500 E y se centrifugaron a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C (Sorvall ST 8R, Thermo Scientific<sup>®</sup>), el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregó al sobrenadante 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó en vórtex, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4 °C. La fase superior de la mezcla que contiene al ARN, fue transferida a un tubo nuevo y posteriormente se añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol al 100% para precipitar el ARN. Tras agitar en vórtex 10 segundos e incubar a temperatura ambiente 10 minutos se procedió a una centrifugación a 12,000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado que se obtuvo se lavó con etanol frío al 75 % y se centrifugó a 7,500 g durante 5 minutos a 4 °C. Al término de la centrifugación se descartó el lavado. El precipitado se secó al aire durante 10 minutos y se resuspendió en 40  $\mu$ L de agua libre de rnsa e incubó a 55 °C durante 10 minutos. Posteriormente se cuantificó la concentración y verificó la calidad conforme a la relación 260nm/280nm y 260nm/230nm (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific<sup>®</sup>). Se corroboró la integridad del ARN en un gel de agarosa al 1.5 %.

## **Reacción en cadena de la polimerasa- Transcripción reversa (RT-PCR).**

La retrotranscripción (RT-PCR) se realizó en un termociclador (MaxyGene<sup>™</sup> II Thermal Cycler, Axygen<sup>®</sup>) a partir de 500 ng de ARN y en un volumen total de la reacción de 25  $\mu$ L. La mezcla de reacción se realizó conforme al procedimiento del kit transcripción reversa de microARN (TAqMan<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>™</sup>) agregando el volumen de cada reactivo como se muestra en la tabla 3.

Reactivos	Volumen por reacción (μL)
Agua libre de RNasa	7.625
Buffer TaqMan RT 10X	2.5
Cloruro de magnesio 25 mM	5.5
Mezcla de deoxiNTP's	5
Oligos d(T) <sub>16</sub>	1.25
Inhibidor de RNasa	0.5
Transcriptasa reversa	0.625
ARN	2

Tabla 3. Volumen de los reactivos empleados para la transcripción reversa

## Expresión génica de citocinas proinflamatorias

Para el análisis de expresión del ARNm se realizó la amplificación por PCR tiempo real (LightCycler® 480 II, Roche Diagnostics, Inc.) de las citocinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 e IFN-γ y HPRT como control endógeno. Para el ensayo se empleó, la biblioteca universal de sondas (Universal Probe Library, TaqMan®, Roche Diagnostics, Inc.) con sus respectivos primers (tabla 4).

	Número de sonda	Secuencia
IL-1β	38	Forward 5'- agt tga cgg acc cca aaa g -3' Reverse 5'- agc tgg atg ctc tca tca gg -3'
IL-6	6	Forward 5'-gct acc aaa ctg gat ata atc agg a -3' Reverse 5'- cca ggt agc tat ggt act cca gaa -3'
IFN-γ	21	Forward 5'- atc tgg agg aac tgg caa aa -3' Reverse 5'- ttc aag act tca aag agt ctg agg ta -3'
HPRT	95	Forward 5'- cct cct cag acc gct ttt t -3' Reverse 5'- aac ctg gtt cat cat cgc taa -3'

Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para la expresión de ARNm.

Las condiciones de la reacción fueron; 10 minutos de preincubación a 95 °C; 45 ciclos de amplificación a 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 segundo y; 30 segundos de enfriamiento a 40 °C.

## **Extracción de ADN de muestras fecales.**

La extracción ADN de heces de ratón se realizó mediante el kit Power Soil® (MO BIO Laboratories, Inc.) como se describe a continuación.

Se pesaron de 0.15 a 0.27 g de heces de ratón que fueron colocadas en tubos que contienen un buffer que disuelve ácidos húmicos y protege de la degradación de los ácidos nucleicos, llamado power bead®. Se agitaron las muestras en vórtex durante 10 minutos y se agregaron 60 µL de una solución con SDS (dodecilsulfato sódico) y otros componentes de disociación para lisar las células. Las mezclas se incubaron a 70 °C durante 10 minutos, se agitaron en vórtex 10 min y se centrifugaron a 7,000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente (Sorvall® pico). El sobrenadante de cada muestra se transfirió a un tubo nuevo, y se agregó 250 µL una solución que promueve la precipitación de materia orgánica e inorgánica. Las mezclas resultantes se incubaron a 4° C durante 5 minutos y nuevamente se centrifugaron a 7,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 200 µL de una solución que permite la precipitación de materia orgánica e inorgánica. Las mezclas anteriores se incubaron a 4° C durante 5 minutos y centrifugaron 1 minuto con las condiciones anteriores. El sobrenadante se transfirió y se agregaron 1200 µL de una solución con alta concentración de sales que permite la unión del ADN a la columna de sílice, y se mezclaron en un vórtex 5 segundos. De esta mezcla se colocaron 675 µL en columnas y se centrifugaron a 7,000 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto. Los filtrados se desecharon. Este procedimiento se realizó 3 veces hasta que el volumen total del sobrenadante pasará por la columna. A cada columna se le agregaron 500 µL de una solución con etanol, para precipitar el ADN y se centrifugó a 7,000 rpm durante 1 minuto a temperatura

ambiente. Los filtrados se desecharon y las columnas se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Por último las columnas se colocaron en tubos de colección nuevos y se agregaron 100 µL de buffer de elución, al centro de la membrana. Se centrifugaron a 7,000 rpm, 30 segundos a temperatura ambiente. Al término de la extracción se verificó la calidad de las muestras mediante los cocientes 260nm/230nm y 260nm/280nm; y se cuantificó la concentración en un NanoDrop 2000c, Thermo Scientific®.

### **Amplificación por PCR tiempo real.**

Con el objetivo de corroborar la presencia de *L. mesenteroides* en las heces de los ratones se realizó una reacción de PCR tiempo real (LightCycler® 480 II, Roche Diagnostics, Inc.) dirigida a una región específica del gen 16S de *L. mesenteroides* utilizando los primers Lmes1 forward (5'-GCAGGTTCTCCTACGGCTAC-3') y Lmes1 reverse (5'-ACACGTGCTACAATGGCGTA-3') (diseñados por el Dr. Adelfo Escalante. Instituto de Biotecnología, UNAM).

La mezcla de reacción incluye 1.5 µL de ADN, 3.1 µL de agua grado PCR, 5 µL de SyBR Green I Master (Roche Diagnostics, Inc.) 0.2 µL (10 µM) de cada primer (Lmes1Fw y Lmes1Rv) en un volumen final de 10 µL. Las condiciones fueron 2 minutos de preincubación a 95 °C; 45 ciclos de amplificación a 95 °C durante 30 segundos, 60° C durante 20 segundos y 72° C durante 20 segundos y; 30 segundos de enfriamiento a 40 °C.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el software Prism 5 (GraphPad Software). Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos y en caso de los valores que no fueran normales, se transformaron logarítmicamente previo al análisis de varianza de una vía (ANOVA), con prueba post hoc de Tukey.

## Resultados

### Ganancia de peso y consumo de alimento

El peso de los ratones se registró a lo largo del estudio, y se observó que durante las primeras 2 semanas del estudio los grupos presentaron un aumento de peso similar (fig. 3a). A partir de la semana 3 los grupos alimentados con una dieta alta en grasa y administrados con probiótico (HF-PF y HF-PC) comenzaron a aumentar de peso en mayor proporción con respecto al grupo control y al grupo HFD. Al término del estudio el grupo con mayor ganancia de peso fue el HF-PF seguido del grupo HF-PC y del grupo HFD. Sin embargo, sólo el grupo HF-PF presentó una diferencia significativa en comparación con el grupo control (figura 3b).

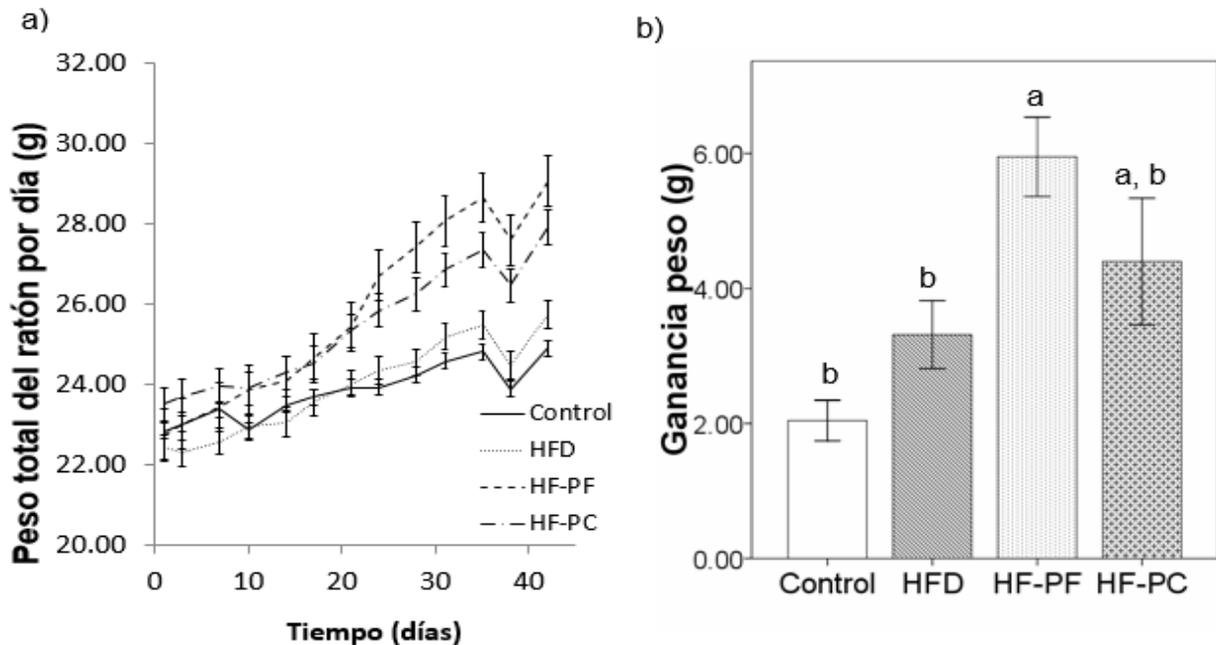


Figura 3. a) Peso total durante las 6 semanas. b) Ganancia de peso total.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey.

En cuanto al consumo de alimento, los grupos con dieta alta en grasa al comienzo del estudio consumían la misma cantidad de alimento que el grupo control. Sin embargo, dado que esta dieta es hipercalórica, a los pocos días disminuyeron su consumo de alimento, para regular la ingesta de calorías (fig. 4 a y b). A pesar de que el grupo con mayor consumo de alimento fue el control, en kcal acumuladas no hubo una diferencia significativa en los grupos por lo que las calorías ingeridas no fue un factor que influyera en una mayor ganancia de peso (figura 4c).

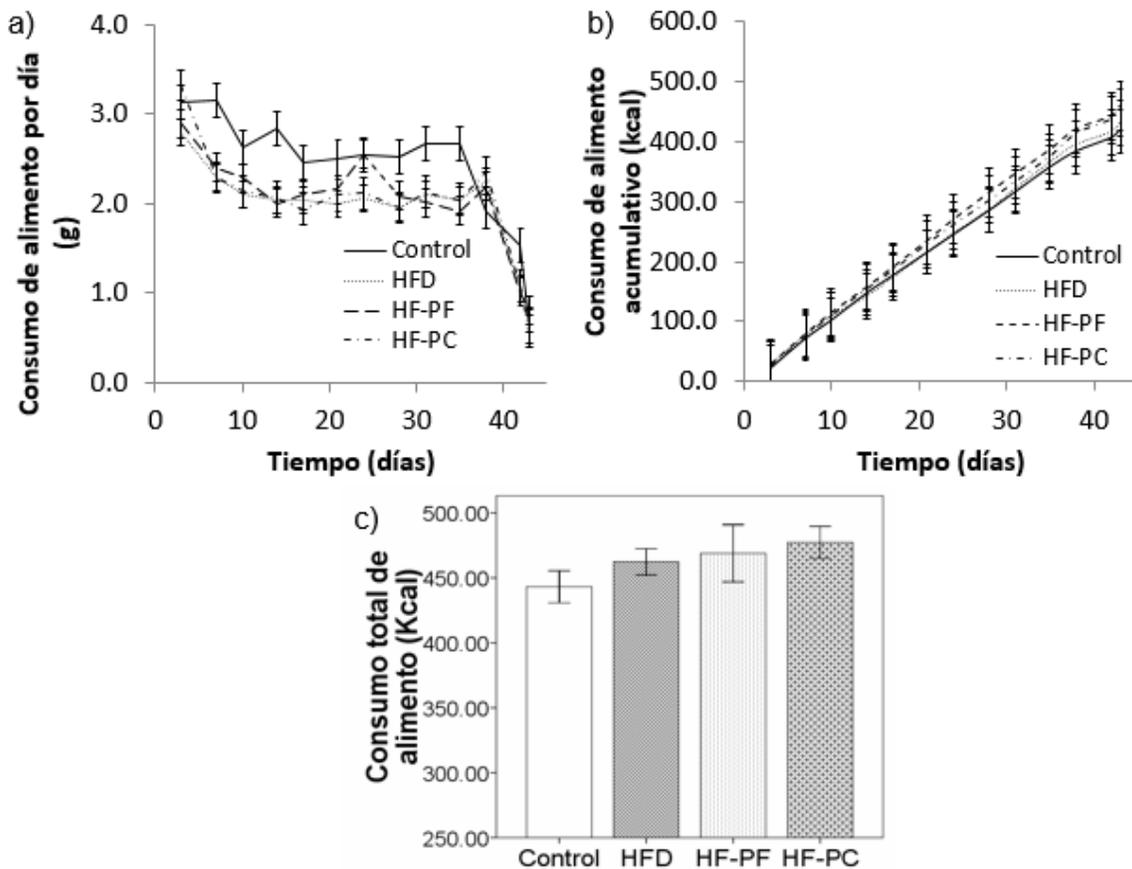


Figura 4. a) Consumo de alimento por día (g). b) Consumo de alimento acumulado (kcal). c) Consumo de alimento total (kcal).  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey.

Para comprobar que el mayor aumento de peso en el grupo HF-PF fue causado por una mayor cantidad de tejido adiposo, se calculó el porcentaje de adiposidad.

En la figura 5 se muestra que los grupos alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, HF-PF y HF-PC) mostraron un incremento en la adiposidad, pero solo en los grupos HF-PF y HF-PC la diferencia fue significativa con respecto al grupo control. Entre los grupos alimentados con dieta HFD no se encontraron diferencias significativas.

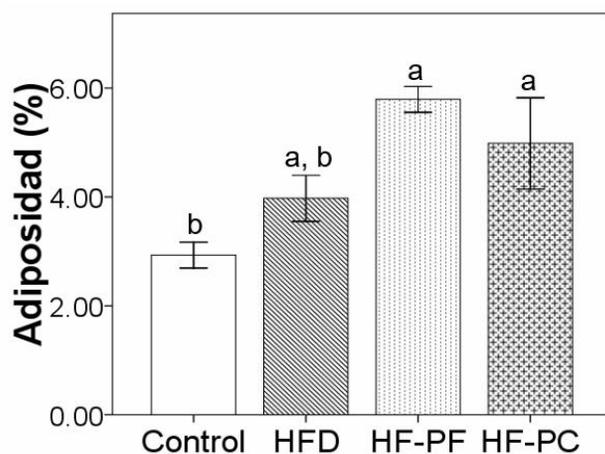


Figura 5. Porcentaje de adiposidad.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey.

## Efecto en la homeostasis de glucosa

Una dieta alta en grasa promueve el desarrollo de resistencia a la insulina (Ma *et al.* 2008). La curva de tolerancia oral a la glucosa es una prueba que se realiza con el propósito de conocer la velocidad con que el metabolismo, es capaz de llevar a niveles basales la glucosa en sangre, y evaluar de manera indirecta la sensibilidad a la insulina. En la figura 6a se muestra que los grupos control, HFD, y HF-PF presentan el pico de glucosa a los 15 minutos después de la administración de glucosa, mientras que el grupo HF-PC presentó el pico al minuto 30. Los picos de glucosa correspondiente a los grupos HF-PF y HF-PC alcanzaron los niveles más altos llegando casi a 280 mg/dL.

Los grupos control y HFD regresaron a sus valores basales de glucosa transcurridas 2 horas de la administración de glucosa, e incluso el grupo control obtuvo menor concentración de glucosa que después del ayuno

En comparación con el grupo control, los grupos HF-PF y HF-PC presentaron una mayor área bajo la curva, lo que implica que la velocidad de recuperación de la glucemia a niveles basales es menor. El grupo HFD no mostró diferencia significativa en comparación con el grupo control (fig. 6b). Aunque el área bajo la curva pareció incrementar en los grupos administrados con probiótico en comparación con el grupo HFD esta no fue significativa. Entre los grupos administrados con probiótico (HF-PF y HF- PC) no hubo diferencias.

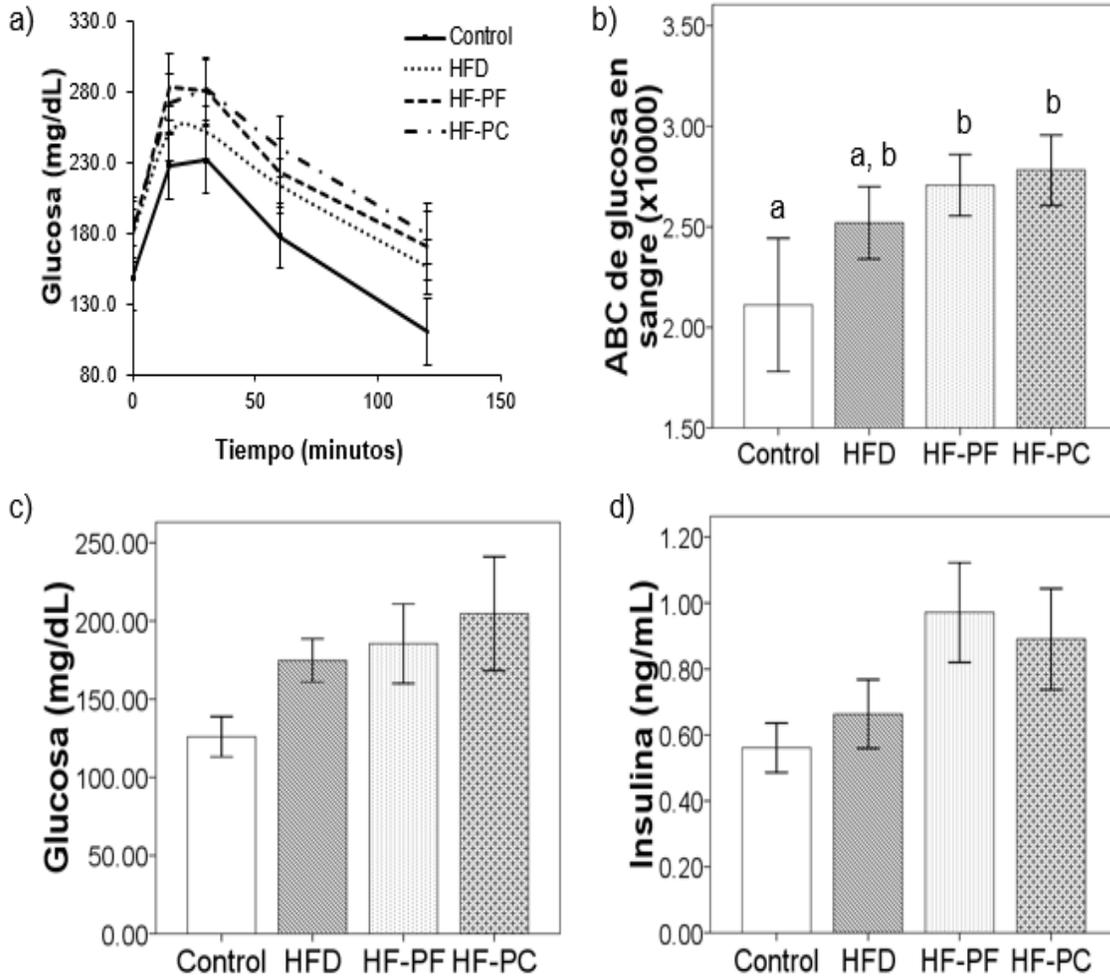


Figura 6. a) Curva de tolerancia oral a la glucosa. b) Área bajo la curva. c) Concentración de glucosa en suero en ayuno, posterior al sacrificio. d) Concentración de insulina en suero.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey.

Las concentraciones de glucosa e insulina sérica en ayuno, no mostraron diferencias significativas entre los grupos (fig. 6 c-d). No obstante, en los grupos a los que se alimentó con dieta alta en grasa los valores de glucosa se encuentran por arriba del valor normal ( $121.7 \pm 33.2$  mg/dL; Laboratory Mouse Handbook), siendo el grupo HF-PC el grupo que presenta el mayor valor superando los 200 mg/dL.

Ambos valores se emplearon para el cálculo del índice de HOMA-IR, el cual es un modelo matemático que relaciona la concentración de glucosa e insulina en suero. Esta relación permite evaluar de manera indirecta si los ratones alimentados con dieta alta en grasa presentan resistencia a la insulina. En la figura 7, los valores del índice de HOMA-IR se ven aumentados en los grupos HF-PF y HF-PC con respecto al grupo HFD y al grupo control, pese a ello, no se encontró diferencia significativa.

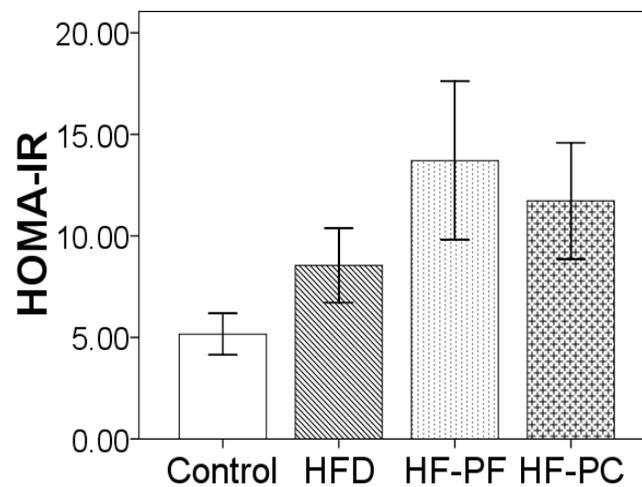


Figura 7. Índice HOMA-IR.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey

Efecto sobre los lípidos en sangre.

Una dieta alta en grasa desregula el metabolismo de lípidos, lo que puede reflejarse en un aumento anormal de niveles séricos de colesterol y triglicéridos (Maioli *et al.*, 2015). La concentración sérica de colesterol total en los grupos de ratones que se alimentaron con dieta alta en grasa fue superior al valor normal de  $94.8 \pm 16.9$  mg/dL (Laboratory Mouse Handbook). Los grupos HF-PF y HF-PC presentaron niveles significativamente mayores en comparación con el grupo control (fig. 8b). La concentración de triglicéridos en suero se encontró dentro de rangos normales ( $97 \pm 21.1$  mg/dL) y no presentó diferencia significativa entre los grupos (fig. 8a) (Laboratory Mouse Handbook).

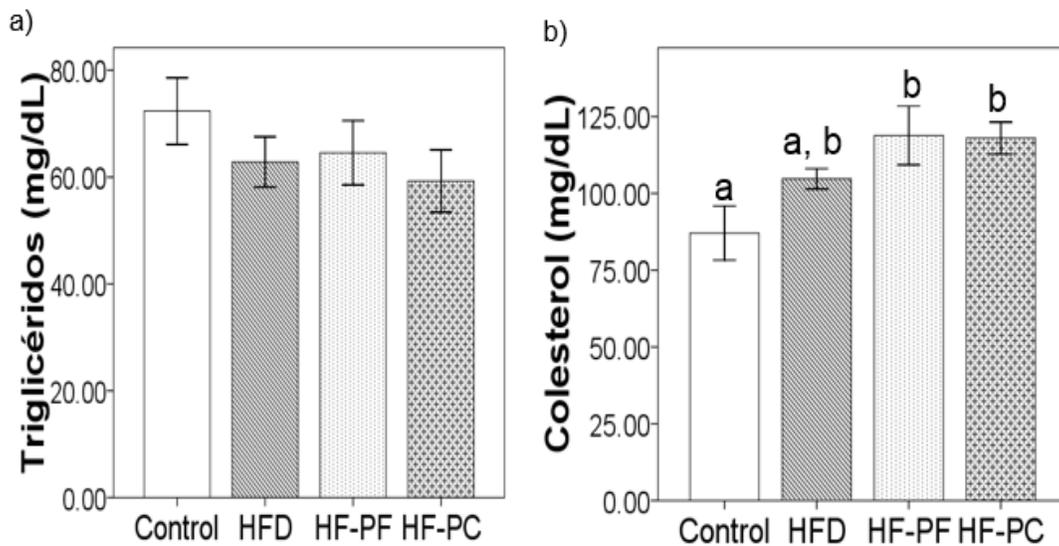


Figura 8. a) Concentración de colesterol total en suero. b) Concentración de triglicéridos en suero.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p < 0.05$  ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey

## Lípidos en hígado

Una de las anomalías asociadas a la ingesta de una dieta alta en grasa es la acumulación de lípidos en hígado, que en algunos casos se traduce en hepatomegalia. Como se observa en la figura 9, el grupo HF-PF presentó un menor peso relativo del hígado con respecto al grupo control. Sin embargo, los resultados de la cuantificación de triglicéridos y colesterol no mostraron diferencia significativa en la concentración de estos lípidos entre los diferentes grupos (fig. 10 a-b).

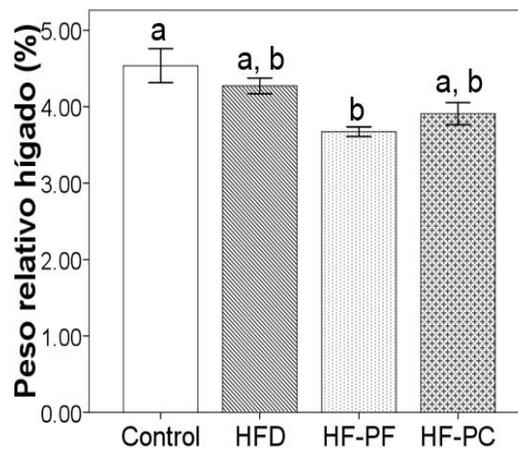


Figura 9. Peso relativo del hígado.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey

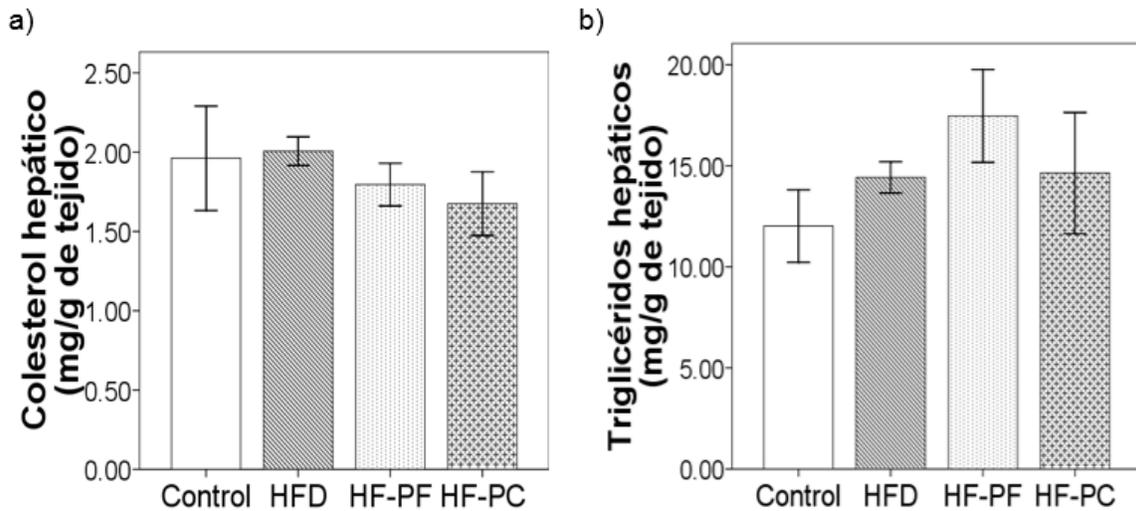


Figura 10. Concentración en hígado de a) triglicéridos y b) colesterol.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey

Inflamación en colon.

Se conoce que uno de los primeros efectos que presenta una dieta alta en grasa es inflamación en el colon. Esta inflamación, en algunos casos, puede provocar un acortamiento de este órgano (Ukena *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012), por lo que un marcador indirecto de inflamación es su longitud.

En la figura 11 se observa que el grupo HFD muestra una menor longitud del colon con respecto a los grupos control y HF-PF. Aunque esta diferencia no fue significativa, se realizó la cuantificación de citocinas proinflamatorias con el objetivo de determinar si este pequeño cambio estaba asociado a la presencia de inflamación.

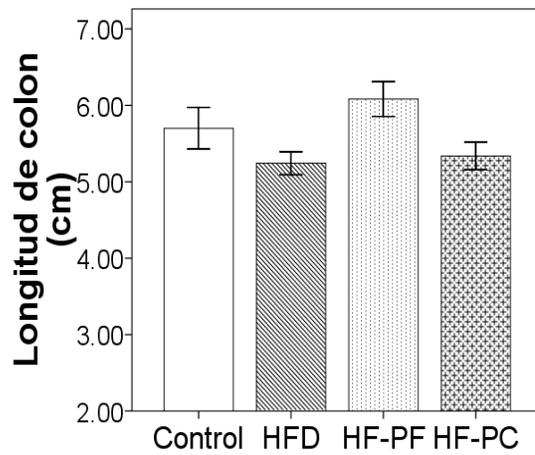


Figura 11. Longitud del colon entre los grupos.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey.

Se realizaron ensayos de expresión génica de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Sin embargo IFN- $\gamma$  e IL-6 no mostraron una señal detectable en su expresión, por lo que únicamente se obtuvo la expresión relativa de IL-1 $\beta$ . En la figura 12 se aprecia que la expresión de IL-1 $\beta$  no mostró diferencia significativa entre los grupos, descartando así, una mayor inflamación en el grupo HFD y por ende una mejora en el grupo HF-PF.

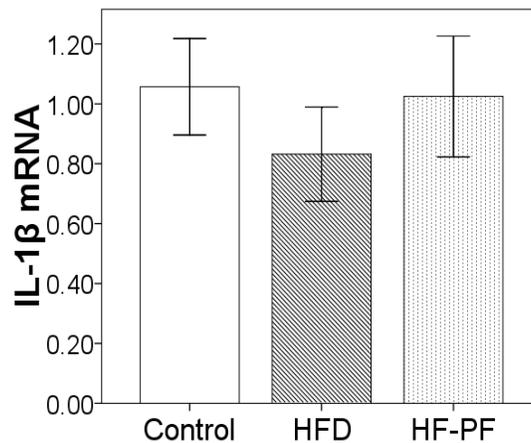


Figura 12. Expresión de la citocina IL-1 $\beta$ .  $n=6$  a  $7$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey.

Presencia de *Leuconostoc mesenteroides* P45.

Por último, para corroborar la presencia de *L. mesenteroides* en las heces de los ratones a los que se les administró el probiótico, se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S de la bacteria.

Como se muestra en la figura 13, los ratones administrados con el probiótico (HF-PF y HF-PC) presentan significativamente mayor cantidad de *L. mesenteroides* que los grupos a los que no se les administró (control y HFD).

La concentración de *L. mesenteroides* entre los grupos HF-PF y HF-PC no presentó diferencia significativa

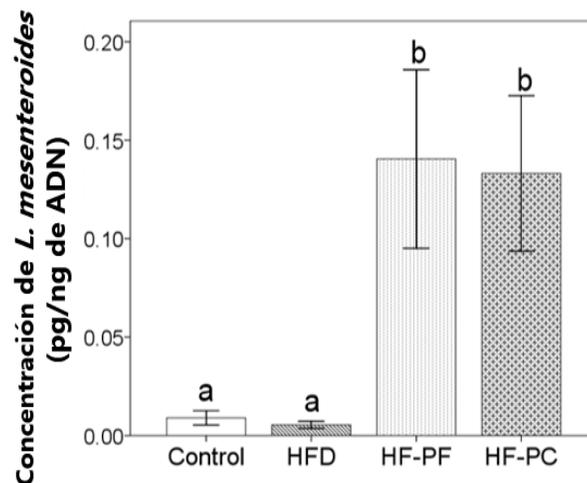


Figura 13. Concentración de bacterias de *L. mesenteroides* en las heces de ratón.  $n=6$  a  $8$  por grupo. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  error típico. Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa  $p<0.05$ . ANOVA; análisis post hoc prueba de Tukey

## Discusión

Los microorganismos considerados como probióticos presentan efectos sobre el hospedero dependiendo de la cepa que se administre (Qiao *et al.*, 2015). Debido a las características probióticas que ha presentado *L. mesenteroides* P45 en otras investigaciones (Giles-Gómez *et al.*, 2016), en este estudio se buscó probar el efecto de la administración de esta cepa sobre parámetros metabólicos cuando se consume una dieta alta en grasa.

De manera general, las dietas altas en grasa aumentan la ganancia de peso corporal en ratones C57BL/6N, con respecto a los que se alimentan con dietas normales, causando una desregulación en el metabolismo de glucosa y en el metabolismo de lípidos entre otros efectos (Podrini *et al.*, 2013). Por ello en este estudio, se consideró alimentar a los ratones con una dieta alta en grasa (60 % en kcal.) durante 6 semanas (Duparc *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2004). La ganancia de peso en el grupo HFD fue ligeramente mayor en comparación con el grupo control sin embargo no alcanzo significancia estadística.

Se ha reportado que los efectos metabólicos del consumo de una dieta alta en grasa pueden estar influidos por las condiciones ambientales, como temperatura, estrés, cambio de jaulas y por otros factores como el origen del ratón (proveedor) (Podrini *et al.*, 2013). Por ello podemos especular que la poca ganancia de peso en los ratones HFD, posiblemente sea un efecto conjunto de la dieta, el estrés inducido por el cambio de dieta, y la manipulación, específicamente por la administración por vía intragástrica o el cambio de las cajas a las jaulas metabólicas (Fuentes-Paredes *et al.*, 2008).

A diferencia del grupo HFD, el grupo con el probiótico fresco (HF-PF) si presentó una ganancia de peso y adiposidad significativamente mayor en comparación con el grupo control. Sin embargo, esto no estuvo asociado a una mayor ingesta de energía. Estudios anteriores han mostrado que la administración de ciertas cepas probióticas puede inducir un aumento de peso en animales y humanos, incrementando así la cantidad de masa grasa (Agustina *et al.*, 2013; Angelakis *et*

*al.*, 2012; Villena *et al.*, 2005). Aunque el mecanismo no se conoce con precisión, se ha reportado que esto puede estar asociado a una mayor capacidad de extracción de energía de la dieta o bien a una modulación de la disposición de lípidos en el tejido adiposo (Sanz *et al.*, 2013; Everard & Cani, 2013). De tal modo sería interesante evaluar si *L. mesenteroides* P45 induce cambios a este nivel ya sea directamente o a través de la modulación de la composición de la microbiota intestinal, con el fin de determinar la causa del incremento de peso.

Adicional a esto, estudios recientes han demostrado que la microbiota intestinal influye sobre el sistema nervioso central a través del eje intestino cerebro. Incluso modificaciones en la microbiota intestinal se han asociado con estados de depresión, autismo y otras patologías (Carding *et al.*, 2015; Foster & McVey Neufeld, 2013; Macedo *et al.*, 2016). En este sentido, Bravo y colaboradores demostraron que la administración del probiótico *L. rhamnosus* fue capaz de reducir el estrés inducido por corticosterona en ratones (Bravo *et al.*, 2011). Aunque en el presente estudio no se realizaron pruebas de comportamiento, los ratones a los que se les administró el probiótico (HF-PF) presentaron un comportamiento más relajado y un mejor aspecto visual. De tal modo podríamos especular que la administración de *L. mesenteroides* P45 al grupo HF-PF redujo el estrés en estos ratones lo que pudo verse reflejado en una mayor ganancia de peso. Sin embargo, se requieren más estudios para comprobar este hecho.

Después de comparar la ganancia de peso entre los grupos se evaluaron las posibles alteraciones metabólicas que se podrían presentar, incluso cuando no se hayan observado diferencias en la ganancia de peso y la adiposidad. Como primer marcador de desregulación metabólica medimos la longitud del colon, pese a que no hubo diferencia significativa entre los grupos, el grupo HFD parecía tener una menor longitud del colon, posiblemente asociado a la presencia de inflamación en este órgano. Sin embargo, la medición de la expresión de citocinas proinflamatorias en colon confirmó que no hubo diferencias significativas entre los grupos y por lo tanto no se puede deducir algún efecto de *L. mesenteroides* P45 en este sentido.

Además el consumo de dietas altas en grasa conlleva el desarrollo de resistencia a la insulina y de esteatosis hepática, inducidas por un exceso de lípidos que atrofia los adipocitos, seguido de un almacenamiento anormal de lípidos en las células hepáticas (Aron-Wisnewsky *et al.*, 2013). En este estudio los grupos alimentados con una dieta alta en grasa presentaron menor sensibilidad a la insulina (evaluado por la curva de tolerancia a la glucosa), aunque de manera interesante esta diferencia solo fue significativa en los grupos administrados con el probiótico. Este hallazgo podría estar asociado a la mayor ganancia de tejido adiposo observada en estos ratones, sin embargo aún es necesario hacer más estudios con el objetivo de determinar si la cepa P45 tiene efectos deletéreos sobre la cascada de señalización a la insulina.

Una de las anomalías metabólicas más comunes en la que se ha probado el uso de probióticos es en hígado graso. En otros estudios se ha reportado que las dietas altas en grasa inducen claramente hígado graso cuando se alimenta a los ratones durante 8 semanas o más (Lim *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2012). Desafortunadamente en las 6 semanas de estudio los ratones no desarrollaron mayor acumulación de grasa en hígado, con respecto al control. Por lo que no nos fue posible determinar el efecto de la administración de esta cepa sobre esta patología y sería necesario realizar un estudio de mayor duración.

Uno de los objetivos secundarios del estudio era determinar si los efectos de la administración de la bacteria probiótica congelada (por máximo 7 días) eran iguales a la administración en fresco, ya que realizar el cultivo diariamente trae desventajas como variaciones en la concentración de las células microbianas y mayor inversión de tiempo. En pruebas previas *in vitro* se determinó que incluso después de 10 días de congelación el cultivo se mantenía estable. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en la homeostasis de glucosa los efectos son similares, sin embargo, no es el caso para la ganancia de peso. Esto sugiere por un lado que en un ambiente competitivo y con condiciones no ideales como el pH estomacal o la presencia de ácidos biliares, la cepa podría no

sobrevivir de manera óptima y por lo tanto algunos de sus efectos se ven disminuidos.

Por último, para corroborar la presencia de *L. mesenteroides* P45 en los grupos a los que se administró, se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S con oligonucleótidos dirigidos a la especie *L. mesenteroides*. De manera interesante, en los grupos a los que no se administró el cultivo (control y HFD) se observó una amplificación de bacterias aunque en menor concentración. Aunque en la literatura no se encontraron reportes de la presencia de esta especie en el intestino de ratones, es posible que esta sea comensal, por lo que sería interesante realizar análisis de secuenciación masiva en esta cepa de roedores para determinarlo. Por otro lado, aunque los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar esta especie no se realizaron ensayos con el objetivo de determinar si amplificaban otras especies o géneros, que pudieran dar esta señal., y consideramos que una posible contaminación es poco probable ya que tanto el manejo de los ratones como la preparación del cultivo se realizaron con estricto cuidado.

Finalmente, se sugiere que por el tiempo del estudio no se presentaron efectos benéficos visibles, sin embargo un análisis de la microbiota intestinal de los ratones nos permitiría observar, en primer lugar si el consumo de la dieta alta en grasa presentaba cambios en la composición microbiana del intestino, como se ha observado en otras investigaciones (Kim *et al.*, 2012). Y partiendo de esta observación identificar si el uso de *L. mesenteroides* P45 puede modular la ecología microbiana manteniendo la salud del hospedero aun en etapas tempranas como se ha sugerido anteriormente con otros probióticos (Eloe-Fadrosh *et al.*, 2015).

Aunque *L. mesenteroides* P45 no mostró el impacto que esperábamos en los parámetros metabólicos, bacterias presentes en el pulque cercanas filogenéticamente a esta cepa, podrían ser candidatas a estudios de esta índole, con mejores resultados, como observaron Qiao y colaboradores al evaluar el

efecto de 2 cepas de *L. reuteri*, encontrando que solo la cepa denominada L3 mejoraba múltiples parámetros metabólicos, marcadores de inflamación y, aumentaba el gasto energético en comparación con su análogo en dieta alta en grasa, y a diferencia de la cepa L10 de la misma especie, que no mostró mejoras (Qiao *et al.*, 2015)

## Conclusiones

En el presente estudio la administración de *Leuconostoc mesenteroides* P45 en un cultivo fresco, en conjunto con una dieta alta en grasa no mostró un efecto benéfico sobre los parámetros metabólicos. Por el contrario aceleró la ganancia de peso y tejido adiposo, llevando a un aumento en los niveles de glucosa y colesterol sérico.

El efecto observado en el grupo HF-PF no se replicó en el grupo HF-PC, sugiriendo que las células de *L. mesenteroides* P45 en congelación no mantienen una viabilidad óptima posterior a la administración.

## **Perspectivas**

Analizar la microbiota intestinal de los grupos estudiados para observar si existe una diferencia entre ellos, y si dicha diferencia correlaciona con la administración del probiótico.

Evaluar otras bacterias aisladas de pulque con propiedades probióticas para ver si presentan un efecto con mayor impacto.

## Referencias

- Acatzi-Silva, A., 2012. *Determinación del inicio de la transcripción en las glicosiltransferasas de Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de maestría Universidad Nacional Autónoma de México. pp.6-8
- Agustina, R. et al., 2013. Probiotics *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus casei* CRL 431 modestly increase growth, but not iron and zinc status, among Indonesian children aged 1-6 years. *Journal of Nutrition*, 143, pp.1184–1193.
- Aller, R. et al., 2011. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, pp.1090–5.
- De Almada, C.N. et al., 2015. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, pp.4175–4199.
- Andersson, U. et al., 2010. Probiotics lower plasma glucose in the high-fat fed C57BL/6J mouse. *Beneficial Microbes*, 1, pp.189–196.
- Angelakis, E. et al., 2012. An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight, the intestinal microbiome and metabolism in mice. *Microbial Pathogenesis*, 52, pp.61–68.
- Aron-Wisnewsky, J. et al., 2013. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: New insights. *Clinical Microbiology and Infection*, 19, pp.338–348.
- Bäckhed, F. et al., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp.979–984.

- Barrientos Alvarado, C., 2010. *Efectos metabólicos de la glucosamina y la dieta alta en grasas en rata*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. pp. 12-14
- Le Barz, M. *et al.*, 2015. Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes & Metabolism Journal*, 39, pp.291–303.
- Begley, M., Gahan, C.G.M. & Hill, C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, pp.625–651.
- Bierbaum, G. & Sahl, H.-G., 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, pp.2–18.
- Bron, P.A., Baarlen, P. Van & Kleerebezem, M., 2011. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Publishing Group*, 10, pp.66–78.
- Brun, P. *et al.*, 2007. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal Physiology: Gastrointestinal Liver Physiology*, 292, pp.518–525.
- Campos, I., 2010. *Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cani, P.D. *et al.*, 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56, pp.1761–1772.
- Cani, P.D. & Delzenne, N.M., 2009. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current Pharmaceutical design*, 15, pp.1546–1558.
- Carding, S. *et al.*, 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, p.26191.
- Cerón, I., 2014. Estudio de la capacidad probiótica *in vitro* de la cepa *Leuconostoc*

p45 aislada de pulque. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H. & Yáñez Fernández, J., 2015. Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7, pp.107–117.

Cesaro, C. et al., 2010. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease*, 43, pp.431–438.

Collins, J.K., Thornton, G. & Sullivan, G.O., 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, pp.487–490.

Collins, S. et al., 2004. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: Physiological and molecular characteristics. *Physiology and Behavior*, 81, pp.243–248.

Correa-Ascencio, M. et al., 2014. Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, pp.14223–14228.

Delzenne, N.M. & Cani, P.D., 2011. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 31, pp.15–31.

Drosinos, E.H., Mataragas, M. & Metaxopoulos, J., 2006. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science*, 74, pp.690–696.

Duparc, T. et al., 2016. Hepatocyte MyD88 affects bile acids, gut microbiota and metabolome contributing to regulate glucose and lipid metabolism. *Gut*, pp.1–13.

Duseja, A. & Chawla, Y.K., 2014. Obesity and NAFLD. The role of bacteria and microbiota. *Clinics in Liver Disease*, 18, pp.59–71.

Eloe-Fadrosh, E.A. et al., 2015. Functional dynamics of the gut microbiome in

- elderly people during probiotic consumption. *mBio*, 6, pp.1–12.
- Escalante, A. *et al.*, 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124, pp.126–134.
- Escalante, A. *et al.*, 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235, pp.273–279.
- Escalante, A. *et al.*, 2016. Pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, p.1026.
- Everard, A. & Cani, P.D., 2013. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best practice & research. Clinical Gastroenterology*, 27, pp.73–83.
- Everard, A., Matamoros, S. & Geurts, L., 2014. Reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic *db/db* mice. *mBio*, 5, pp.e01011-14.
- Farhadi, A. *et al.*, 2008. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 28, pp.1026–33.
- Firouzi, S. *et al.*, 2013. Role of probiotics in modulating glucose homeostasis: evidence from animal and human studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, pp.780–6.
- Förster, A.H. & Gescher, J., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, pp.1-12.
- Foster, J.A. & McVey Neufeld, K.A., 2013. Gut-brain axis: How the microbiome

- influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, 36, pp.305–312.
- Fuentes-Paredes, F., 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. pp.11-12
- García-Gaibay M., López-Munguía, A., 1993. Bebidas alcohólicas no destiladas. E García-Garibay, M., Quintero Ramírez, R., López-Munguía, A. (Eds.), *Biología de Alimentos*. LIMUSA, México, D.F., pp.263-311.
- Gerich, J.E., 2000. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2, pp.345–350.
- Giles-Gómez, M., Sandoval García, J.G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolívar, F., *et al.*, 2016. In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5, p.708.
- Grangette, C. *et al.*, 2005. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, pp.10321–6.
- Hajela, N. *et al.*, 2015. Gut microbiome, gut function, and probiotics: Implications for health. *Indian Journal of Gastroenterology*, 34, pp.93–107.
- Hirayama, K. & Rafter, J., 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, 2, pp.681–686.
- Hooper, L. V & Macpherson, A.J., 2015. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews. Immunology*, 10, pp.159–169.
- Inoue, H., 2015. Central insulin-mediated regulation of hepatic glucose production [Review]. *Endocrine Journal*, 63, pp.1–7.
- Joyce, S.A. & Gahan, C.G.M., 2016. Bile acid modifications at the microbe-host

- interface: Potential for nutraceutical and pharmaceutical interventions in host health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, pp.313–333.
- Kanasaki, K., & Koya, D., 2011. Biology of obesity: Lessons from animal models of obesity. *Journal of Medicine and Biotechnology*, 2011, pp.1-11.
- Kandylis, P. *et al.*, 2016. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, pp.58–63.
- Kekkonen, R.A. *et al.*, 2008. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- $\gamma$  production. *World Journal of Gastroenterology*, 14, pp.1192–1203.
- Kelly, D., Conway, S. & Aminov, R., 2005. Commensal gut bacteria: Mechanisms of immune modulation. *Trends in Immunology*, 26, pp.326–333.
- Kim, K.A. *et al.*, 2012. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS ONE*, 7, p.e47713.
- Kirpich, I.A. & McClain, C.J., 2012. Probiotics in the treatment of the liver diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 31, pp.14–23.
- Kos, B. *et al.*, 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94, pp.981–7.
- Lau, E., Carvalho, D. & Freitas, P., 2015. Gut microbiota: Association with NAFLD and metabolic disturbances. *BioMedical Research International*, 2015, p.979515.
- Li, Z. *et al.*, 2003. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 37, pp.343–350.
- Lim, S.-M. *et al.*, 2016. *Lactobacillus sakei* OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction

protein expression. *Nutrition Research*, 6, pp.3–7.

Loguercio, C. et al., 2005. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 39, pp.540–543.

Luche, E. et al., 2013. Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. *Molecular Metabolism*, 2, pp.281–291.

Ma, D., Forsythe, P. & Bienenstock, J., 2004. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infection and Immunity*, 72, pp.5308–5314.

Macedo, D. et al., 2016. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. *Journal of Affective Disorders*, 208, pp.22–32.

Maioli, T.U. et al., 2015. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflammation Research*, pp.169–178.

Matus, V., 2011. Caracterización de la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de pulque. *Tesis de licenciatura*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mohammadmoradi, S., Javidan, A. & Kordi, J., 2014. Boom of probiotics: This time non-alcoholic fatty liver disease - A mini review. *Journal of Functional Foods*, 11, pp.30–35.

Mohammadmoradi, S., Javidan, A. & Najji Isfahani, H., 2013. Effects of probiotic ultra-filtered feta cheese and raw chicory root extract on lipid profile in healthy adult volunteers: a triple-blinded randomized controlled trial. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6, pp.199–206.

- Mowat, A.M. & Agace, W.W., 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14, pp.667–685.
- Naito, E. *et al.*, 2011. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *Journal of Applied Microbiology*, 110, pp.650–657.
- Neish, A., 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Molecular Toxicology*, 55, pp.1104–1113.
- Nguyen, T.D.T., Kang, J.H. & Lee, M.S., 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*, 113, pp.358–361.
- O'Hara, A.M. & Shanahan, F., 2007. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *The Scientific World Journal*, 7, pp.31–46.
- Oelschlaeger, T. a., 2010. Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, pp.57–62.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/ Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS), 2002. Guía para la evaluación de probiótico. Recuperado de: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1)
- Organización Mundial de a Salud, 2016. Obesidad y sobrepeso. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Osman, N. *et al.*, 2007. Endotoxin- and d-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and blueberry. *Digestive and Liver Disease*, 39, pp.849–856.
- Ouwehand, a. C. *et al.*, 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9, pp.623–630.
- Paoella, G. *et al.*, 2014. Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic

- fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20, pp.15518–31.
- Park, D.Y. *et al.*, 2013. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS ONE*, 8, p.e59470.
- Pfeiler, E.A. & Klaenhammer, T.R., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15, pp.546–553.
- Plaza-Diaz, J. *et al.*, 2014. Effects of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker rats. *PLoS ONE*, 9, p.e98401.
- Podrini, C. *et al.*, 2013. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. *Mammalian Genome*, 24, pp.240–251.
- Qiao, Y. *et al.*, 2015. Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*, 14, pp.424–434.
- Reiff, C. & Kelly, D., 2010. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, pp.25–33..
- Ritze, Y. *et al.*, 2014. *Lactobacillus rhamnosus* GG Protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS ONE*, 9, pp.1–9.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, pp.1–11.
- Sanz, Y., Rastmanesh, R. & Agostonic, C., 2013. Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: How far are we? *Pharmacological Research*, 69, pp.144–155.
- Serino, M. *et al.*, 2011. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut Microbiota*, pp.1–12.

- Shen, J., Obin, M.S. & Zhao, L., 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, pp.39–58.
- Shima, T. *et al.*, 2008. Differential effects of two probiotic strains with different bacteriological properties on intestinal gene expression, with special reference to indigenous bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52, pp.69–77.
- Shoelson, S.E., Herrero, L. & Naaz, A., 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 132, pp.2169–2180.
- Spiller, R., 2008. Review article: Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 28, pp.385–396.
- Stenman, L.K. *et al.*, 2014. Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Beneficial Microbes*, 5, pp.1–9.
- Tilg, H. & Kaser, A., 2011. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 121, pp. 2126-2132.
- Tojo, R., 2014. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology*, 20, p.15163.
- Torres-Maravilla, E. *et al.*, 2015. Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, pp.385-396.
- Torres-rod ríguez, I. *et al.*, 2014. Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *Springer Plus*, 3, pp.1–14.
- Turnbaugh, P.J. *et al.*, 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, pp.1027–31.
- Turnbaugh, P.J. *et al.*, 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but

- reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host and Microbe*, 3, pp.213–223.
- Ukena, S.N. *et al.*, 2007. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE*, 2, p.e1308.
- Vajro, P., Paoletta, G. & Fasano, A., 2013. Microbiota and gut–liver axis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56, pp.461–468.
- Vickers, S.P., Jackson, H.C. & Cheetham, S.C., 2011. The utility of animal models to evaluate novel anti-obesity agents. *British Journal of Pharmacology*, 164, pp.1248–1262.
- Villena, J. *et al.*, 2005. *Lactobacillus casei* improves resistance to pneumococcal respiratory infection in malnourished mice. *The Journal of Nutrition*, 135, pp.1462–1469.
- Wagnerberger, S. *et al.*, 2013. *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: A mouse model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, pp.531–538.
- Wang, Z. *et al.*, 2015. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell*, 163, pp.1585–1595.
- Wohlgemuth, S., Loh, G. & Blaut, M., 2010. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, pp.3–10.
- Wu, C.C. *et al.*, 2015. Effect of *Lactobacillus plantarum* strain K21 on high-fat diet-fed obese mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, p.391767.
- Xu, X. *et al.*, 2013. Gut microbiota , host health , and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 31, pp.318–337.
- Yoo, J. & Kim, S., 2016. Probiotics and prebiotics: Present status and future

perspectives on metabolic disorders. *Nutrients*, 8, p.173.

Yoo, S.R. *et al.*, 2013. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. *Obesity*, 21, pp.2571–2578.

Zhu, L., Baker, R.D. & Baker, S.S., 2015. Gut microbiome and nonalcoholic fatty liver diseases. *Pediatric Research*, 77, pp.245–251.