



Universidad Nacional Autónoma de México
Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON LA HIPERTENSIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA

Arianna Krystel Galicia Castañeda

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Hernández Lemus
[Instituto Nacional de Medicina Genómica](#)

COMITÉ TUTOR

Dra. Mirrelle Vanessa González Covarrubias
[Instituto Nacional de Medicina Genómica](#)

Dra. Nimbe Torres y Torres
[Instituto Nacional de Nutrición](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, agosto 2023.



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.

Este trabajo de investigación fue realizado gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (CONACyT - FOSSIS) número 272795, asignado a la Dra. Vanessa González Covarrubias.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mi alma máter durante más de 10 años. Ha sido testigo de mi crecimiento y me ha brindado las herramientas necesarias para consolidarme como la profesional que soy hoy en día.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), por abrieme las puertas hace cinco años y brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad científica de alta calidad.

A la Dra. Vanessa González Covarrubias, del laboratorio de Farmacogenómica del INMEGEN, quien ha sido una presencia constante y un apoyo invaluable en mi formación académica a lo largo de los últimos cinco años. Su guía y compromiso han sido fundamentales para mi crecimiento personal y desarrollo como investigadora.

Al Dr. Enrique Hernández Lemus, mi tutor, y a la Dra. Nimbe Torres y Torres, agradezco enormemente sus valiosos aportes durante los dos años de maestría. Su experiencia y conocimientos han enriquecido mi trabajo y han sido una inspiración para mi desarrollo académico.

Al Dr. Sergio Sánchez García, la Dra. Dolores Mino León y al Dr. Marco Noel Gutiérrez Aguilar del Instituto Mexicano del Seguro Social, quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su labor invaluable en la recolección de las muestras de los pacientes y en la consolidación de la base de datos que han sido la columna vertebral de este proyecto.

A la Dra. Berenice Palacios, quien brindó su apoyo y orientación hace cinco años, en los inicios de este proyecto. Su apoyo fue fundamental en mi formación y dejó una huella significativa en mi camino académico, la cual perdura hasta el día de hoy.

A mi familia, quiero expresarles mi profundo agradecimiento por su apoyo incansable durante todo este tiempo. Su amor, paciencia y aliento han sido un motor en los momentos difíciles y han sido fundamentales en mi éxito académico.

A Taxis, quien se ha convertido en parte de mi familia, mi mejor amigo y mi más valioso compañero de equipo, quiero agradecer por su apoyo incondicional a lo largo de estos cinco años de conocernos. Su colaboración en el proyecto ha sido invaluable, y su presencia en mi vida una fuente de motivación, apoyo y alegría en mi camino hacia el logro de mis metas.

A Martín, Betzaida, Shanti, Cintia, Elba, Karla y a todas aquellas personas que han formado parte de mi camino, les doy las gracias de corazón. Sus palabras de aliento, amistad y contribuciones han dejado una huella duradera en mi vida.

Y por último, quiero agradecerme a mí misma, a mi cuerpo y a mi mente, por todo el esfuerzo, dedicación y perseverancia plasmados en este escrito. Ha sido un largo camino de aprendizaje y superación personal, y estoy orgullosa del resultado obtenido.

Índice general

Abreviaturas	9
1 Marco teórico	12
1.1 Envejecimiento de la población o tercera transición demográfica	12
1.2 Hipertensión arterial	12
1.3 Microbiota humana	16
2 Justificación	24
3 Objetivos e hipótesis	25
3.1 Hipótesis	25
3.2 Objetivo general	25
3.3 Objetivos particulares	25
4 Materiales y métodos	26
4.1 Población de estudio	26
4.2 Clasificación de la población de estudio	26
4.3 Consideraciones éticas	27
4.4 Recolección de muestras de materia fecal	27
4.5 Extracción de ADN	27
4.6 Preparación de bibliotecas del gen ARNr 16S para NGS	28
4.6.1 Amplificación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S	28
4.6.2 Primera purificación	29
4.6.3 Indexación mediante PCR	30
4.6.4 Segunda purificación	31
4.6.5 Validación, cuantificación, normalización y preparación de <i>pool</i> de bibliotecas	31
4.7 NGS de bibliotecas del gen ARNr 16S	31
4.8 Análisis bioinformático y análisis estadístico	31
4.8.1 Procesamiento de datos de secuenciación	32
4.8.2 Clasificador taxonómico de la región V3-V4 del gen ARNr 16S	33
4.8.3 Asignación taxonómica, depuración de muestras y depuración de ASVs	33
4.8.4 Análisis de diversidad de la microbiota intestinal bacteriana	33
4.8.5 Análisis de taxonomía de la microbiota intestinal bacteriana	35
4.8.6 Análisis de predicción funcional de la microbiota intestinal bacteriana	38

5	Resultados	39
5.1	Datos de secuenciación del gen ARNr 16S	39
5.2	Población de estudio	41
5.3	Diversidad de la microbiota intestinal bacteriana	41
5.3.1	Normalización del tamaño de biblioteca de las muestras para análisis de diversidad alfa y beta	41
5.3.2	Diversidad alfa de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico	41
5.3.3	Diversidad beta de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico	45
5.4	Caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico	48
5.5	Índice <i>Firmicutes/Bacteroidota</i> de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico	52
5.6	Abundancia diferencial de taxones de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada	53
5.7	Composición funcional de la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial: PICRUS2	56
6	Discusión	57
6.1	Microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos	57
6.1.1	Diversidad alfa de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos	58
6.1.2	Composición taxonómica de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos	59
6.2	Microbiota intestinal bacteriana de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada	62
6.2.1	Diversidad alfa y beta de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada	62
6.2.2	Índice <i>Firmicutes/Bacteroidota</i> de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada	63
6.2.3	Abundancia diferencial de taxones de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada	63
6.2.4	Composición funcional de la microbiota intestinal bacteriana de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada	65
6.3	Limitaciones	65
7	Conclusiones y perspectivas	67
	Apéndices	81
	Apéndice A Dictamen de aprobación	82

Apéndice B Toma de muestra de materia fecal	83
Apéndice C Diversidad beta: Gráficos de sedimentación	85
Apéndice D Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos	86
Apéndice E Evaluación de las diferencias de la microbiota intestinal de adultos mayores clasificados por grupo de edad y control de los niveles de presión arterial	96

Índice de tablas

Tabla 1	Mecanismo de acción de los fármacos antihipertensivos de primera línea	15
Tabla 2	Estudios sobre hipertensión arterial y microbiota intestinal en humanos	20
Tabla 3	Lecturas e individuos restantes después de cada paso del procesamiento de los datos de secuenciación	39
Tabla 4	Características clínicas y demográficas de la población de estudio	42
Tabla 5	Diversidad alfa de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial	44
Tabla 6	Predicción funcional de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial	56
Tabla D1	Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial: Filo	86
Tabla D2	Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial: Género	87

Índice de figuras

Figura 1	Pirámide demográfica: 2015 y 2050	13
Figura 2	Información de calidad de datos de secuenciación.	40
Figura 3	Curvas de rarefacción	43
Figura 4	Gráficos de violín comparando diversidad alfa de adultos mayores clasificados por grupo de edad.	44
Figura 5	Gráficos de violín comparando diversidad alfa de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada.	45
Figura 6	Diversidad beta de adultos mayores mexicanos clasificados por grupo de edad	46
Figura 7	Diversidad beta de hipertensos con presión arterial controlada <i>versus</i> hipertensos con presión arterial no controlada	47
Figura 8	Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico a nivel de filo	50
Figura 9	Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico a nivel de género	51
Figura 10	Gráficos de violín de índice <i>Firmicutes/Bacteroidota</i>	52
Figura 11	Abundancia diferencial de taxones utilizando métodos estadísticos sin variables clínicas	54
Figura 12	Abundancia diferencial de taxones utilizando métodos estadísticos con variables clínicas	55
Figura A1	Dictamen de aprobación del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)	82
Figura B2	Instructivo de toma de muestra de materia fecal para los pacientes. Anverso.	83
Figura B3	Instructivo de toma de muestra de materia fecal para los pacientes. Reverso.	84
Figura C4	Gráficos de sedimentación de PCoA para diversidad beta	85
Figura E5	Gráficos de violín comparando diversidad alfa de pacientes clasificados por niveles de presión arterial y edad	97
Figura E6	Diversidad beta de adultos mayores mexicanos clasificados por grupo de edad	98
Figura E7	Gráficos de violín de índice <i>Firmicutes/Bacteroidota</i>	99
Figura E8	Abundancia diferencial de taxones para adultos mayores clasificados según el control de su presión arterial y según su edad	100

Abreviaturas

ADN Ácido desoxirribonucleico

ANOVA Análisis de varianza

ARA II Antagonistas de los receptores AT₁ de angiotensina II

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

ARNr Ácido ribonucleico ribosomal

ASV *Amplicon Sequence Variant*

BCC Bloqueadores de canales de calcio

CLR *Centered log-ratio*/Transformación log-cociente centrada

CMN SXXI Centro Médico Nacional Siglo XXI

COSFAMM Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en Adultos Mayores Mexicanos

DADA *Divisive Amplicon Denoising Algorithm*

dNTP Dinucleótido trifosfatado

ENSANUT 2020 Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020

F/B *Firmicutes/Bacteroidota*

FDR *False discovery rate*/Tasa de descubrimientos falsos

GLM Modelo lineal generalizado

GLM-NB Modelo lineal generalizado negativo binomial

HTA Hipertensión arterial

HTN Hipertensos

IECA Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I

IMC Índice de masa corporal

IMSS Instituto Mexicano del Seguro Social

INMEGEN Instituto Nacional de Medicina Genómica

ITS *Internal Transcribed Spacer*/Espaciador Transcrito Interno

LDA Análisis discriminante lineal

LDL-ox Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

LEfSe *Linear discriminant analysis effect size*

NGS *Next generation sequencing*/Secuenciación de próxima generación

NO Óxido nítrico

PA Presión arterial

PAD Presión arterial diastólica

PAS Presión arterial sistólica

PCo Coordenada principal

PCoA Análisis de coordenadas principales

PCR *Polymerase chain reaction*/Reacción en cadena de la polimerasa

PERMANOVA Análisis de varianza multivariante permutacional

pHTN Prehipertensos

PICRUST *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*

QIIME *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

R Ratas Dahl resistentes a la sal

RESCRIPt *REference Sequence annotation and CuRatlon Pipeline*

S Ratas Dahl sensibles a la sal

SCFA *Short-chain fatty acid*/Ácido graso de cadena corta

SRAA Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TMAO N-óxido de trimetilamina

TSS *Total-sum scaling*

Usec Unidad de Secuenciación

WKY Wistar-Kyoto

Resumen

La hipertensión arterial (HTA) es un problema de salud pública que afecta principalmente a adultos mayores, con una prevalencia del 30.2 % en México. A pesar de que el 70.7 % de los pacientes con diagnóstico de HTA cuenta con tratamiento farmacológico, solo la mitad mantiene niveles adecuados de presión arterial (PA). Debido al envejecimiento demográfico actual, se espera que estas cifras incrementen en los próximos años. Actualmente se sabe que la HTA tiene un origen multifactorial que involucra factores de riesgo tanto genéticos como ambientales. Aunque recientemente se ha demostrado que alteraciones en la microbiota intestinal podrían estar asociadas con la HTA, su impacto no ha sido caracterizado a detalle. El objetivo de este estudio fue identificar diferencias en la diversidad y composición bacteriana de la microbiota intestinal de hipertensos con PA controlada *versus* hipertensos con PA no controlada, así como llevar a cabo la primera caracterización reportada de la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos.

Se incluyeron 81 pacientes adultos mayores, de sexo femenino o masculino, hipertensos bajo tratamiento farmacológico pertenecientes a la Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en Adultos Mayores Mexicanos (COSFAMM) de la Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de los cuales 61 individuos (75.3 %) fueron clasificados como hipertensos con PA controlada y 20 individuos (24.7 %) como hipertensos con PA no controlada. A partir de muestras de materia fecal se extrajo ADN y se prepararon bibliotecas de secuenciación de las regiones V3-V4 del gen bacteriano ARNr 16S. El análisis bioinformático de los datos de secuenciación se llevó a cabo en QIIME 2 versión 2021.8, y el análisis estadístico en R versión 4.2.0.

Se observó una disminución significativa en la diversidad alfa en hipertensos con PA no controlada, lo cual se ha reportado previamente en pacientes con HTA sin tratamiento farmacológico y podría indicar que la falta de eficacia del tratamiento farmacológico antihipertensivo conlleva a una microbiota intestinal característica de estados de enfermedad. Además, se identificó abundancia diferencial en tres géneros bacterianos, aunque la significancia estadística no se conservó tras la corrección por el método FDR. Los SCFAs, así como taxones productores de SCFAs se han asociado comúnmente con la disminución de los niveles de PA en pacientes hipertensos, sin embargo, en este estudio los géneros *Marvinbryantia* y grupo *Lachnospiraceae FCS020*, productores de SCFAs, se encontraron enriquecidos en hipertensos con PA controlada.

Las observaciones derivadas de este estudio sugieren que la diversidad y composición de la microbiota intestinal bacteriana difiere entre hipertensos con PA controlada e hipertensos con PA no controlada bajo tratamiento farmacológico. Esto marca una pauta para ampliar el presente estudio, confirmar los resultados encontrados y profundizar en el conocimiento de la asociación entre microbiota intestinal y el control de la PA.

1. Marco teórico

1.1. Envejecimiento de la población o tercera transición demográfica

Desde la segunda mitad del siglo XX la humanidad padece uno de los mayores fenómenos globales: el envejecimiento de la población o tercera transición demográfica. Esta transición consiste en una disminución de la fertilidad femenina, una mayor tasa de supervivencia infantil, una longevidad prolongada y un rápido incremento en la proporción de adultos mayores. Sus principales causas son las mejores condiciones de vida, servicios de salud y educación con que se cuenta actualmente^{1,2}.

A nivel mundial se estima que la proporción de adultos mayores se duplicará en los próximos años, del 8.5 % en 2015 a 16.7 % en 2050³, mientras en México se estima que este sector crecerá del 6.8 % al 16.8 % en el mismo periodo⁴. Esto representa una problemática primordial en salud pública, pues la adaptación que duró más de un siglo en países altamente desarrollados como Francia, está sucediendo en tan sólo dos décadas en México y en otros menos desarrollados, donde se concentrará más del 80 % del total de adultos mayores a nivel mundial⁵.

El incremento en la frecuencia de individuos sexagenarios supone como reto su inclusión en actividades tanto sociales como económicas con el fin de fomentar un desarrollo sustentable del país. Para lograrlo, dicho sector debe ser autosuficiente, lo que implica mantener una salud óptima hasta edades avanzadas, y, por tanto, ahondar en su caracterización para generar estrategias encaminadas a un envejecimiento saludable^{5,6}.

Contrario a los objetivos, poca evidencia señala que los adultos mayores en la actualidad sean más saludables de lo que lo fueron sus padres a la misma edad¹. Esto se refleja en la alta prevalencia de enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes y artritis que se reporta en los individuos que se encuentran en esta etapa de la vida. Esto supone uno de los principales desafíos económicos a los que se enfrenta México, pues este tipo de padecimientos suele involucrar cuidados a largo plazo, y provocar enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, cuyos costos deben ser cubiertos, no sólo por el gobierno, sino por la sociedad en general^{6,7}. Esto resalta la importancia de tomar acciones tan rápido como sea posible para enfrentar de la mejor manera este drástico cambio social.

1.2. Hipertensión arterial

Definición y epidemiología

La hipertensión arterial (HTA), definida como una presión arterial sistólica (PAS) \geq 140 mm Hg y/o una presión arterial diastólica (PAD) \geq 90 mm Hg, es la afección crónica más común y el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (enfermedad coronaria e insuficiencia

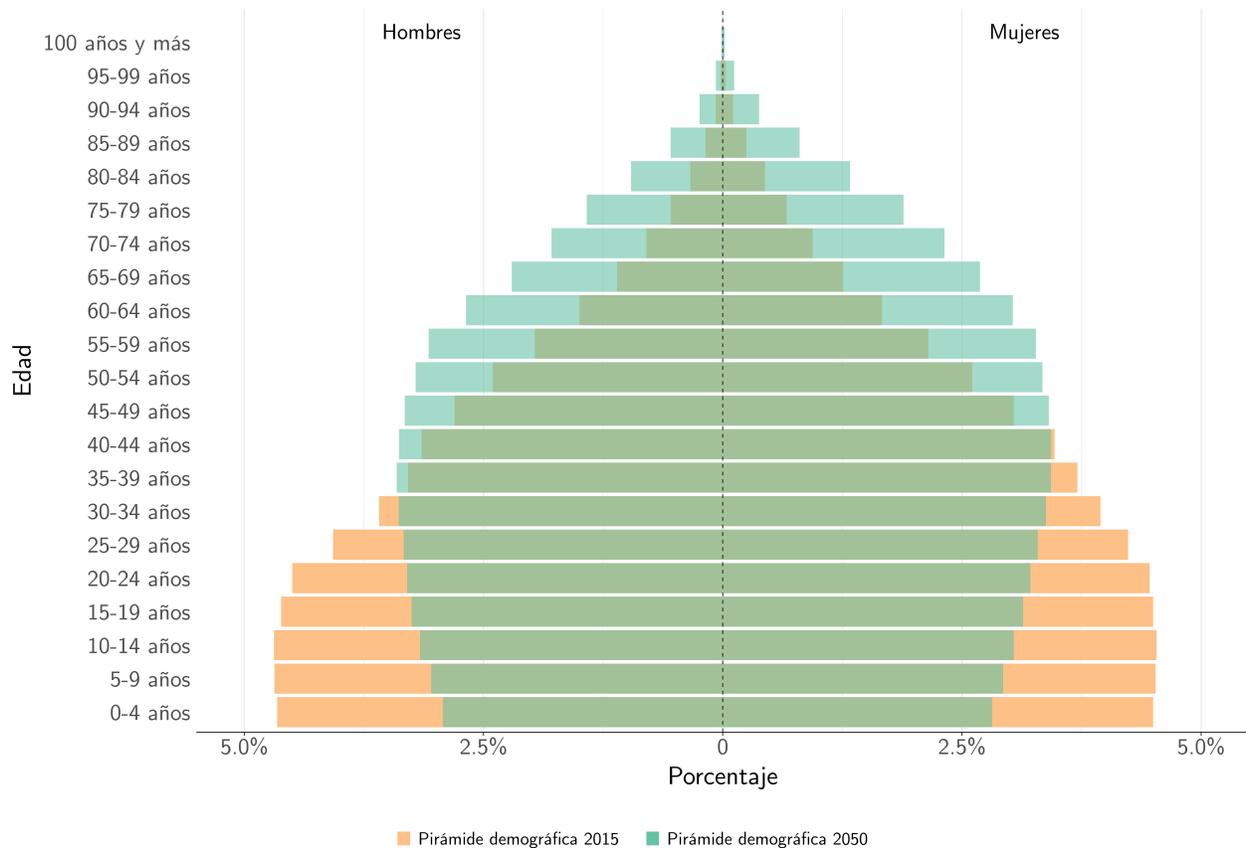


Figura 1: Pirámide demográfica: 2015 y 2050. Estimaciones del cambio en la estructura poblacional mexicana entre el año 2015 y 2050. Fuente: CONAPO. Conciliación Demográfica de México 1950-2015 y Proyecciones de la Población de México y de las Entidades Federativas, 2016-2050.

cardiaca) y cerebrovasculares (derrame cerebral), las cuales se consideran las primeras causas de muerte a nivel mundial⁸⁻¹¹.

La presión arterial (PA) incrementa con la edad, por lo que con el envejecimiento poblacional actual se espera que la prevalencia mundial de 1130 millones de hipertensos, reportada para el año 2015, aumente considerablemente en las próximas décadas, siendo los principales afectados los países subdesarrollados y en vías de desarrollo como México^{9,11}, donde el 30.2% de la población sufre HTA, según lo reportado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 (ENSANUT 2020)¹².

Fisiopatología de la hipertensión arterial

La fisiopatología de la HTA involucra una serie de complejos mecanismos interrelacionados que contribuyen al aumento y manteniendo de la PA. Comprender estos mecanismos es esencial para tener un mayor entendimiento de la enfermedad. A continuación se mencionan los principales componentes fisiopatológicos de la HTA:

Gasto cardíaco y resistencia vascular periférica

Uno de los rasgos distintivos de la HTA es el incremento en la influencia de iones Ca^{2+} a través de los

canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje que se encuentran en células musculares lisas vasculares y miocitos, lo cual promueve el desarrollo de un tono vascular anormal, tendiente a la vasoconstricción, y una elevada resistencia vascular periférica, factores que causan aumento en los niveles de PA^{13,14}.

Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es un mecanismo complejo que juega un papel importante en la conservación de la estabilidad hemodinámica del cuerpo humano mediante la regulación de la PA y el balance hidroelectrolítico. Por tanto, defectos en este mecanismo pueden contribuir a la patogénesis de la HTA¹⁵.

La cascada hormonal clásica del SRAA comienza con la producción de renina por las células yuxtaglomerulares del riñón, la cual convierte el angiotensinógeno, sintetizado principalmente en el hígado, en angiotensina I. La angiotensina I es transformada por la enzima convertidora de angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II puede unirse a dos receptores, AT_1 y AT_2 , generando efectos opuestos. La interacción con el receptor AT_1 promueve vasoconstricción, liberación de aldosterona y de vasopresina, así como retención de agua y sodio, lo que conduce al incremento de la PA. Mientras que la interacción con el receptor AT_2 provoca vasodilatación, lo cual conlleva a la disminución de la PA¹⁵⁻¹⁷.

Sistema nervioso autónomo

Como parte del sistema nervioso autónomo, el sistema nervioso simpático tiene un papel primordial en la patogénesis de la HTA, en gran medida por la activación de los nervios simpáticos renales. Existe una amplia inervación de las venas sanguíneas renales, el aparato yuxtaglomerular y los túbulos renales. La activación excesiva de estos nervios tiene como consecuencia el aumento en la retención de sodio, el incremento en la secreción de renina y la desregulación en la excreción renal de sodio, lo cual puede inducir el incremento en los niveles de PA. Actualmente, los mecanismos que provocan la activación de los nervios simpáticos renales en la HTA continúan siendo estudiados¹⁷.

Por otra parte, la epinefrina (adrenalina) y norepinefrina (noradrenalina), neurotransmisores más importantes del sistema nervioso simpático, también participan en la regulación de la PA. La norepinefrina produce vasoconstricción e hipertensión diastólica por estimulación de receptores α -adrenérgicos, mientras que la epinefrina provoca estimulación cardíaca con hipertensión sistólica y taquicardia al interactuar con receptores β -adrenérgicos^{13,17}.

Disfunción endotelial y sustancias vasoactivas

Las células del endotelio vascular juegan un papel clave en la regulación cardiovascular mediante la producción de un considerable número de potentes agentes vasoactivos locales. Por tanto, la disfunción del endotelio está implicada en la patogénesis de la HTA¹³. Las principales sustancias vasoactivas derivadas del endotelio que actúan como mecanismos de regulación de la PA son endotelina-1, cuya interacción con los receptores de endotelina A de las células musculares lisas vasculares causa vasodilatación, desregulación en la excreción renal de sodio e incremento de la PA; y óxido nítrico (NO), importante vasodilatador, cuya inhibición provoca deficiencia en la excreción renal de sodio así como elevación de la PA. Otro importante agente vasoactivo, producido en los ventrículos, es el péptido auricular natriurético, el cual produce vasodilatación arterial, excreción renal de sodio, e inhibición del SRAA, del sistema nervioso autónomo y de endotelina-1¹⁸.

Tratamiento farmacológico antihipertensivo y falla terapéutica

En México, el tratamiento de la HTA se basa inicialmente en la evaluación de riesgo cardiovascular, daño a órgano blanco y presencia de comorbilidades basado en pruebas bioquímicas y clínicas. Ante la ausencia de enfermedades adyacentes y un riesgo cardiovascular bajo o medio se opta por un tratamiento no farmacológico enfocado a la modificación del estilo de vida del paciente. Si lo anterior no funciona o el riesgo cardiovascular es alto, se recurre al tratamiento farmacológico, como monoterapia, con alguno de los antihipertensivos de primera línea: diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (IECA), antagonistas de los receptores AT₁ de angiotensina II (ARA II), bloqueadores de canales de calcio (BCC) o β – bloqueadores (**Tabla 1**).

Los fármacos antihipertensivos se prescriben inicialmente en dosis bajas, las cuales, dependiendo de la respuesta y niveles de PA, se incrementan gradualmente hasta alcanzar la dosis máxima. Cuando lo anterior no conlleva a la meta terapéutica, se cambia la clase farmacológica del antihipertensivo y como último recurso, ante la persistencia del problema, se añade un segundo, tercer o hasta cuarto fármaco antihipertensivo al régimen. Sin embargo, en muchos casos, incluso con el uso de dos o más antihipertensivos, los niveles de PA no logran controlarse^{19,20}.

Tabla 1: Mecanismo de acción de los fármacos antihipertensivos de primera línea

Fármaco antihipertensivo	Mecanismo de acción
Diuréticos	Inhiben la reabsorción de iones sodio y cloro de los túbulos contorneados distales en los riñones ²¹
β -bloqueadores	Son antagonistas competitivos que bloquean los sitios receptores para epinefrina y norepinefrina en los receptores β -adrenérgicos ²¹
IECA	Bloquean la conversión de angiotensina I a angiotensina II provocando vasodilatación y decremento de la PA ²¹
ARA II	Bloquean directamente los receptores AT ₁ de angiotensina II ²¹
BCC	Interrumpen el movimiento de calcio a través de los canales de calcio presentes en el músculo cardíaco y en las arterias periféricas ²¹
α -bloqueadores	Inhiben la unión de norepinefrina a los receptores adrenérgicos α_1 en las células musculares lisas vasculares ²¹

Las cifras indican que en México 70.7 % de los pacientes con diagnóstico de HTA cuenta con tratamiento farmacológico, sin embargo, sólo la mitad logra la meta terapéutica PA¹². Hasta el momento se sabe que algunos de los factores involucrados con esta falta de control o falla terapéutica son:

- Estilo de vida. Hábitos como el tabaquismo, alcoholismo y consumo de cafeína suelen causar elevación de la PA del paciente²².
- Falta de adherencia al tratamiento farmacológico. El paciente no toma el medicamento prescrito, o si lo hace ingiere una dosis mayor, menor o en horarios equívocos, lo cual conlleva a falla terapéutica y por tanto, a la falta de control sobre los niveles de PA^{23,24}.
- Polifarmacia. Es común en pacientes con multimorbilidad, generalmente adultos mayores, el uso de

múltiples fármacos. Esto puede provocar interacciones medicamentosas que inhiben el mecanismo de acción del o los antihipertensivos empleados, o bien, alguna de las sustancias involucradas puede tener efecto, por sí misma, sobre los niveles de PA^{22,25}.

- Factores genéticos y farmacogenéticos. Estudios que versan sobre HTA han identificado genes involucrados con la homeostasis hidroelectrolítica, la estructura y regulación del tono vascular, que tienen relación directa con los niveles de PA²⁶. Mientras que en farmacogenómica se ha visto que la presencia de polimorfismos en ciertos genes tiene efecto sobre la eficacia de algunos agentes antihipertensivos. Como ejemplo de ello se tiene la asociación de NEDD4L con los diuréticos tiazídicos, así como de ADRB1 con los β -bloqueadores²⁷.

Sin embargo, estas causas no son investigadas para cada paciente y aunque lo fueran, no existen estrategias de solución para la mayoría de ellas. Por lo que es preciso ahondar más en las posibles causas y factores involucrados con este fenómeno, pues los pacientes cuyos niveles elevados de PA persisten, se mantienen en alto riesgo de sufrir daño vascular, discapacidad e incluso la muerte^{24,28,29}.

1.3. Microbiota humana

El cuerpo humano, al igual que el del resto de los mamíferos, se encuentra habitado por comunidades de microorganismos, las cuales al encontrarse en un equilibrio dinámico y simbiótico con su hospedero son esenciales para su funcionamiento normal. Mientras que al conjunto de bacterias, arqueas, hongos, protozoarios y virus encontrado dentro y sobre el cuerpo humano se le conoce como microbiota humana, al genoma que albergan en conjunto dichos microorganismos se le denomina microbioma humano^{8,30}.

Se calcula que hay de dos a 20 millones de genes microbianos asociados con el cuerpo humano, es decir, exceden al menos 100 veces los aproximadamente 20,000 genes humanos³¹. Debido a esto, la microbiota hace vitales contribuciones a la homeostasis energética, metabolismo, salud del epitelio intestinal, actividad inmunológica y neurodesarrollo del individuo³⁰.

Aunado a lo anterior, la microbiota se caracteriza por estar en constante cambio. Esto se debe al propio proceso de crecimiento y desarrollo que sufren los individuos, de modo que la diversidad microbiana aumenta durante la infancia y tiende a disminuir con edades avanzadas. Sin embargo, la edad no es el único factor que produce variaciones en la microbiota, factores como dieta, ejercicio, tabaquismo, alcoholismo, uso de antibióticos, la presencia de alguna enfermedad y el embarazo también pueden modificar su composición y estructura^{8,32}.

Microbiota intestinal

La microbiota humana se encuentra distribuida de manera diferencial en todo el organismo. Múltiples estudios han mostrado que cada individuo posee una microbiota única y que de igual manera, cada sitio del cuerpo alberga comunidades microbianas únicas⁸. En este sentido, la microbiota intestinal es una de las más ampliamente caracterizadas en lo que respecta a su composición bacteriana, siendo representada por *Firmicutes* y *Bacteroidota*, y en menor grado por *Actinobacteriota* y *Proteobacteria* a nivel de filo, mientras que *Prevotella*, *Bacteroides* y/o *Ruminococcus* son abundantes a nivel de género^{32,33}.

En cuanto a su papel en la fisiología humana, la microbiota intestinal contribuye en el metabolismo de fibras dietéticas que las enzimas humanas no pueden digerir. También impide la invasión de patógenos, contribuye a la educación y estimulación del sistema inmune, al mantenimiento de la homeostasis e integridad del epitelio intestinal, a la síntesis de vitamina B y vitamina K, y a la mejora en la funcionalidad y motilidad del tracto gastrointestinal⁸.

En los últimos años, cambios en su composición se han relacionado con fisiopatologías como diabetes, cáncer, trastornos intestinales, enfermedades hepáticas, condiciones inmunes, síndrome metabólico e HTA³², por lo que centrarse en su estudio continúa resultando relevante.

Microbiota intestinal en adultos mayores

La microbiota sufre cambios con la edad. Estudios recientes han reportado claras diferencias entre la microbiota intestinal de bebés, niños, adultos y ancianos³⁴. Una de las variaciones más significativas en su composición ocurre en la transición de la edad adulta a la vejez³⁵. Esta transformación tiene origen tanto en los cambios fisiológicos como en la modificación que suele haber en la dieta del adulto mayor debido a la pérdida de dientes, disminución en su habilidad para masticar, detrimento de su sentido del gusto, y reducción de la motilidad intestinal que deriva en un tránsito intestinal lento y en la alteración del intercambio de nutrientes. Otros cambios fisiológicos importantes que se han relacionado con la variación de la microbiota intestinal en esta edad son la inmunocenesencia, que es el proceso de disfunción inmunológica que ocurre con la edad, y el fenómeno conocido como *inflamm-aging*, que se refiere a la inflamación sistémica de bajo grado que acompaña al envejecimiento, la cual se debe a una reducción global en la capacidad del organismo para enfrentar factores estresantes^{36,37}.

Mientras algunos estudios sobre microbiota intestinal y envejecimiento han reportado que en comparación con adultos jóvenes, los adultos mayores presentan una reducción en la diversidad del ecosistema intestinal, otros reportan un aumento en dicha diversidad^{34,38}. No obstante, todos coinciden en el incremento en la colonización de especies oportunistas y patobiontes (simbiontes del tracto gastrointestinal con potencial patogénico), incluyendo estreptococos, estafilococos, enterobacterias y enterococos, lo cual se ha atribuido al proceso de inmunosenescencia. Adicionalmente, hay reordenamientos en la población de microorganismos sacarolíticos y proteolíticos, como *Firmicutes* y *Bacteroidota*, y disminución en bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés), en particular butirato, como *Faecalibacterium*, *Coprococcus* y *Roseburia*³⁹. Cabe señalar que estos metabolitos se conocen por sus efectos benéficos sobre la salud, incluyendo su capacidad anti-inflamatoria^{35,36}.

Los cambios mencionados tienden a estar relacionados con factores de riesgo para la salud de individuos en edades avanzadas, por lo que modular la microbiota intestinal resulta una de las principales estrategias para mantener un estado de salud favorable en este creciente sector de la población. En la actualidad, se ha propuesto el uso de prebióticos y probióticos como estrategia para disminuir los efectos adversos que pueda tener la modificación de la microbiota intestinal. En este sentido, múltiples estudios clínicos han mostrado que su utilización incrementa la producción de SCFA y mejora la respuesta del sistema inmune, lo cual tiene un impacto positivo sobre la salud de los individuos. Pese a ello, aún falta comprender más la relación entre microbiota intestinal y envejecimiento, de modo que las intervenciones médicas que se hagan sean racionales y no sólo producto de un conocimiento empírico^{35,36}.

Microbiota intestinal e hipertensión arterial

La regulación de la PA es un proceso complejo en el que participan múltiples sistemas fisiológicos influenciados por factores tanto ambientales como genéticos^{8,40}. Aunque se sabe que la interacción entre estos factores forma parte de la etiología de la HTA, las causas precisas de esta morbilidad aún no han sido elucidadas por completo⁴¹. Estudios recientes sugieren que la microbiota intestinal interviene en la regulación de la PA y que alteraciones en su composición contribuyen al desarrollo y progresión de la HTA^{8,40}.

En 1982, se demostró que el tratamiento con antibióticos podía producir una elevación en la PA, lo que implicaba la probable relación entre microbiota intestinal y la regulación de la PA^{42,43}, confirmado por investigaciones posteriores. En el estudio de Yang et al. (2015)⁴⁴ en ratas espontáneamente hipertensas, se observó una disminución en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal, así como un marcado incremento en la relación *Firmicutes/Bacteroidota* (F/B), sugiriendo que alteraciones en la microbiota intestinal se asociaban con la HTA.

Otro estudio mostró que ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) al ser trasplantadas con la microbiota intestinal de ratas hipertensas presentaban un incremento significativo tanto en su PAS como en la relación F/B en comparación con las ratas WKY normotensas^{45,46}.

En concordancia, otro experimento reportó que ratas Dahl sensibles a la sal (S) en comparación con ratas Dahl resistentes (R), tenían una abundancia significativamente mayor de las familias *S24-7* y *Veillonellaceae* de los filos *Bacteroidota* y *Firmicutes*, respectivamente, además que las ratas S en las que se hacía trasplante de microbiota intestinal de ratas R presentaban una mayor PA que aquellas que recibían microbiota intestinal de ratas S^{46,47}.

Aunque los estudios en animales han dilucidado cierta relación entre la microbiota intestinal y la HTA, las investigaciones en humanos continúan siendo pocas y en su mayoría observacionales (Tabla 2). Por mencionar algunas de estas investigaciones, Yang et al. (2015)⁴⁴ para corroborar la asociación entre microbiota intestinal e HTA encontrada en ratas WKY, realizaron el análisis de la composición de la microbiota intestinal de 10 pacientes con PAS normal (119 ± 2 mmHg) y siete pacientes con PAS elevada (144 ± 9 mmHg), encontrando una disminución en la riqueza y una alteración en la composición de la microbiota en los individuos hipertensos comparados con los normotensos⁴⁰. Asimismo, otra investigación realizada en China^{40,41}, en la que se examinó la composición de la microbiota intestinal de 196 pacientes

clasificados como controles sanos, prehipertensos (pHTN) e hipertensos (HTN) demostró que la riqueza y diversidad microbiana decrece dramáticamente en los grupos pHTN e HTN en comparación con los controles sanos. Aunado a ello, los géneros *Prevotella* y *Klebsiella* se encontraron enriquecidos en pHTN e HTN, *Porphyromonas* y *Actinomyces* sólo en HTN, y *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus* y *Butyrivibrio* en los controles sanos. Estos últimos géneros se caracterizan por ser esenciales para mantener un estado saludable.

Los estudios realizados hasta el momento sobre microbiota intestinal confirman que la HTA está asociada con alteraciones en su composición y diversidad. Sin embargo, los estudios no sólo deben centrarse en qué microorganismos se encuentran o no en el intestino, sino también en qué metabolitos bioactivos están siendo secretados por los microorganismos presentes. Actualmente se sabe que son tres los principales metabolitos microbianos asociados con la HTA:

- SCFA. Son resultado del proceso de fermentación que realiza la microbiota intestinal sobre la fibra proveniente de la dieta. Su principal acción relacionada con la patogénesis de la HTA es ejercida sobre receptores acoplados a proteína G expresados en los riñones, cuya estimulación puede regular rutas metabólicas que afectan la secreción de renina y por ende la PA^{8,43,48,49}.
- Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox). Alteraciones en la microbiota intestinal pueden promover la expresión de citocinas pro-inflamatorias e inducir estrés oxidativo, lo que puede estimular la producción de LDL-ox. Estudios han mostrado que altos niveles de LDL-ox contribuyen a la HTA al inhibir la generación de NO y endotelina-1. El NO es un conocido vasodilatador producido mediante la oxidación de L-arginina por la NO sintasa, de modo que al provocar una reducción en los niveles de NO, las LDL-ox disminuyen el grado de vasodilatación. La endotelina-1 a bajas concentraciones tiene efectos vasodilatadores al activar el receptor endotelial B y promover la producción de NO, sin embargo, causa vasoconstricción a altas concentraciones al incrementar la producción de LDL-ox y activar el receptor endotelial A⁴³.
- N-óxido de trimetilamina (TMAO por sus siglas en inglés). La microbiota intestinal metaboliza la colina, fosfatidilcolina y L-carnitina provenientes de la dieta, principalmente huevo y carnes rojas, para producir trimetilamina, la cual es posteriormente oxidada a TMAO por acción de la microbiota intestinal^{8,43,50}. Se ha visto que en individuos que poseen altas concentraciones de TMAO circulante el riesgo de sufrir HTA incrementa un 12 % en comparación con individuos con bajas concentraciones del metabolito⁵¹.

Microbiota intestinal y fármacos antihipertensivos

Desde finales de los años 50 los investigadores han sabido que la microbiota intestinal afecta el modo en que los fármacos, y xenobióticos en general, son metabolizados. Estudios recientes realizados con levodopa, irinotecán y digoxina han mostrado que la microbiota intestinal tiene una relación directa con su eficacia al convertirlos en metabolitos activos, inactivos e incluso tóxicos^{52,53}.

Tabla 2: Estudios sobre hipertensión arterial y microbiota intestinal en humanos

Estudio	País	Año	n	Principales hallazgos
Kang <i>et al.</i> ⁵⁴	China	2023	125	Diferencias significativas en la diversidad alfa y beta de hipertensos controlados e hipertensos no controlados. Los géneros bacterianos <i>Streptococcus</i> y <i>Akkermansia</i> podrían funcionar como predictores del control a largo de plazo de los niveles de PA en pacientes con HTA.
Wang <i>et al.</i> ⁵⁵	China	2021	1,082	Asociación entre la microbiota intestinal y metabolitos plasmáticos con la PA, sugiriendo un posible papel de ambos factores en la regulación de la PA. Asociación positiva de varios metabolitos lipídicos con la PA.
Verhaar <i>et al.</i> ⁵⁶	Países Bajos	2020	4,672	Asociación entre la composición de la microbiota intestinal y la PA, con marcadas diferencias entre grupos étnicos. Asociación de mayor abundancia de bacterias productoras de SCFAs con menores niveles de PA, así como con menores niveles de SCFAs en heces.
Silveira-Nunes <i>et al.</i> ⁵⁷	Brasil	2020	80	Diferencia significativa en la composición de la microbiota intestinal de hipertensos y normotensos. Asociación de los cambios con niveles elevados de marcadores de inflamación en hipertensos. Mayor proporción de los géneros bacterianos <i>Lactobacillus</i> y <i>Akkermansia</i> en hipertensos, así como menor proporción de bacterias comensales productoras de butirato como <i>Roseburia</i> y <i>Faecalibacterium</i> .
Palmu <i>et al.</i> ⁵⁸	Finlandia	2020	6,953	Asociación negativa de algunas especies del género bacteriano <i>Lactobacillus</i> , entre las que destacó el probiótico <i>Lactobacillus paracasei</i> , con los niveles de PA y el consumo de sodio.
Calderón-Pérez <i>et al.</i> ⁵⁹	España	2020	61	Abundancia diferencial en algunas especies bacterianas entre hipertensos y normotensos. Niveles mayores de SCFAs en heces y menores en plasma en hipertensos, sugiriendo una menor eficiencia de absorción de SCFAs en estos pacientes.
Takagi <i>et al.</i> ⁶⁰	Japón	2020	239	Asociación de cambios en la microbiota intestinal con HTA, hiperlipidemia y diabetes <i>meliitus</i> tipo 2. Mayor abundancia del filo bacteriano <i>Actinobacteria</i> y menor abundancia del filo <i>Bacteroidetes</i> en todos los grupos de enfermedades.
Chang <i>et al.</i> ⁶¹	China	2020	63	Diferencia significativa en la diversidad de la microbiota intestinal de mujeres con preeclampsia, así como abundancia diferencial en distintos filos y géneros bacterianos en comparación con mujeres embarazadas sanas. Niveles más bajos de SCFAs en heces en mujeres con preeclampsia.
Kim <i>et al.</i> ⁶²	Brasil	2020	30	Cambios significativos en la microbiota intestinal de pacientes con HTA pulmonar, tanto a nivel taxonómico como funcional, en comparación con controles sanos. Diferencia significativa en géneros bacterianos productores de butirato y propionato.
Sun <i>et al.</i> ⁶³	EUA	2019	529	Asociación negativa de HTA y PA sistólica con diversidad alfa. Hipertensos presentan diversidad beta distinta con respecto a normotensos. Asociación de varios géneros bacterianos con HTA y PA sistólica.

HTA: Hipertensión arterial; PA: Presión arterial; SCFA: Ácidos grasos de cadena corta

Tabla 2: Continuación

Estudio	País	Año	n	Principales hallazgos
Mushtaq <i>et al.</i> ⁶⁴	China	2019	80	Mayor diversidad alfa en hipertensos en comparación con controles sanos. Diferencia significativa en la abundancia de <i>Prevotella 9</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Parasutterella</i> , <i>Escherichia-Shigella</i> , <i>Bacteroides</i> y <i>Faecalibacterium</i> al comparar ambos grupos.
Dan <i>et al.</i> ¹⁰	China	2019	129	Diferencia significativa en la abundancia de varios géneros bacterianos al comparar hipertensos, pacientes con HTA sistólica aislada y pacientes con HTA diastólica aislada con normotensos. La abundancia microbiana se ve influenciada por y se correlaciona con la PA.
Li <i>et al.</i> ⁶⁵	China	2019	235	Pacientes con HTA e hiperlipidemia presentan una disbiosis significativa en la microbiota intestinal en comparación con controles sanos. La microbiota intestinal relacionada con estas enfermedades podría consistir en una gran cantidad de taxones que se están influenciando mutuamente en una red metabólica compleja.
Huart <i>et al.</i> ⁶⁶	Bélgica	2019	54	Correlación del género bacteriano <i>Clostridium sensu stricto</i> con los niveles de PA en hipertensos sin tratamiento. Niveles de SCFAs significativamente elevados en hipertensos en comparación con normotensos. Correlación entre metaboloma fecal y niveles de PA durante 24 h.
Zuo <i>et al.</i> ⁶⁷	China	2019	49	Diferencia significativa en los niveles de vitamina D3 en hipertensos comparados con normotensos. Correlación de niveles de vitamina D3 con diversidad alfa y con géneros bacterianos reducidos en hipertensos. La disbiosis de la microbiota intestinal presente en hipertensos podría estar mediada parcialmente por la deficiencia de vitamina D3.
Kim <i>et al.</i> ⁶⁸	EUA	2018	40	Niveles elevados del factor de unión de ácidos grasos intestinales, lipopolisacáridos y células Th17 proinflamatorias, indicadores de inflamación y permeabilidad intestinal, así como de zonulina, indicador de disfunción de la barrera intestinal, en hipertensos. Relación entre disfunción de la barrera intestinal y la microbiota intestinal con HTA.
Han <i>et al.</i> ⁶⁹	China	2018	196	Diferencia significativa en la composición del viroma intestinal entre hipertensos y prehipertensos en comparación con normotensos. Es posible que los virus permitan una mayor resolución y poder de discriminación que las bacterias para la diferenciación de los tres distintos grupos.
Yan <i>et al.</i> ⁵⁰	China	2017	120	Diferencia significativa en la diversidad alfa y composición de la microbiota intestinal de hipertensos en comparación con controles sanos. Mayor presencia de patógenos oportunistas en hipertensos, y mayor distribución de bacterias productoras de SCFAs en controles sanos.
Li <i>et al.</i> ⁴¹	China	2017	196	Diferencia en la composición de la microbiota intestinal de hipertensos en comparación con normotensos, con diversidad reducida y alteración en las vías metabólicas bacterianas. El trasplante fecal de hipertensos a ratones gnotobióticos inducen HTA, posible indicador de una relación causal entre disbiosis intestinal e HTA.

HTA: Hipertensión arterial; PA: Presión arterial; SCFA: Ácidos grasos de cadena corta

El arsenal de genes que alberga la microbiota intestinal la convierten en un amplio repositorio enzimático con potencial para metabolizar fármacos administrados oralmente, principalmente a través de dos principales tipos de reacciones: reducción e hidrólisis, particularmente en conjugados de fase II de metabolismo hepático⁷⁰. Las enzimas involucradas en estas reacciones mediadas por la microbiota intestinal son β -glucosidasas, β -glucuronidasas, sulfatasas, azorreductasas, nitrorreductasas y nitrato reductasas⁷¹, aunque también se han descrito descarboxilaciones, deshidroxilaciones, desalquilaciones, deshalogenaciones y desaminaciones⁷².

En la actualidad, son pocos los estudios que demuestran el efecto de la microbiota sobre los fármacos antihipertensivos. A mencionar, se ha visto que la incubación ex-vivo de amlodipino, un antihipertensivo de la clase BCC, con suspensiones fecales de rata o de humano provoca un decremento en la concentración del fármaco y un aumento en la concentración de su metabolito mayoritario. Aunado a ello, también en ratas, se observó que la administración oral simultánea del antihipertensivo amlodipino y el antibiótico ampicilina provocaba una mejor absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal debido a la supresión de la actividad metabólica de la microbiota intestinal. Con estos resultados es posible deducir que la microbiota intestinal puede mediar interacciones fármaco-fármaco y que una alteración en su composición puede derivar en una variación en el control farmacológico de la PA^{70,72,73}. En apoyo a esto, en otro estudio se comprobó que hay fármacos que son metabolizados por al menos un microorganismo del tracto gastrointestinal, entre dichos fármacos se encontraban antihipertensivos como verapamil, valsartán y olmesartán⁵³.

No obstante, la interacción entre microbiota intestinal y fármacos es bidireccional, es decir, también los fármacos pueden tener impacto sobre la microbiota, claro ejemplo de ello son los antibióticos como la ampicilina mencionada anteriormente. De igual manera, este fenómeno ha sido poco descrito para los antihipertensivos. En un estudio en el que se trató a ratas hipertensas con captopril, antihipertensivo de la clase de los IECA, se observó una reversión de la alteración de la microbiota intestinal asociada con la HTA debida a una disminución en la permeabilidad y fibrosis intestinal, así como a una mejora en la longitud de las vellosidades del tracto gastrointestinal⁷⁰.

Aún se necesita estudiar a detalle estas interacciones para determinar la relación exacta entre microbiota intestinal e HTA y todavía más para saber cuál es el impacto que dicha relación puede tener sobre los fármacos antihipertensivos⁷⁰.

Microbiota intestinal y métodos de estudio

A lo largo del tiempo, múltiples métodos han sido utilizados para estudiar la microbiota intestinal. Los primeros estudios usaban técnicas tradicionales de cultivos bacterianos, seguidas por la identificación de los microorganismos a partir de sus características morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, la mayoría de las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal son anaerobias, por lo que este método al favorecer el crecimiento de organismos aerobios, subestima significativamente la diversidad presente en el intestino⁷².

Con el avance de la tecnología, a finales del siglo XX se desarrollaron técnicas moleculares que han permitido estudiar la microbiota desde otra perspectiva: su genoma, superando así las limitaciones de los métodos tradicionales⁷⁴. Actualmente, la secuenciación genómica es la técnica más utilizada y su

constante mejoramiento ha permitido tener un mayor conocimiento sobre la composición y funciones de la microbiota intestinal y de la microbiota en general, así como del papel que juega dentro de la fisiología y homeostasis del hospedero⁸.

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

- Metataxonómica. Se refiere a la secuenciación de genes marcadores, usualmente regiones de los genes ribosomales (ARNr) que se encuentran altamente conservadas entre taxones. Estos incluyen al gen ARNr 16S de bacterias, gen ARNr 18S de eucariotas y a la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*/Espaciador Transcrito Interno) en hongos⁷⁵. Es utilizada para caracterizar la composición filogenética microbiana de una muestra⁸.
- Metagenómica. Se refiere a la secuenciación masiva aleatoria de ADN (ácido desoxirribonucleico) microbiano o *shotgun*, por el término en inglés, sin seleccionar un gen en particular^{75,76}. Este tipo de análisis identifica todos los genomas microbianos co-existentes en un mismo sitio junto con sus posibles funciones biológicas⁸.
- Metatranscriptómica. Se refiere a la captura y secuenciación del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) microbiano presente en una muestra, lo que puede ayudar a crear un perfil de todos los genes que son transcripcionalmente activos, y por ende saber cuál es su abundancia relativa⁷⁵.

Aunque hoy en día el uso de la metagenómica y la metatranscriptómica se encuentra en auge, la metataxonómica sigue siendo el análisis más utilizado y de primera elección para el estudio de la microbiota intestinal, sobre todo cuando el tema de interés se encuentra en fases iniciales de investigación. Como se mencionó anteriormente este tipo de análisis se basa en genes marcadores, siendo la base de estudio de la microbiota intestinal bacteriana el gen ribosomal bacteriano ARNr 16S^{74,75}.

El gen ARNr 16S tiene una longitud aproximada de 1500 nucleótidos con ciertas variaciones entre especies. Posee múltiples regiones altamente conservadas que se intercalan con nueve regiones hipervariables (V1 a V9). La variación de nucleótidos en estas regiones hipervariables refleja la divergencia evolutiva de las bacterias y por lo tanto, conocer su secuencia constituye un método confiable para la identificación y clasificación filogenética de estos microorganismos^{74,77}.

La principal ventaja de la identificación bacteriana basada en la secuenciación del gen ARNr 16S es que no se necesita realizar cultivos bacterianos y, por tanto, es posible detectar tanto a las bacterias que son cultivables como aquellas que no lo son. Aunado a esto, la existencia de bases de datos específicas para el gen ARNr 16S agiliza la asignación taxonómica que involucra el análisis bioinformático, ya que la cantidad de secuencias a cotejar es menor en comparación con bases de datos genómicas. Por el contrario, la principal desventaja del uso del gen ARNr 16S radica en que no permite la captura de virus, hongos y protozoarios, puesto que este gen es único de bacterias y alguna arqueas^{74,75,77}. Sin embargo, sigue siendo la herramienta más utilizada, sobre todo en estudios iniciales o exploratorios.

Cabe señalar que existen otras técnicas que no se basan en la secuenciación, como la metaproteómica, que lleva a cabo la caracterización de todo el complemento proteico presente en una muestra en un momento determinado, y la metabolómica, que realiza la determinación del perfil de metabolitos en un espécimen o tejido. Ambas técnicas también contribuyen significativamente a nuestro entendimiento de la relación entre microbiota y hospedero^{8,74}.

2. Justificación

La HTA es la principal causa de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, discapacidad y muertes prematuras en todo el mundo. Tiene una prevalencia del 30.2 % en México y afecta aproximadamente al 50 % de adultos mayores, de los cuales al menos la mitad no mantiene bajo control sus niveles de PA aún con tratamiento farmacológico. Estas cifras de prevalencia aumentarán en los próximos años como consecuencia del incremento en la expectativa de vida y en la proporción de adultos mayores en la sociedad.

Actualmente, el estudio de la falla terapéutica en la HTA se ha centrado en factores genéticos y farmacogenéticos, sin embargo, el impacto de variables como la microbiota intestinal no ha sido caracterizado a detalle. Por lo tanto, descifrar parte de las bases moleculares de esta problemática podrá, en un futuro próximo, mejorar la eficacia terapéutica, el control de la enfermedad y el desarrollo de intervenciones clínicas.

3. Objetivos e hipótesis

3.1. Hipótesis

La composición bacteriana de la microbiota intestinal de pacientes hipertensos bajo tratamiento farmacológico presentará diferencias significativas en función del control de sus niveles de presión arterial. Específicamente, se espera que los pacientes con niveles de presión arterial controlada presenten un perfil bacteriano caracterizado por una mayor diversidad y abundancia de ciertos filos/géneros previamente asociados con disminución de la presión arterial, en comparación con los pacientes con niveles de presión arterial no controlada.

3.2. Objetivo general

Determinar si existen diferencias en la diversidad y composición bacteriana de la microbiota intestinal de adultos mayores, de sexo masculino o femenino, hipertensos bajo tratamiento farmacológico clasificados según el control de sus niveles de presión arterial.

3.3. Objetivos particulares

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

4. Materiales y métodos

4.1. Población de estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo y comparativo de la microbiota intestinal bacteriana de una submuestra de pacientes de la Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en Adultos Mayores Mexicanos (COSFAMM) de la Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). La COSFAMM es un estudio longitudinal prospectivo en el que participan adultos mayores (≥ 60 años) bajo condiciones de salud heterogéneas derechohabientes del IMSS, el cual inició en 2014 con un total de 1252 participantes y en el que se recolectan datos demográficos y clínicos en intervalos anuales⁷⁸⁻⁸¹.

Los pacientes incluidos en este estudio se seleccionaron de la base de datos formada por la colaboración INMEGEN-CMN SXXI. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Ser mexicano.
- Ser adulto mayor (≥ 60 años), sexo masculino o femenino
- Tener diagnóstico previo de HTA.
- Estar bajo tratamiento farmacológico antihipertensivo.
- Haber respondido el cuestionario Morisky-Green para evaluación de adherencia a tratamiento farmacológico antihipertensivo.
- Tener al menos un registro de PA en el momento de entrega de la muestra de materia fecal.

Debido al impacto reportado sobre la microbiota intestinal⁸², los criterios de exclusión utilizados fueron los siguientes:

- Padecer cáncer.
- Hacer uso de sustancias adictivas, excepto nicotina.
- Haber usado antibióticos en los dos meses previos a la recolección de la muestra de materia fecal.
- Haber cursado con infección gastrointestinal en los tres meses previos a la recolección de la muestra de materia fecal.

La aplicación de estos criterios generó una submuestra de pacientes adultos mayores (≥ 60 años) hipertensos bajo tratamiento farmacológico.

4.2. Clasificación de la población de estudio

Uno de los objetivos de este estudio fue establecer un antecedente del posible papel que juega la microbiota intestinal en el control de la PA en pacientes con diagnóstico de HTA que ya están bajo

tratamiento farmacológico. Para ello, se clasificó a los pacientes según sus niveles de PA utilizando el punto de corte establecido por el Octavo Informe del *Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (JNC 8)⁸³:

- Hipertensos con PA controlada: Valores de PAS < 140 mmHg y valores de PAD < 90 mmHg.
- Hipertensos con PA no controlada: Valores de PAS ≥ 140 mmHg y/o valores de PAD ≥ 90 mmHg.

Otro de los objetivos del estudio fue llevar a cabo la caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos, por lo que los pacientes fueron clasificados según su edad:

- Adultos mayores de 60 a 69 años
- Adultos mayores de 70 a 79 años
- Adultos mayores de 80 años o más

Además de las clasificaciones anteriores y de los análisis que se presentarán posteriormente, se llevó a cabo un análisis complementario en el que se evaluó la posible influencia de la clasificación de los pacientes según su edad y según el control de la presión arterial en la diversidad y composición de la microbiota intestinal. Sin embargo, el tamaño de muestra de cada subgrupo generado no fue lo suficientemente representativo para obtener conclusiones significativas. Por lo tanto, la metodología y los resultados de este análisis complementario no se incluyen en la sección principal de resultados, pero se encuentran disponibles en el **Apéndice E**

4.3. Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del INMEGEN y del CMN SXXI con el número de dictamen CEI 2018/25 y R-2018-785-064, respectivamente (**Apéndice A**). Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para participar en este estudio.

4.4. Recolección de muestras de materia fecal

Las muestras de materia fecal fueron recolectadas por los pacientes de acuerdo con el instructivo diseñado en colaboración INMEGEN-CMN SXXI (**Apéndice B**). Las heces fueron depositadas en contenedores estériles con 1 ml de *RNAlaterTM Stabilization Solution* (*InvitrogenTM*, EUA) y conservadas a 4°C hasta su entrega al médico tratante en CMN SXXI (máximo 24 horas después), donde fueron resguardadas a -70°C hasta su transferencia en hielo seco al laboratorio de farmacogenómica del INMEGEN, lugar en el que se almacenaron inmediatamente a -70°C hasta ser utilizadas.

4.5. Extracción de ADN

Se tomaron alícuotas de 180 a 220 mg de materia fecal en condiciones estériles dentro de una campana de flujo. A partir de las alícuotas de materia fecal se llevó a cabo la extracción de ADN con el *QIAamp*

DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania) haciendo algunas modificaciones a las recomendaciones del fabricante:

- Tras la adición del buffer de lisis (ASL), las alícuotas de materia fecal se incubaron de 50 a 60°C en baño María por cinco minutos con el fin de mejorar la lisis de las células bacterianas así como la integridad del ADN obtenido.
- El ADN fue eluido en 100 µl de agua libre de nucleasas con el fin de incrementar su concentración final.

La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN fue cuantificado por espectrofotometría UV usando el equipo *NanoDrop One* (Thermo Fisher Scientific, EUA), y diluido en agua libre de nucleasas a una concentración de 50 ng/µl. En todo momento el ADN fue conservado a -20°C previo a ser utilizado.

4.6. Preparación de bibliotecas del gen ARNr 16S para NGS

Se eligió la región V3-V4 del gen ARNr 16S para caracterizar la microbiota intestinal bacteriana de la población de estudio mediante secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés). Debido a que esta es la región de primera elección en la mayoría de estudios de microbiota intestinal humana, su uso permitió generar datos comparables y reproducibles. Además, se ha reportado que en comparación con otras regiones, la región V3-V4 genera mejores resultados para bibliotecas del gen ARNr 16S generadas a partir de muestras de materia fecal y secuenciadas mediante la tecnología *MiSeq* de *Illumina*, tecnología de NGS utilizada en este estudio⁸⁴⁻⁸⁶. Estas mejoras en los resultados se dan tanto en términos cuantitativos: (a) lecturas de mayor longitud⁸⁴, (b) mayor diversidad ecológica^{85,87}, y (c) mayor resolución a nivel taxonómico de género^{85,86}; como cualitativos: (a) mayor calidad de las lecturas⁸⁵ y (b) mayor eficiencia en el proceso de ensamblaje de lecturas⁸⁴.

La preparación de bibliotecas de la región V3-V4 del gen ARNr 16S para la tecnología de NGS *MiSeq* se llevó a cabo según lo establecido en el protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* de *Illumina* con algunas modificaciones. Los procedimientos se explican a continuación.

4.6.1. Amplificación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S

En esta primera etapa se amplificó la región V3 - V4 del gen ARNr 16S mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el par de cebadores recomendado por Klindworth *et al.* (2013). Además de amplificar la región de interés, este procedimiento tuvo como objetivo añadir adaptadores a los fragmentos generados. Los adaptadores fueron necesarios para el procedimiento de indexación que se llevó a cabo en pasos posteriores^{88,89}. Debido a lo anterior, cada cebador contenía un adaptador anclado al extremo 5'. Las secuencias completas de los cebadores empleados fueron:

- Sentido: 5'-[TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG]-CCTACGGGNGGCWGCAG
- Antisentido
5'-[GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG]-GACTACHVGGGTATCTAATCC

La secuencia del adaptador para cada cebador se muestra entre corchetes. El resto de la secuencia corresponde al cebador específico para las regiones V3 y V4, respectivamente.

En esta primera etapa se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada muestra:

<i>2X Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix (Invitrogen™, EUA)</i>	15 μ l
Cebador sentido (10 pM)	0.25 μ l
Cebador antisentido (10 pM)	0.25 μ l
ADN (50 ng/ μ l)	4 μ l
Agua libre de nucleasas	10.5 μ l
Volumen final	30 μl

Posteriormente, el procedimiento de amplificación mediante PCR se llevó a cabo en el termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA)* utilizando el siguiente programa:

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

La región V3-V4 del gen ARNr 16S tiene una longitud de ~ 460 pb^{57,86}, mientras que cada cebador empleado tiene una longitud de ~ 50 pb, por lo que la longitud esperada de los fragmentos generados fue de ~ 550 pb. Se verificó que los fragmentos tuvieran la longitud deseada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras que no mostraron evidencia de amplificación fueron eliminadas del estudio.

4.6.2. Primera purificación

Los fragmentos generados en la primera PCR (25 μ l) fueron purificados utilizando perlas magnéticas con el fin de remover cebadores, dNTPs (dinucleótidos trifosfatados), sales y algún otro agente contaminante que pudiera interferir en los pasos posteriores. Este procedimiento se llevó a cabo con el *ChargeSwitch® PCR Clean - Up kit (Invitrogen™, EUA)*, siguiendo las indicaciones del fabricante y atendiendo a la siguiente especificación:

- Los fragmentos de ADN se eluyeron en 25 μ l de buffer de elución.

Los fragmentos de ADN purificados fueron almacenados a -20°C, o bien, utilizados de forma inmediata en los procedimientos siguientes.

4.6.3. Indexación mediante PCR

En esta etapa se generaron las bibliotecas de la región V3 - V4 del gen ARNr 16S. Con este fin, se utilizaron los adaptadores anclados durante la primera PCR para añadir índices duales (Índice 1/Índice 2), así como adaptadores de secuenciación (P5/P7) a los fragmentos previamente purificados. Los índices sirvieron para asignar una secuencia única de identificación a cada muestra, de modo que se pudieran agrupar varias muestras en un sólo experimento de secuenciación; mientras que los adaptadores de secuenciación tuvieron como función la hibridación de las bibliotecas con la célula de flujo del sistema de secuenciación^{85,88,90}.

Para llevar a cabo la indexación mediante PCR se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada muestra:

<i>2X Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix</i> (Invitrogen™, EUA)	25 μ l
NTXX (<i>Nextera XT Index kit</i> de Illumina, EUA)	0.25 μ l
S5XX (<i>Nextera XT Index kit</i> de Illumina, EUA)	0.25 μ l
ADN (50 ng/ μ L)	4 μ l
Agua libre de nucleasas	10.5 μ l
Volumen final	30 μl

Posteriormente, la PCR se realizó en el termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA) utilizando el siguiente programa:

- 95°C por 3 minutos
- 6 ciclos de:
 - 95°C por 30 segundos
 - 55°C por 30 segundos
 - 72°C por 30 segundos
- 72°C por 30 segundos
- 4°C ∞

La longitud de los fragmentos generados en la primera PCR fue de \sim 550 pb, mientras que cada uno de los índices añadidos durante la indexación tiene una longitud de \sim 12 pb, y cada adaptador de secuenciación una longitud de \sim 30 pb, por tanto la longitud final esperada de las bibliotecas fue de \sim 630 pb. La verificación de la longitud deseada de las bibliotecas se llevó a cabo en pasos posteriores mediante electroforesis capilar automatizada por el personal de la Unidad de Secuenciación (USec) del INMEGEN.

4.6.4. Segunda purificación

Las bibliotecas del gen ARNr 16S (50 μ l) fueron purificadas utilizando perlas magnéticas con la finalidad de remover dNTPs, restos de polimerasa y cualquier otro agente que pudiera interferir en el proceso de secuenciación. El procedimiento se llevó a cabo con el *ChargeSwitch[®] PCR Clean - Up kit* (InvitrogenTM, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante y atendiendo a la siguiente especificación:

- Las bibliotecas se eluyeron en 40 μ l de buffer de elución.

Las bibliotecas purificadas fueron almacenadas a -20°C hasta su entrega a la USec del INMEGEN.

4.6.5. Validación, cuantificación, normalización y preparación de *pool* de bibliotecas

Se transfirieron alícuotas de 25 μ l de las bibliotecas purificadas a una placa de 96 pozos estéril. La placa fue sellada herméticamente y transferida a la USec del INMEGEN donde el personal realizó el resto de procedimientos establecidos en el *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* de *Illumina*:

1. Validación de las bibliotecas. Las bibliotecas fueron sometidas a electroforesis capilar automatizada con el objetivo de verificar que tuvieran la longitud deseada de \sim 630 pb y que no hubiera presente algún tipo de contaminación que pudiera afectar el proceso de secuenciación.
2. Cuantificación de las bibliotecas mediante espectrofluorometría.
3. Normalización de la concentración de las bibliotecas.
4. Preparación de *pool* de las bibliotecas normalizadas.
5. Desnaturalización del *pool* de bibliotecas y adición de la biblioteca de control de ADN genómico del fago PhiX. La función del fago PhiX fue incrementar la diversidad de bases durante el proceso de secuenciación⁸⁵.

4.7. NGS de bibliotecas del gen ARNr 16S

La secuenciación de las bibliotecas de la región V3-V4 del gen ARNr 16S se realizó en el sistema de NGS *MiSeq* de *Illumina* con el *MiSeq[®] v2 Reagent kit*, generando lecturas de extremos emparejados o *paired - end* con una longitud de 250 pb. El personal de la USec llevó a cabo este procedimiento.

4.8. Análisis bioinformático y análisis estadístico

El análisis bioinformático de los datos de secuenciación se realizó con el *software Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2* (QIIME 2) versión 2021.8⁹¹. El análisis estadístico y los gráficos presentados se realizaron con el *software R* versión 4.2.0⁹².

4.8.1. Procesamiento de datos de secuenciación

Los datos de secuenciación con información de calidad (*phred score*) de las bibliotecas del gen ARNr 16S fueron entregados al laboratorio de farmacogenómica demultiplexados y en formato FASTQ. El término demultiplexación hace referencia a la asignación de las lecturas al número de identificación de su muestra de origen de acuerdo con los índices duales asignados durante el proceso de indexación⁹³.

Debido a que se produjeron lecturas de extremos emparejados, se recibieron dos archivos FASTQ para cada muestra:

- Archivo correspondiente a las lecturas sentido e identificado con el término R1.
- Archivo correspondiente a las lecturas antisentido e identificado con el término R2.

Los datos de secuenciación en formato FASTQ de cada muestra fueron importados a QIIME 2 en formato QZA, y utilizando los *plugins* incorporados en el *software* se realizó lo siguiente. En primer lugar, se verificó que las lecturas se encontraran libres de secuencias correspondientes a cebadores o adaptadores empleados durante la preparación de bibliotecas utilizando el *plugin q2-cutadapt*⁹⁴. Posteriormente, se visualizó y analizó un resumen de la información de calidad de las lecturas utilizando el *plugin q2-demux*. Con esta información se procedió a la construcción de ASVs (*Amplicon Sequence Variant*) con el *software Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2*⁹⁵ (DADA 2) mediante el *plugin q2-dada2*.

En resumen, el flujo de trabajo de DADA2 fue el siguiente:

1. Filtración de las lecturas de acuerdo con su calidad y longitud.
2. Eliminación de lecturas redundantes (desrepleción) y generación de tabla de contingencia resumiendo la frecuencia de las lecturas únicas en cada muestra.
3. *Denoising*, proceso mediante el cual el algoritmo de DADA 2 modeló y corrigió los errores del proceso de secuenciación con la plataforma *Illumina* para inferir las variantes de las lecturas.
4. Proceso de ensamblado de lecturas sentido y antisentido.
5. Identificación y eliminación de quimeras, que dio como resultado la filtración de lecturas no quiméricas o ASVs.

Como resultado del procesamiento con DADA 2 se obtuvieron tres archivos:

- Archivo con resumen de lecturas remanentes en cada muestra después de cada procedimiento del algoritmo.
- Archivo con listado de los distintos ASVs generados.
- Archivo con tabla de contingencia resumiendo la frecuencia de cada ASV en cada muestra.

Tanto el archivo con el listado de ASVs como el archivo con la tabla de contingencia fueron utilizados para continuar con el análisis bioinformático.

4.8.2. Clasificador taxonómico de la región V3-V4 del gen ARNr 16S

Como paso intermedio del análisis bioinformático se generó un clasificador taxonómico con la base de datos SILVA SSU Ref NR 99 versión 138.1⁹⁶⁻⁹⁸. Para ello, la base de datos SILVA fue depurada utilizando el software *REference Sequence annotation and CuRatlon Pipeline* (RESCRIPt)⁹⁹ mediante el *plugin q2-rescript* de QIIME 2. El proceso consistió en:

1. Eliminar las secuencias de referencia de baja calidad.
2. Eliminar las secuencias de referencia asignadas al dominio *Eukarya*.
3. Eliminar las secuencias de referencia asignadas al dominio *Archaea* con longitud < 900 pb.
4. Eliminar las secuencias de referencia asignadas al dominio *Bacteria* con longitud < 1200 pb.
5. Eliminar las secuencias de referencia redundantes (desreplicación).
6. Seleccionar la región de V3-V4 del gen ARNr 16S de las secuencias de referencia utilizando la secuencia nucleotídica de los cebadores específicos empleados durante la preparación de bibliotecas.

Con la base de datos SILVA depurada y mediante el *plugin q2-feature-classifier*¹⁰⁰ de QIIME 2 se entrenó el clasificador taxonómico específico para la región V3-V4 del gen ARNr 16S utilizando el método Naive-Bayes¹⁰¹.

4.8.3. Asignación taxonómica, depuración de muestras y depuración de ASVs

Por medio del *plugin q2-feature-table* de QIIME 2 se filtraron las muestras con un tamaño de biblioteca (suma total de las frecuencias de los ASVs¹⁰²) < 10,000 secuencias, pues este es el tamaño mínimo que se considera adecuado para la caracterización de la microbiota de ecosistemas altamente diversos como el tracto gastrointestinal humano¹⁰³⁻¹⁰⁶.

Enseguida, se llevó a cabo la depuración de ASVs. Primero, se descartaron los ASVs con una longitud menor a 75 pb¹⁰⁷ usando RESCRIPt⁹⁹ mediante el *plugin q2-rescript* de QIIME 2. Luego, se realizó la asignación taxonómica de los ASVs filtrados utilizando el clasificador taxonómico específico de la región V3-V4 del gen ARNr 16S por medio del *plugin q2-feature-classifier*¹⁰⁰ de QIIME 2. Puesto que uno de los objetivos del estudio fue caracterizar la microbiota intestinal bacteriana a nivel de género, se estableció que para tener asignación taxonómica los ASVs debían tener un porcentaje mínimo de similitud del 94.5 % con las secuencias de referencia del clasificador¹⁰⁸. Tras este proceso, se eliminaron los ASVs cuya asignación taxonómica correspondiera a cloroplastos y/o estuvieran presentes en menos del 5 % de las muestras.

A partir de los ASVs depurados se generó un árbol filogenético utilizando el *plugin q2-phylogeny* de QIIME 2. Este árbol filogenético se utilizó en los análisis posteriores.

4.8.4. Análisis de diversidad de la microbiota intestinal bacteriana

La variación en el tamaño de biblioteca entre las distintas muestras de un estudio es una característica común en los datos de microbiota que puede generar conclusiones estadísticas erróneas si no se toma en consideración¹⁰⁹⁻¹¹¹, por lo que es importante aplicar métodos de normalización a los datos. Uno de los métodos más comunes es la rarefacción, método que consiste en hacer un submuestreo aleatorio de

las secuencias de cada muestra con el fin de lograr que el tamaño de biblioteca de todas las muestras involucradas sea el mismo^{109,112,113}.

Para determinar correctamente el valor de submuestreo se utilizan curvas de rarefacción, las cuales representan el número de especies, ASVs, etc., *versus* el número de secuencias de las muestras. Se considera que cuando las curvas alcanzan una meseta, se ha alcanzado la suficiente profundidad en la secuenciación para identificar aquellos taxones minoritarios en una muestra, y por tanto, para caracterizarla^{90,114}.

Dicho lo anterior, los análisis de diversidad de la microbiota intestinal bacteriana se realizaron a nivel de ASVs eligiendo el método de rarefacción para la normalización de las muestras. Las curvas de rarefacción se elaboraron con el paquete *ampvis2*¹¹⁵ en R y las muestras se normalizaron al número de secuencias de la muestra con el menor tamaño de biblioteca utilizando el *plugin q2-feature-table* de QIIME 2.

Diversidad alfa

La diversidad alfa se refiere a la riqueza de especies de un sitio o comunidad particular, o de un individuo o muestra^{90,116}. Puede describirse utilizando tres parámetros distintos:

- Riqueza. Se establece contando el número de especies distintas presentes en una muestra^{90,117}.
- Homogeneidad o *evenness*. Considera la abundancia relativa de las especies presentes en una muestra¹¹⁷.
- Diversidad. Considera tanto la abundancia relativa de las especies como el número total de especies distintas en una muestra¹¹⁷.

La diversidad alfa de la microbiota intestinal bacteriana de los pacientes se describió calculando cuatro índices que aportaran información distinta entre sí:

- Número de ASVs observados. Medida o índice de riqueza de una muestra¹¹⁷.
- Índice de Shannon. Medida que refleja la diversidad de una muestra. Mientras mayor es su valor, mayor es la diversidad de la comunidad bacteriana^{117,118}.
- Índice de homogeneidad de Simpson. Mide la distribución de las especies en una muestra mediante su abundancia relativa. En este sentido, mientras más homogénea es la abundancia de las especies mayor es la diversidad¹¹⁹.
- Índice de diversidad filogenética de Faith. Medida de diversidad que incorpora la diferencia filogenética de las especies¹²⁰.

Los índices de diversidad alfa se calcularon a partir de la tabla de contingencia de ASVs normalizada por rarefacción utilizando el *plugin q2-diversity* de QIIME 2. En el caso del índice de diversidad filogenética de Faith también se utilizó el árbol filogenético previamente generado.

Como parte de la caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos, se comparó la diversidad alfa de los pacientes según su grupo de edad con un análisis de varianza (ANOVA). Además, se comparó la diversidad alfa de pacientes hipertensos con PA controlada *versus* pacientes hipertensos con PA no controlada con la prueba *t* de Student. En ambos casos, las pruebas estadísticas

se utilizaron tras identificar una distribución normal de los datos mediante la prueba Shapiro-Wilk. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Diversidad beta

La diversidad beta se refiere al grado de diferenciación entre comunidades, individuos o muestras^{90,116}. Se pueden utilizar tanto datos de presencia - ausencia como datos de abundancia para identificar cuáles especies se comparten entre muestras y cuáles no. Además, dependiendo de la métrica se puede incorporar o no el componente filogenético de las especies¹¹⁷.

La diversidad beta de la microbiota intestinal bacteriana de los pacientes se determinó con cuatro métricas distintas:

- Índice de disimilitud Jaccard. Mide la distancia entre muestras basándose en la presencia-ausencia de las especies. No incorpora información filogenética^{121,122}.
- Índice de disimilitud Bray-Curtis. Mide la distancia entre muestras basándose en la abundancia de las especies. No incorpora información filogenética^{122,123}.
- UniFrac. Mide la distancia entre muestras basándose en la presencia-ausencia de las especies y su información filogenética¹²⁴.
- UniFrac ponderado. Mide la distancia entre muestras basándose en la abundancia de las especies y su información filogenética¹²⁵.

Las métricas de diversidad beta se calcularon a partir de la tabla de contingencia de ASVs normalizada por rarefacción utilizando el *plugin q2 - diversity* de QIIME 2. Para las métricas UniFrac se utilizó el árbol filogenético previamente generado.

Con el fin de visualizar la diversidad beta entre los pacientes, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de las matrices de distancia generadas con el paquete *ape*¹²⁶ en R. Para determinar el número de coordenadas principales (PCo) para una correcta representación gráfica de la composición de la microbiota intestinal de las muestras se elaboró un gráfico de sedimentación o *screepplot* para cada PCoA.

En cada PCoA se evaluó visualmente la separación de los pacientes clasificados por grupo de edad como parte de la caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos. En el caso de pacientes hipertensos con PA controlada *versus* pacientes hipertensos con PA no controlada, además de evaluar la separación visual de grupos en cada PCoA, se determinó si existía diferencia estadística significativa en la composición de la microbiota intestinal de grupos de estudio mediante un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) con el paquete *vegan*¹²⁷ en R. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

4.8.5. Análisis de taxonomía de la microbiota intestinal bacteriana

La caracterización de la microbiota intestinal de la población de estudio se realizó en los niveles taxonómicos de filo y género. Para ello, se generó una tabla de contingencia para cada nivel taxonómico

a partir de la tabla de contingencia de ASVs sin normalizar utilizando el *plugin q2-taxa* de QIIME 2. Se excluyeron de los análisis siguientes los taxones sin asignación al nivel taxonómico requerido.

Los análisis de taxonomía se realizaron a partir de las tablas de contingencia a nivel de filo y género sin normalizar, y la variación en el tamaño de biblioteca de las muestras se abordó de manera distinta según el método estadístico empleado.

Índice *Firmicutes/Bacteroidota*

Los filos bacterianos *Firmicutes* y *Bacteroidota* son los más abundantes en la microbiota intestinal, y cambios en su relación, conocida como índice *Firmicutes/Bacteroidota* (F/B), pueden ser causa o consecuencia de diversas patologías¹²⁸⁻¹³⁰.

Con el fin de evaluar la presencia de alguna alteración en la microbiota intestinal bacteriana que pudiera estar relacionada con cambios en la homeostasis¹³⁰ de la población de estudio, se calculó el índice F/B a partir de la tabla de contingencia a nivel de filo. La tabla de contingencia fue previamente normalizada con el método *total-sum scaling* (TSS), el cual consiste en transformar la abundancia absoluta de los taxones en abundancia relativa¹³¹.

Se comparó el índice F/B de los pacientes clasificados por grupo de edad con la prueba Kruskal-Wallis, como parte de la caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos. El índice F/B también se comparó entre pacientes hipertensos con PA controlada *versus* pacientes hipertensos con PA no controlada con la prueba *U* de Mann-Whitney. En ambos casos, las pruebas estadísticas se utilizaron tras identificar una distribución no normal en los datos mediante la prueba Shapiro-Wilk. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Abundancia diferencial de taxones

Los datos de microbiota generados a partir de técnicas de NGS presentan características que los vuelven complejos y dificultan su análisis estadístico:

- Alta dimensionalidad. Se identifican cientos, e incluso, miles de taxones distintos¹³².
- Escasez de datos o inflación de ceros. Múltiples taxones tienen una abundancia absoluta igual a cero en múltiples muestras. Esto puede deberse a que el taxón no está presente en la muestra (cero estructural), o bien, no se detectó por su baja abundancia o por variabilidad técnica en el proceso de secuenciación (cero muestral)^{132,133}.
- Sobredispersión. Para la abundancia de cada taxón la varianza es mayor a la media^{133,134}.
- Composicionalidad. La abundancia de los taxones es relativa, pues los datos se obtienen de una fracción de muestra biológica, y además el número total de secuencias por muestra depende del número máximo de lecturas que la plataforma de secuenciación pueda proporcionar^{132,135}.
- Influencia de múltiples factores. Múltiples factores (clínicos, biológicos, ambientales, etc.) pueden tener influencia y modificar la microbiota, por lo que se recomienda tomar en cuenta dichos factores o variables de confusión en los métodos estadísticos para obtener conclusiones confiables¹³².

Con el propósito de identificar taxones, tanto a nivel de filo como de género, con abundancia diferencial entre pacientes hipertensos con PA controlada y pacientes hipertensos con PA no controlada se utilizaron tres métodos estadísticos, cada uno susceptible a distintas características de los datos de microbiota con el fin de robustecer los resultados^{132,136}:

- *Linear discriminant analysis effect size* (LEfSe). Determina los taxones con abundancia diferencial entre grupos de estudio combinando una serie de métodos no paramétricos: (a) prueba Kruskal-Wallis, (b) prueba de suma de rangos de Wilcoxon, y (c) análisis discriminante lineal (LDA)^{132,137}. Este método permite modelar la inflación de ceros indirectamente, y no permite el ajuste por variables de confusión.

El análisis se llevó a cabo a partir de las tablas de contingencia a nivel de filo y género normalizadas por el método TSS y su multiplicación por 1,000,000, tal como lo recomienda el método y utilizando el *software* desarrollado originalmente¹³⁷. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $LDA \geq 1.5$ y un valor de $p \leq 0.05$.

- Modelo lineal generalizado (GLM) con transformación log - cociente centrada (CLR). Este método permite modelar la composicionalidad de los datos, e indirectamente la inflación de ceros. Además, permite el ajuste por variables de confusión^{132,136}.

Las tablas de contingencia a nivel de filo y género se normalizaron mediante la transformación CLR añadiendo un pseudoconteo de uno a las abundancias absolutas de los taxones. Se generó un GLM para cada taxón considerando la abundancia con transformación CLR como variable independiente y la clasificación de los pacientes según los niveles de PA como variable dependiente. Los modelos se generaron con y sin ajuste por variables de confusión. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

- Modelo lineal generalizado negativo binomial (GLM-NB). Este método permite modelar la sobredispersión de los datos, y de forma indirecta la inflación de ceros y la composicionalidad. Además, permite el ajuste por variables de confusión¹³².

Se generó un GLM-NB para cada filo y género bacteriano considerando la abundancia de los taxones como variable independiente y la clasificación de los pacientes según sus niveles de PA como variable dependiente. Se añadió el logaritmo natural (log) del tamaño de biblioteca como variable *offset* para tomar en consideración la variación de dicho parámetro. Los modelos se generaron con y sin ajuste por variables de confusión con el paquete *glmmTMB*¹³⁸ en R. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

En lo que respecta a los métodos GLM-CLR y GLM-NB, se incluyeron variables de confusión cuya influencia en la microbiota intestinal ha sido previamente reportada: (a) sexo, (b) edad, (c) índice de masa corporal (IMC), y (d) nivel de adherencia terapéutica. Además, para generar los modelos se asignó el valor de cero a pacientes hipertensos con PA controlada y el valor de uno a pacientes hipertensos con PA no controlada.

En todos los casos, los valores de p se ajustaron por el método FDR (*false discovery rate* o tasa de descubrimientos falsos) para corregir por comparaciones múltiples¹³⁹. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p ajustado ≤ 0.05 .

Los resultados de los tres métodos estadísticos empleados se compararon entre sí para determinar con certeza los taxones con abundancia diferencial entre grupos de estudio.

4.8.6. Análisis de predicción funcional de la microbiota intestinal bacteriana

La composición funcional de la microbiota intestinal se predijo a partir de la tabla de contingencia de ASVs sin normalizar con el *software Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2* (PICRUSt 2) versión 2.4.1¹⁴⁰. La descripción de las vías metabólicas se asignó utilizando la base de datos MetaCyc¹⁴¹. Como resultado se obtuvo una tabla de contingencia con las vías metabólicas predichas, la cual se normalizó con el método TSS.

Para identificar las vías metabólicas con abundancia diferencial entre pacientes hipertensos con PA controlada y pacientes hipertensos con PA no controlada se utilizó el método LEfSe. Se consideró estadísticamente significativo un valor de LDA ≥ 1.5 y un valor de $p \leq 0.05$. Además, los valores de p se ajustaron por el método FDR para corregir por comparaciones múltiples¹³⁹, considerando estadísticamente significativo un valor de p ajustado ≤ 0.05 .

5. Resultados

5.1. Datos de secuenciación del gen ARNr 16S

La submuestra inicial de pacientes adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico se conformó por 84 individuos que cumplieron con los criterios de selección establecidos y cuyas muestras de materia fecal fueron sometidas a los procesos de extracción de ADN, preparación de bibliotecas de la región V3-V4 del gen ARNr 16S y secuenciación en la plataforma *MiSeq* de *Illumina*. Ninguna muestra fue eliminada del estudio durante estos procedimientos experimentales.

La secuenciación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S para 84 pacientes generó un total de 8,589,413 lecturas con un promedio de 102,255 lecturas por paciente (**Tabla 3**). Las lecturas fueron tratadas para eliminar regiones correspondientes a secuencias de cebadores o adaptadores empleados durante la preparación de bibliotecas. Con los datos resultantes se generó un resumen de calidad (**Figura 2**), el cual mostró una calidad y longitud adecuada de las lecturas para su procesamiento con DADA 2.

Tabla 3: Lecturas e individuos restantes después de cada paso del procesamiento de los datos de secuenciación

Tipo de procesamiento de datos	Individuos	Número de lecturas			
		Total	Media \pm DE	Mediana	Mínimo – Máximo
Sin procesar	84	8,589,413	102,255 \pm 24,948	100,744	408 – 205,398
Eliminación de cebadores y/o adaptadores	84	8,364,530	99,578 \pm 24,385	98,266	369 – 200,370
Filtración por calidad	84	5,512,021	65,619 \pm 16,996	66,729	67 – 129,790
DADA 2 <i>Denoising</i>	84	5,405,044	64,346 \pm 16,730	65,184	7 – 126,836
Ensamblado	84	4,335,258	51,610 \pm 14,027	52,014	0 – 96,909
Eliminación de químeras	84	3,604,814	42,914 \pm 12,956	42,674	0 – 81,170
Depuración de muestras	81	3,597,393	44,412 \pm 10,492	42,839	22,987 – 81,170
Depuración de ASVs	81	3,157,668	38,984 \pm 10,408	38,404	14,645 – 74,908

ASV: *Amplicon Sequence Variant*; DADA 2: *Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2*; DE: Desviación estándar

A partir de los datos generados con DADA 2, se eliminaron del estudio las muestras con un tamaño de biblioteca $\leq 10,000$ lecturas, lo que dio como resultado la selección de 81 pacientes para los procedimientos subsecuentes (**Tabla 3**). Además, se depuraron los 3,683 ASVs inferidos según criterios de calidad, incluyendo una longitud mínima de 75 pb para asegurar una correcta y confiable asignación taxonómica¹⁰⁷, eliminación de ASVs asignados a cloroplastos posiblemente provenientes de la ingesta de alimentos vegetales¹⁴² y una prevalencia mínima en el 5% de los pacientes para garantizar la inclusión de ASVs representativos de la comunidad bacteriana intestinal. Como resultado, se seleccionaron 722 ASVs distintos para su posterior análisis.

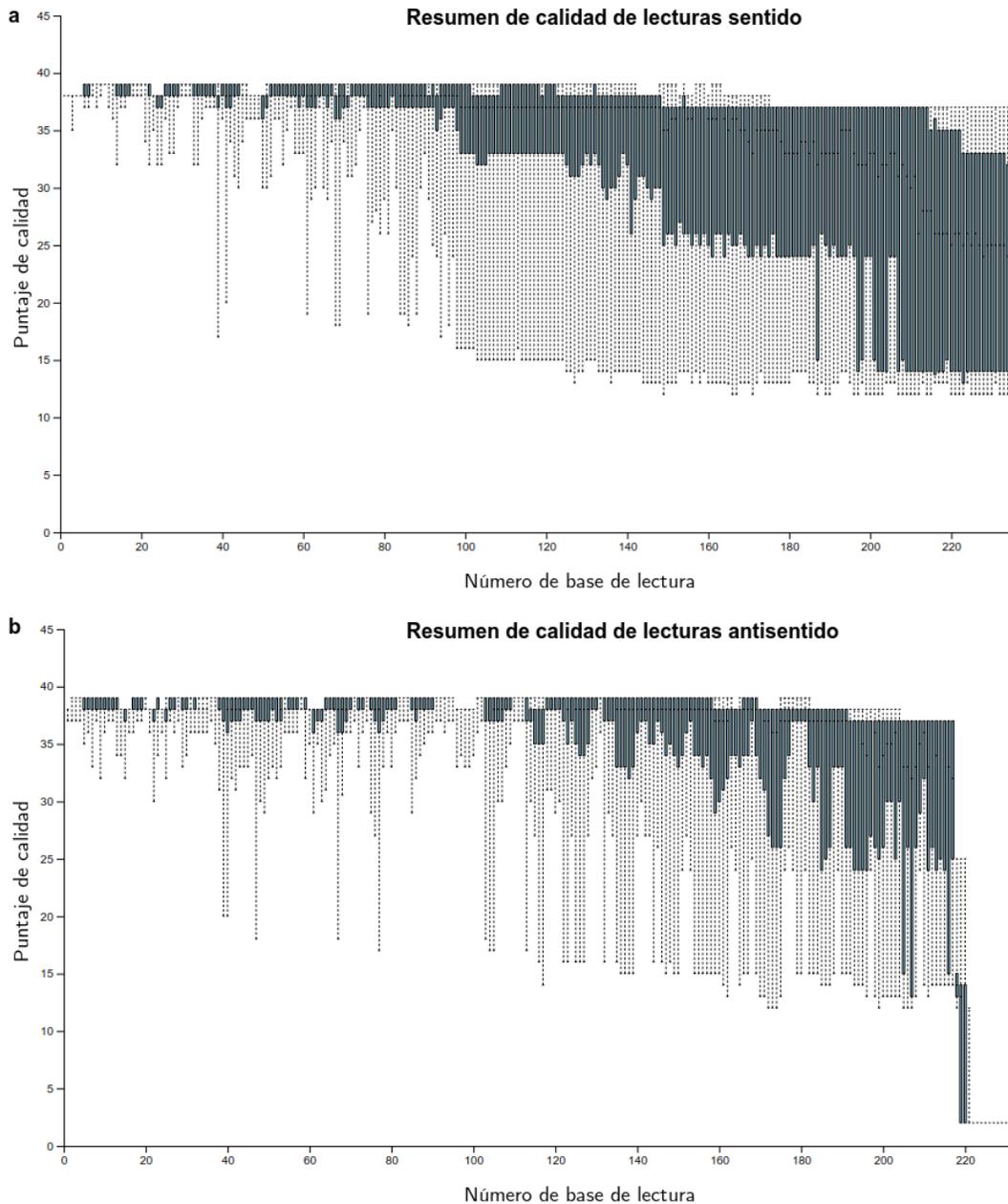


Figura 2: Información de calidad de datos de secuenciación. (a) Resumen de calidad de lecturas sentido; (b) Resumen de calidad de lecturas antisentido. En general, el puntaje de calidad o *Phred score* de las secuencias es ≥ 20 .

Finalmente, el resultado del procesamiento de los datos de secuenciación fue la inclusión en los análisis bioinformáticos y estadísticos subsecuentes de 81 pacientes, con un total de 3,157,668 lecturas, un promedio de 38,984 lecturas por paciente y 722 ASVs distintos identificados (**Tabla 3**).

5.2. Población de estudio

Este estudio incluyó 81 pacientes adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico, distribuidos en proporciones iguales entre hombres y mujeres, con edad media de 70.9 años, PAS media de 129.0 mmHg y PAD media de 71.1 mmHg. Más del 50 % de los pacientes consumían dos o más fármacos antihipertensivos, siendo los tratamientos más comunes los β -bloqueadores (75.3 %) y los ARA II (67.9 %). Además, la mayoría de los pacientes (51.1 %) presentaron un nivel muy bajo de adherencia terapéutica. Las características clínicas y demográficas de la población de estudio se muestran en la **Tabla 4**

Los pacientes fueron clasificados según sus niveles de PA, asignando 61 individuos al grupo de hipertensos con PA controlada y 20 individuos al grupo de hipertensos con PA no controlada. Se observó diferencia significativa entre grupos en los niveles de PAS (*U* de Mann-Whitney, $p < 0.001$) y PAD (*t* de Student, $p < 0.001$), variables utilizadas para la clasificación de los pacientes. También se encontró diferencia significativa en el tratamiento farmacológico antihipertensivo con β -bloqueadores (Fisher, $p = 0.033$), IECA (Fisher, $p = 0.021$) y ARA II (Fisher, $p = 0.058$). Ninguna otra variable clínica o demográfica mostró diferencia significativa entre grupos.

5.3. Diversidad de la microbiota intestinal bacteriana

5.3.1. Normalización del tamaño de biblioteca de las muestras para análisis de diversidad alfa y beta

Para los análisis de diversidad de la microbiota intestinal bacteriana se utilizó el método de rarefacción para normalizar el tamaño de biblioteca de las muestras incluidas en el estudio. Con el fin de determinar el valor de submuestreo se graficaron las curvas de rarefacción correspondientes (**Figura 3**), las cuales muestran que a una profundidad de 14,645 secuencias, equivalente a la muestra con menor tamaño de biblioteca, la mayoría de las curvas alcanzaron una meseta, y por tanto, una profundidad suficiente para capturar la diversidad de las muestras. Tras el proceso de rarefacción en una sola iteración, el tamaño de biblioteca de todas las muestras fue de 14,645 secuencias.

5.3.2. Diversidad alfa de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico

La diversidad alfa refleja la riqueza de especies bacterianas presentes en una sola muestra o individuo¹⁰. Para caracterizar la diversidad alfa de la microbiota intestinal bacteriana de la población de estudio se calcularon cuatro métricas distintas a nivel de ASVs: (a) número de ASVs observados (medida de riqueza¹¹⁷), (b) índice de Shannon (medida combinada de riqueza y homogeneidad^{117,118}), (c) índice de homogeneidad de Simpson (medida de homogeneidad¹¹⁹), e (d) índice de diversidad filogenética de Faith (medida filogenética de diversidad¹²⁰).

Tabla 4: Características clínicas y demográficas de la población de estudio

	Total	Hipertensos con presión arterial controlada	Hipertensos con presión arterial no controlada	Valor de <i>p</i>
Individuos	81 (100 %)	61 (75.3 %)	20 (24.7 %)	-
Sexo				
Mujer	41 (50.6 %)	32 (52.5 %)	9 (45.0 %)	0.614
Hombre	40 (49.4 %)	29 (47.5 %)	11 (55.0 %)	
Edad, años				
60 a 69	43 (53.1 %)	31 (50.8 %)	12 (60.0 %)	0.821
70 a 79	27 (33.3 %)	21 (34.4 %)	6 (30.0 %)	
≥ 80	11 (13.6 %)	9 (14.8 %)	2 (10.0 %)	
IMC, kg/m ²	29.1 ± 3.7	28.8 ± 3.8	30.1 ± 3.4	0.149
PAS, mmHg	129.0 ± 17.5	121.8 ± 11.4	150.8 ± 14.5	<0.001*
PAD, mmHg	71.1 ± 10.6	67.8 ± 8.8	81.4 ± 9.1	<0.001*
Total de antihipertensivos consumidos				
1 antihipertensivo	36 (44.4 %)	27 (44.3 %)	9 (45.0 %)	0.825
2 antihipertensivos	28 (34.6 %)	20 (32.8 %)	8 (40.0 %)	
3 antihipertensivos	13 (16.0 %)	10 (16.4 %)	3 (15.0 %)	
≥ 4 antihipertensivos	4 (4.9 %)	4 (6.6 %)	0 (0.0 %)	
Tratamiento farmacológico antihipertensivo				
Diuréticos	24 (29.6 %)	20 (32.8 %)	4 (20.0 %)	0.399
β - bloqueadores	61 (75.3 %)	50 (82.0 %)	11 (55.0 %)	0.033*
IECA	23 (28.4 %)	13 (21.3 %)	10 (50.0 %)	0.021*
ARA II	55 (67.9 %)	45 (73.8 %)	10 (50.0 %)	0.058*
BCC	26 (32.1 %)	20 (32.8 %)	6 (30.0 %)	1
α - bloqueadores	1 (1.2 %)	1 (1.6 %)	0 (0.0 %)	1
Nivel de adherencia terapéutica ^a				
Muy bajo (0)	42 (51.9 %)	33 (54.1 %)	9 (45.0 %)	0.770
Bajo (1)	18 (22.2 %)	12 (19.7 %)	6 (30.0 %)	
Medio (2)	14 (7.3 %)	11 (18.0 %)	3 (15.0 %)	
Alto (3)	7 (8.6 %)	5 (8.2 %)	2 (10.0 %)	
Comorbilidades				
Diabetes	16 (19.8 %)	13 (16.0 %)	3 (3.7 %)	0.749
Otras	24 (29.6 %)	19 (23.5 %)	5 (6.2 %)	
				0.779

La información se muestra como media ± DE o n (%). Hipertensos con presión arterial controlada: Presión arterial sistólica < 140 mmHg y presión arterial diastólica < 90 mmHg. Hipertensos con presión arterial no controlada: Presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg y/o presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg. Los valores de *p* se calcularon con la prueba *U* de Mann-Whitney para PAS y edad, con la prueba *t* de Student para PAD e IMC, y con la prueba de Fisher para variables categóricas. ARA II: Antagonistas de los receptores AT₁ de angiotensina II; BCC: Bloqueadores de canales de calcio; DE: Desviación estándar; IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I; IMC: Índice de masa corporal; PAD: Presión arterial diastólica; PAS: Presión arterial sistólica

^aAdherencia terapéutica medida utilizando el cuestionario Morisky-Green

*Valor estadísticamente significativa, *p* ≤ 0.05

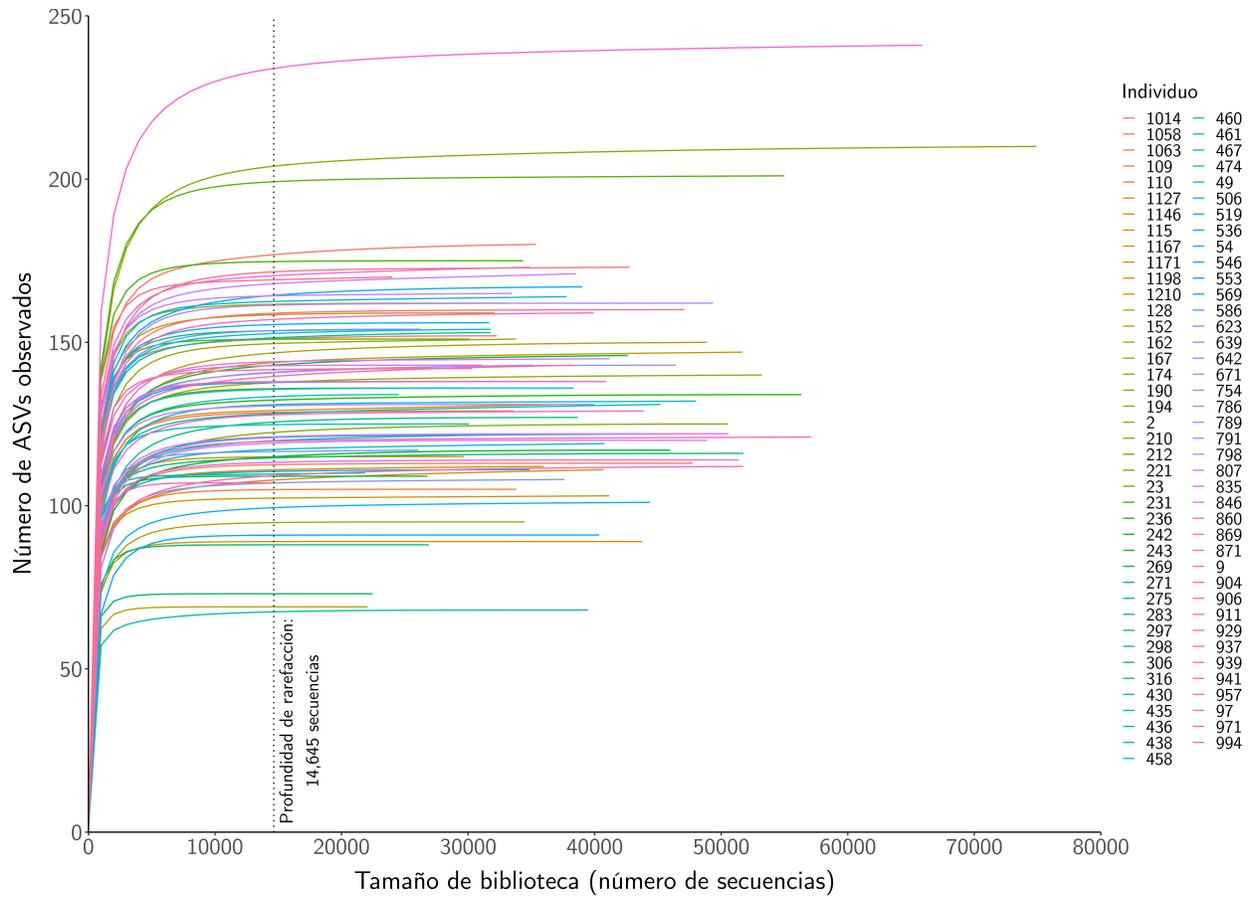


Figura 3: Curvas de rarefacción. La línea punteada indica el valor de submuestreo elegido para normalizar las muestras por el método de rarefacción. ASV: *Amplicon Sequence Variant*

La diversidad alfa de la población de estudio en general se describe a continuación. El número de ASVs observados tuvo una variación de 66 a 234 ASVs entre los pacientes, con un promedio de 134 ASVs por adulto mayor. El índice de diversidad de Shannon varió entre 4.34 y 6.50 en la población de estudio, con un valor promedio de 5.42 por paciente. Para el índice de homogeneidad de Simpson la población de estudio mostró una variación de 0.05 a 0.39, con un índice promedio de 0.18 por paciente. Mientras que el índice de diversidad filogenética de Faith presentó una variación entre 4.75 y 13.41, con un valor promedio por paciente de 9.10 (**Tabla 5**).

Tabla 5: Diversidad alfa de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial

Índice de diversidad alfa	Media \pm DE	Mediana	Mínimo – Máximo
Número de ASVs observados	134 \pm 29	133	66 – 234
Índice de Shannon	5.42 \pm 0.49	5.46	4.34 – 6.50
Índice de homogeneidad de Simpson	0.18 \pm 0.07	0.17	0.05 – 0.39
Índice de diversidad filogenética de Faith	9.10 \pm 1.58	9.21	4.75 – 13.41

Métricas de diversidad alfa calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. ASV: *Amplicon Sequence Variant*; DE: Desviación estándar

La diversidad alfa se comparó entre adultos mayores de 60 a 69 años, adultos mayores de 70 a 79 años y adultos mayores de 80 años o más (**Figura 4**). No se encontró diferencia significativa entre los grupos (ANOVA, $p > 0.05$).

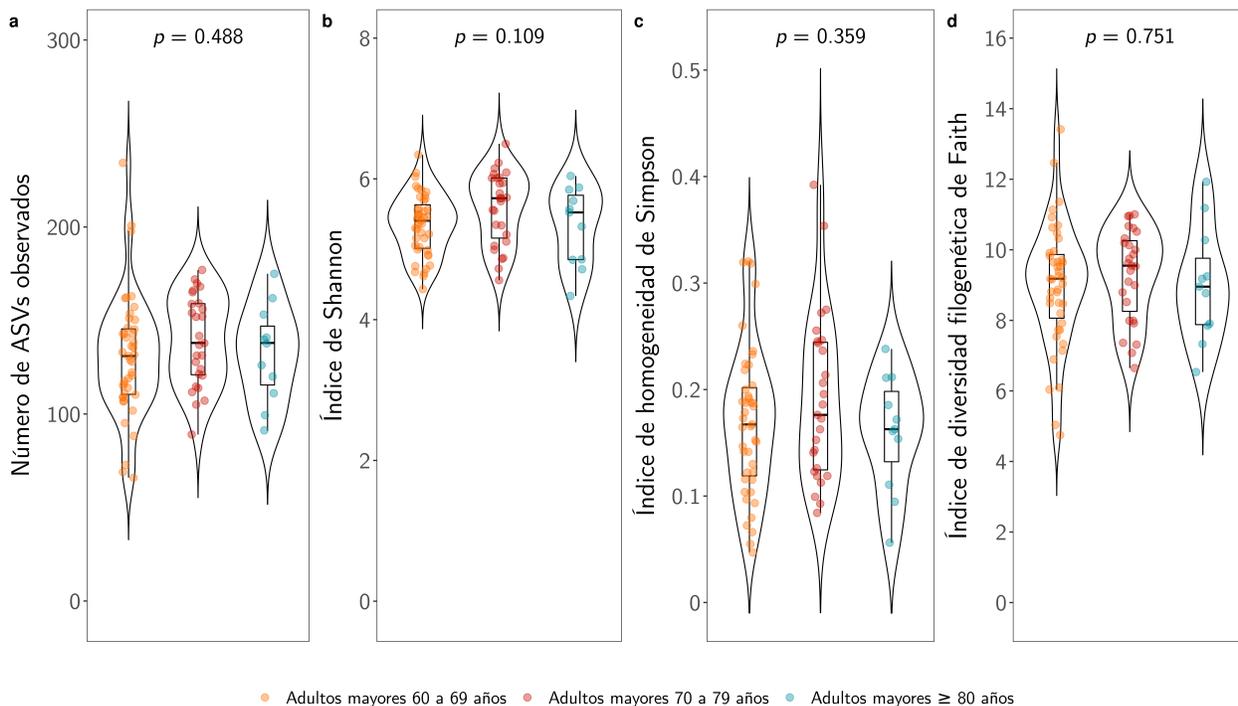


Figura 4: Gráficos de violín comparando diversidad alfa de adultos mayores clasificados por grupo de edad. (a) Número de ASVs observados; (b) Índice de Shannon; (c) Índice de homogeneidad de Simpson; (d) Índice de diversidad filogenética de Faith. Todas las métricas de diversidad alfa fueron calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. Los valores de p se calcularon con la prueba ANOVA. ANOVA: Análisis de varianza; ASV: *Amplicon Sequence Variant*

Además, la diversidad alfa se comparó entre hipertensos con PA controlada e hipertensos con PA no controlada (**Figura 5**). Únicamente el índice de homogeneidad de Simpson mostró diferencia significativa entre grupos de estudio (t de Student, $p = 0.028$). De acuerdo con esta métrica, la diversidad alfa en hipertensos con PA controlada (media \pm DE = 0.18 \pm 0.07) es mayor en comparación con hipertensos con PA no controlada (media \pm DE = 0.15 \pm 0.07).

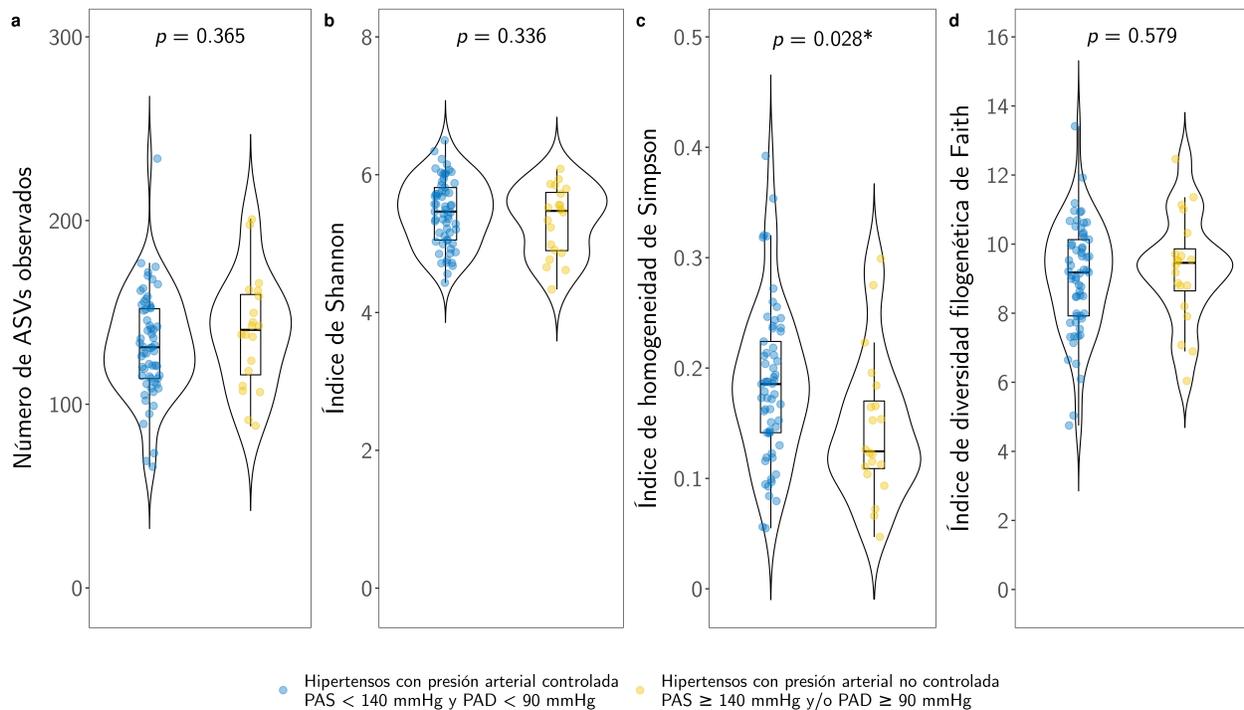


Figura 5: Gráficos de violín comparando diversidad alfa de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con presión arterial no controlada. (a) Número de ASVs observados; (b) Índice de Shannon; (c) Índice de homogeneidad de Simpson; (d) Índice de diversidad filogenética de Faith. Todas las métricas de diversidad alfa fueron calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. Los valores de p se calcularon con la prueba t de Student. ASV: *Amplicon Sequence Variant*; PAD: Presión arterial diastólica; PAS: Presión arterial sistólica. *Valor estadísticamente significativo, $p \leq 0.05$

5.3.3. Diversidad beta de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico

La diversidad beta se refiere al grado de diferenciación entre comunidades, individuos o muestras^{90,116}. Con el fin de obtener una visión más completa de la diversidad y estructura de la microbiota intestinal de los pacientes, se calcularon cuatro métricas que proporcionarían información distinta entre sí: (a) índice de disimilitud Jaccard (distancia basada en presencia-ausencia sin componente filogenético^{121,122}), (b) índice de disimilitud Bray-Curtis (distancia basada en abundancia sin componente filogenético^{122,123}), (c) UniFrac (distancia basada en presencia-ausencia con componente filogenético¹²⁴), y (d) UniFrac ponderado (distancia basada en abundancia con componente filogenético¹²⁵).

La diversidad beta de los pacientes se representó gráficamente utilizando un PCoA generado a partir de las distancias calculadas con cada métrica. Los gráficos de sedimentación para cada PCoA mostraron que en todos los casos se requieren más de 10 PCos para explicar por lo menos el 50 % de la varianza total de los datos, y más de 40 PCos para explicar el 90 %. Además, se observó que con respecto al resto de las métricas, el cálculo de distancias mediante UniFrac ponderado permitía explicar un mayor porcentaje de varianza utilizando un menor número de PCos (**Apéndice C**).

Los PCoAs se representaron utilizando las dos PCos con mayor porcentaje de varianza explicada. Con el índice de disimilitud Jaccard, el índice de disimilitud Bray - Curtis y la métrica UniFrac la varianza

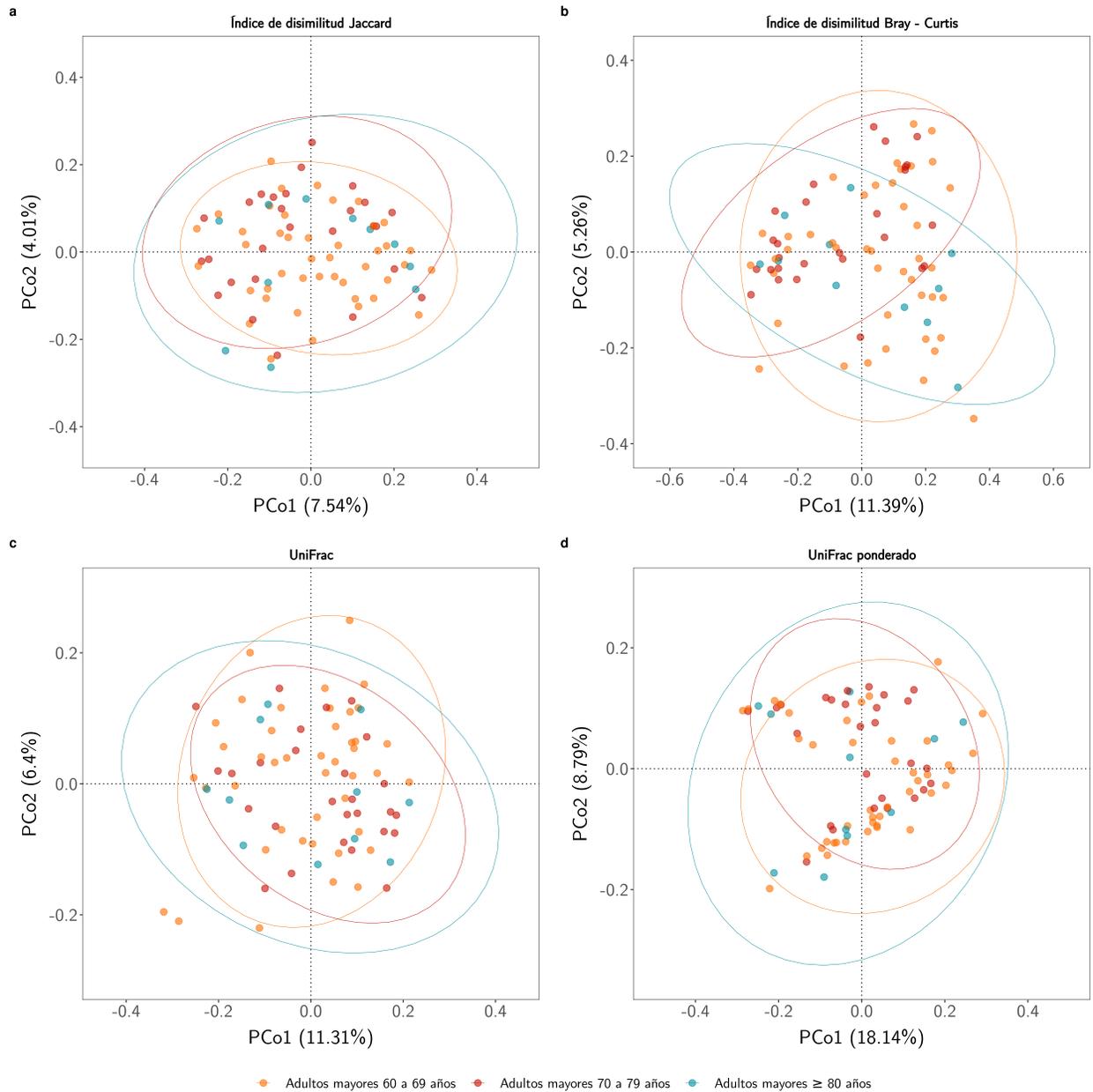


Figura 6: Diversidad beta de adultos mayores mexicanos clasificados por grupo de edad. (a) Índice de disimilitud Jaccard; (b) Índice de disimilitud Bray-Curtis; (c) UniFrac; (d) UniFrac ponderado. PCoA representados con PCo1 y PCo2. Todas las matrices de distancia para los análisis de beta diversidad fueron calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. ASV: *Amplicon Sequence Variant*; PCo: *Coordenada principal*; PCoA; *Análisis de coordenadas principales*.

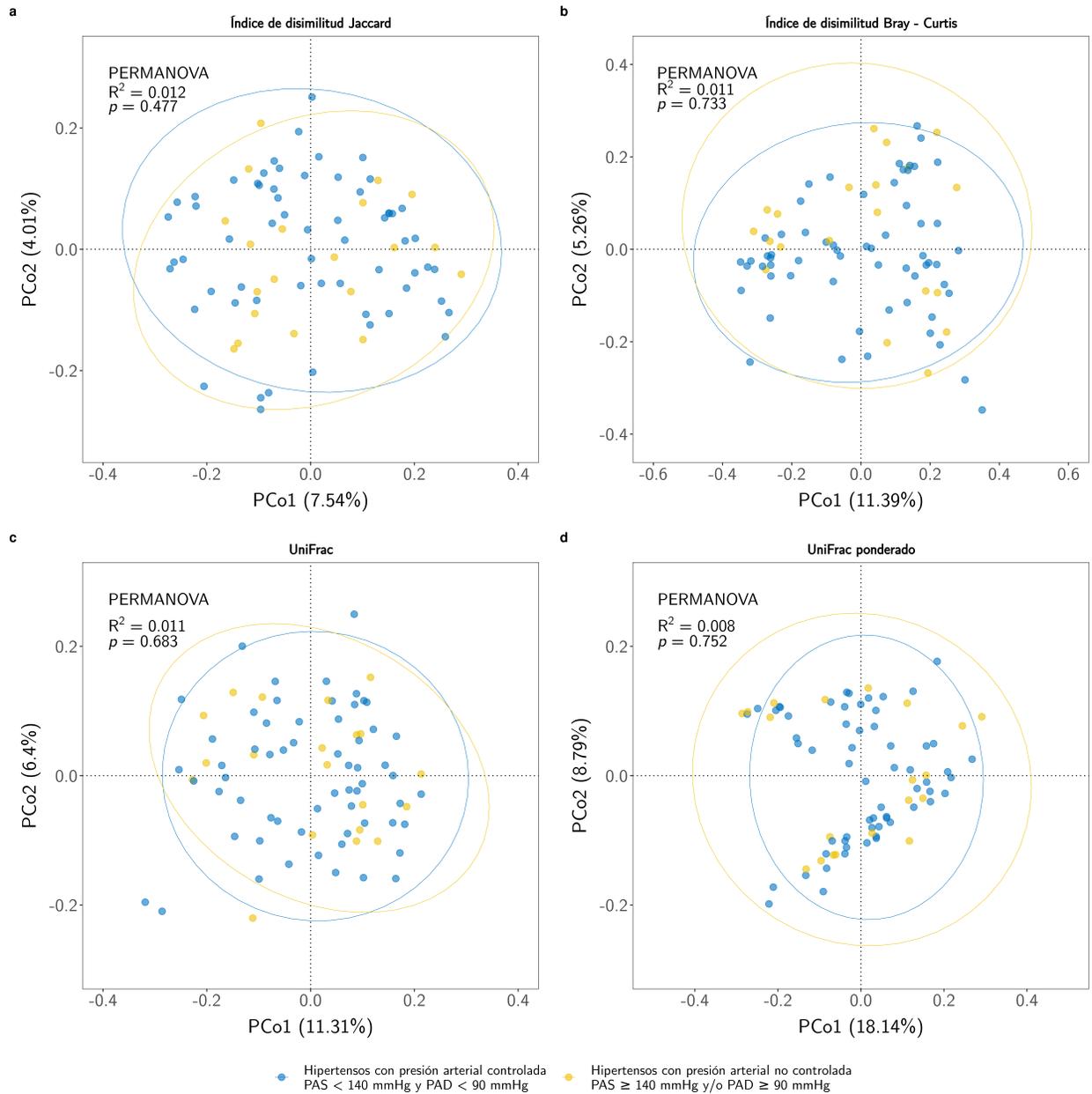


Figura 7: Diversidad beta de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con PA no controlada. (a) Índice de disimilitud Jaccard; (b) Índice de disimilitud Bray-Curtis; (c) UniFrac; (d) UniFrac ponderado. PCoA representados con PCo1 y PCo2, y resultado de PERMANOVA. Todas las matrices de distancia para los análisis de beta diversidad fueron calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. ASV: *Amplicon Sequence Variant*; PAD: Presión arterial diastólica; PAS: Presión arterial sistólica; PCo: Coordenada principal; PCoA; Análisis de coordenadas principales; PERMANOVA: Análisis de varianza multivariante permutacional.

total explicada fue menor al 20 %, mientras que con UniFrac ponderado fue posible explicar el 26.93 % (**Figuras 6 y 7**).

En cada PCoA se evaluó la separación de los pacientes clasificados según su edad y sus niveles de PA. En el caso de la clasificación de los pacientes por grupo de edad, se observó la separación parcial entre adultos mayores de 60 a 69 años y adultos mayores de 70 a 79 años con las métricas de presencia-ausencia: índice de disimilitud Jaccard e índice de disimilitud Bray-Curtis. No hubo un patrón claro de agrupamiento para adultos mayores de 80 años o más (**Figuras 6a y 6b**). Con las métricas UniFrac y UniFrac ponderado no se observaron patrones de separación entre los pacientes (**Figuras 6c y 6d**).

Con respecto a la clasificación de los pacientes según sus niveles de PA, se observó una tendencia de agrupamiento de hipertensos con PA controlada e hipertensos con PA no controlada con las métricas filogenéticas: índice de disimilitud Bray-Curtis y métrica UniFrac ponderado (**Figuras 7b y 7d**). Con las métricas no filogenéticas: índice de disimilitud Jaccard y UniFrac, no se observaron patrones de separación entre los grupos de pacientes (**Figuras 7a y 7c**). Además, ninguna de las métricas de diversidad beta empleadas mostró diferencia estadística significativa en la estructura de la microbiota intestinal bacteriana entre hipertensos con PA controlada e hipertensos con PA no controlada (PERMANOVA, $R^2 < 0.015$, $p > 0.05$, **Figura 7**).

5.4. Caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico

La asignación taxonómica de los ASVs generados se realizó estableciendo un porcentaje mínimo de similitud de 94.5 % con las secuencias de referencia de la base de datos SILVA versión 138.1. Se ha reportado que este porcentaje es el mínimo requerido para una asignación taxonómica confiable a nivel de género¹⁰⁸. Los 722 ASVs identificados y filtrados fueron asignados a 8 filos bacterianos y 136 géneros bacterianos distintos.

La composición de la microbiota intestinal bacteriana de la población de estudio se describe a continuación (**Apéndice D**). Los filos con mayor abundancia relativa fueron *Firmicutes* (mediana, mín.–máx.; 50.61 %, 19.10 %–82.74 %) y *Bacteroidota* (mediana, mín.–máx.; 42.10 %, 6.02 %–74.03 %), representando más del 90 % de la microbiota intestinal bacteriana (**Figura 8a y Tabla D1**), seguidos por *Proteobacteria* (mediana, mín.–máx.; 2.18 %, 0 %–34.30 %), *Actinobacteriota* (mediana, mín.–máx.; 0.10 %, 0 %–13.39 %) y *Verrucomicrobiota* (mediana, mín.–máx.; 0 %, 0 %–18.33 %). En menor abundancia se identificaron los filos *Desulfobacterota* (mediana, mín.–máx.; 0.04 %, 0 %–1.72 %), *Fusobacteriota* (mediana, mín.–máx.; 0 %, 0 %–16.53 %) y *Cyanobacteria* (mediana, mín.–máx.; 0 %, 0 %–3.13 %).

A nivel de género, los diez taxones con mayor abundancia relativa en la población de estudio fueron *Bacteroides* (mediana, mín.–máx.; 13.36 %, 1.20 %–52.50 %), *Prevotella 9* (mediana, mín.–máx.; 4.97 %, 0 %–61.58 %), *Faecalibacterium* (mediana, mín.–máx.; 4.14 %, 0 %–16.45 %), *Alistipes* (mediana, mín.–máx.; 2.59 %, 0 %–18.12 %), *UCG - 002* (mediana, mín.–máx.; 2.44 %, 0 %–26.17 %), *Agathobacter* (mediana, mín.–máx.; 2.04 %, 0 %–17.14 %), *Subdoligranulum*

(mediana, mín.—máx.; 1.78 %, 0 %—8.35 %), *Grupo Eubacterium coprostanoligenes* (mediana, mín.—máx.; 1.69 %, 0 %—12.96 %), *Roseburia* (mediana, mín.—máx.; 1.00 %, 0 %—14.33 %) y *Escherichia - Shigella* (mediana, mín.—máx.; 0.74 %, 0 %—34.21 %). Estos géneros representaron aproximadamente el 60 % de la composición de la microbiota intestinal bacteriana de los pacientes (**Figura 9a y Tabla D2**).

La composición de la microbiota intestinal bacteriana fue similar, con respecto a la población de estudio en general, al clasificar a los pacientes según su edad (**Figuras 8b y 9b**) y según sus niveles de PA (**Figuras 8c y 9c**). Sin embargo, se observaron algunas diferencias en los patrones de prevalencia de los taxones entre los pacientes por grupo de edad, dichas diferencias se describen a continuación.

A nivel de filo (**Figura 8b**), se encontró que el filo con mayor abundancia relativa para adultos mayores de 60 a 69 años y para adultos mayores de 70 a 79 años fue *Firmicutes* (mediana, mín.—máx.; 50.02 %, 19.10 %—82.74 % y 53.13 %, 29.67 %—66.98 %, respectivamente), seguido por el filo *Bacteroidota* (mediana, mín.—máx.; 42.10 %, 6.02 %—73.49 % y 40.80 %, 27.63 %—69.04 %, respectivamente); mientras que para adultos mayores de 80 años o más el orden de prevalencia se invirtió, siendo el filo con mayor abundancia relativa *Bacteroidota* (mediana, mín.—máx.; 47.10 %, 19.62 %—74.03 %), seguido por *Firmicutes* (mediana, mín.—máx.; 45.64 %, 25.42 %—79.72 %). También se observó la disminución en la abundancia relativa de los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteriota* con el incremento de la edad: adultos mayores de 60 a 69 años (mediana, mín.—máx.; 3.51 %, 0 %—34.30 % y 0.11 %, 0 %—13.39 %, respectivamente), adultos mayores de 70 a 79 años (mediana, mín.—máx.; 1.61 %, 0.11 %—10.46 % y 0.07 %, 0 %—8.73 %, respectivamente) y adultos mayores de 80 años o más (mediana, mín.—máx.; 1.10 %, 0 %—22.33 % y 0.03 %, 0 %—0.23 %, respectivamente).

A nivel de género (**Figura 9b**), las principales tendencias encontradas fueron las siguientes. Se observó la disminución en la abundancia relativa del género *Bacteroides* con el aumento simultáneo en la abundancia relativa del género *Prevotella 9* en adultos mayores de 70 a 79 años (mediana, mín.—máx.; 8.16 %, 2.38 %—50.82 % y 20.36 %, 0 %—56.48 %, respectivamente), en comparación con adultos mayores de 60 a 69 años (mediana, mín.—máx.; 17.44 %, 1.20 %—52.50 % y 0.42 %, 0 %—61.58 %, respectivamente) y adultos mayores de 80 años o más (mediana, mín.—máx.; 17.81 %, 3.27 %—50.77 % y 5.11 %, 0 %—56.26 %, respectivamente). También se observó la disminución en la abundancia relativa del género *Faecalibacterium* en adultos mayores de 80 años o más (mediana, mín.—máx.; 3.01 %, 0.50 %—11.94 %), con respecto a adultos mayores de 60 a 69 años (mediana, mín.—máx.; 3.90 %, 0 %—16.45 %) y adultos mayores de 70 a 79 años (mediana, mín.—máx.; 5.96 %, 0.94 %—12.75 %). Además, se observó el aumento en la abundancia relativa del género *Escherichia - Shigella* en adultos mayores de 60 a 69 años (mediana, mín.—máx.; 1.57 %, 0 %—34.21 %), a diferencia de adultos mayores de 70 a 79 años (mediana, mín.—máx.; 0.33 %, 0 %—8.59 %) y adultos mayores de 80 años o más (mediana, mín.—máx.; 0.37 %, 0 %—16.27 %).

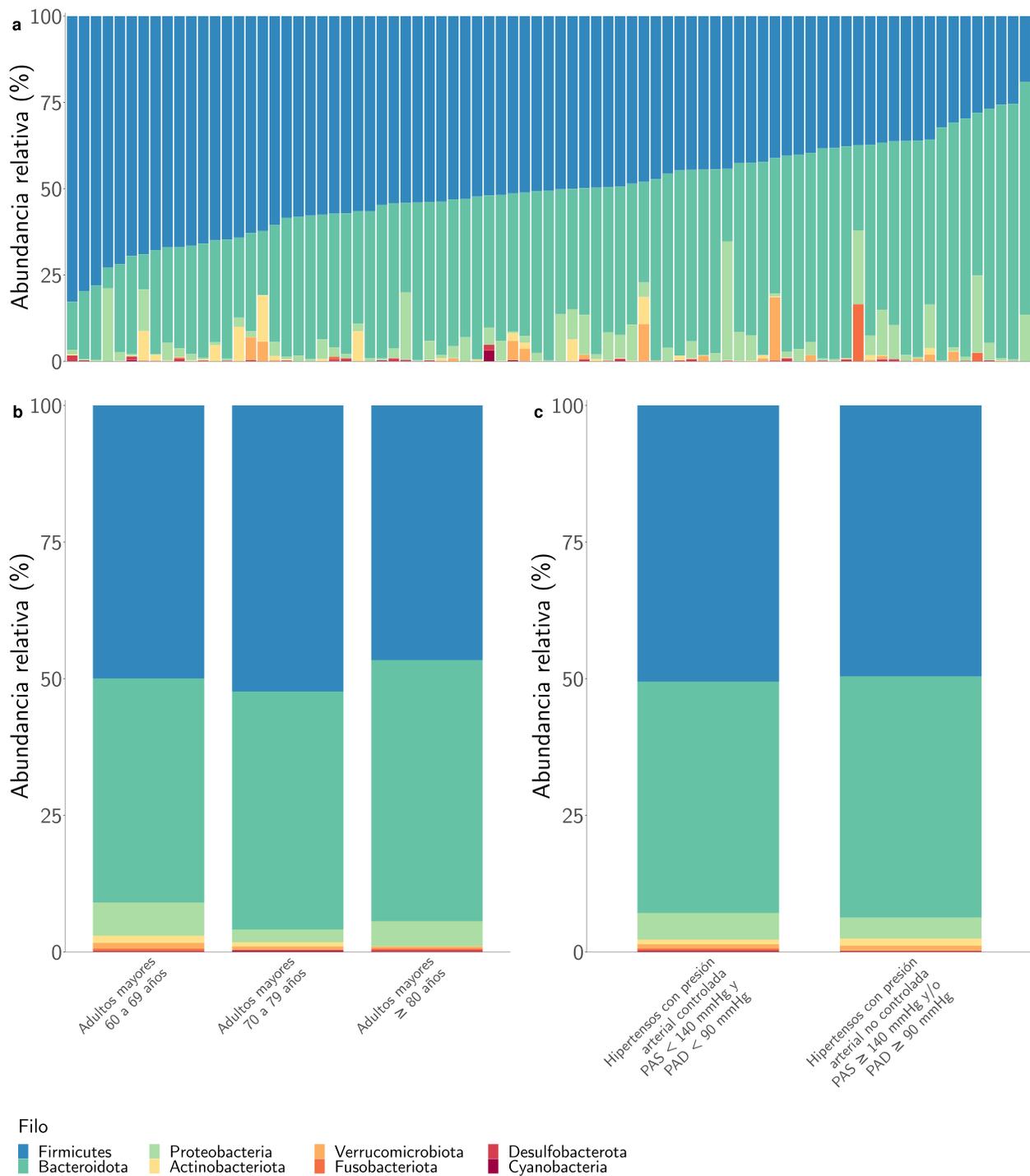


Figura 8: Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico a nivel de filo. (a) Composición bacteriana por individuo; (b) Composición bacteriana por grupo según edad; (c) Composición bacteriana por grupo según niveles de PA. La composición bacteriana por grupo se presenta como la media de la abundancia relativa de los taxones. Hipertensos con PA controlada: Presión arterial sistólica < 140 mmHg y presión arterial diastólica < 90 mmHg. Hipertensos con PA no controlada: Presión arterial sistólica \geq 140 mmHg y/o presión arterial diastólica \geq 90 mmHg. PA: Presión arterial

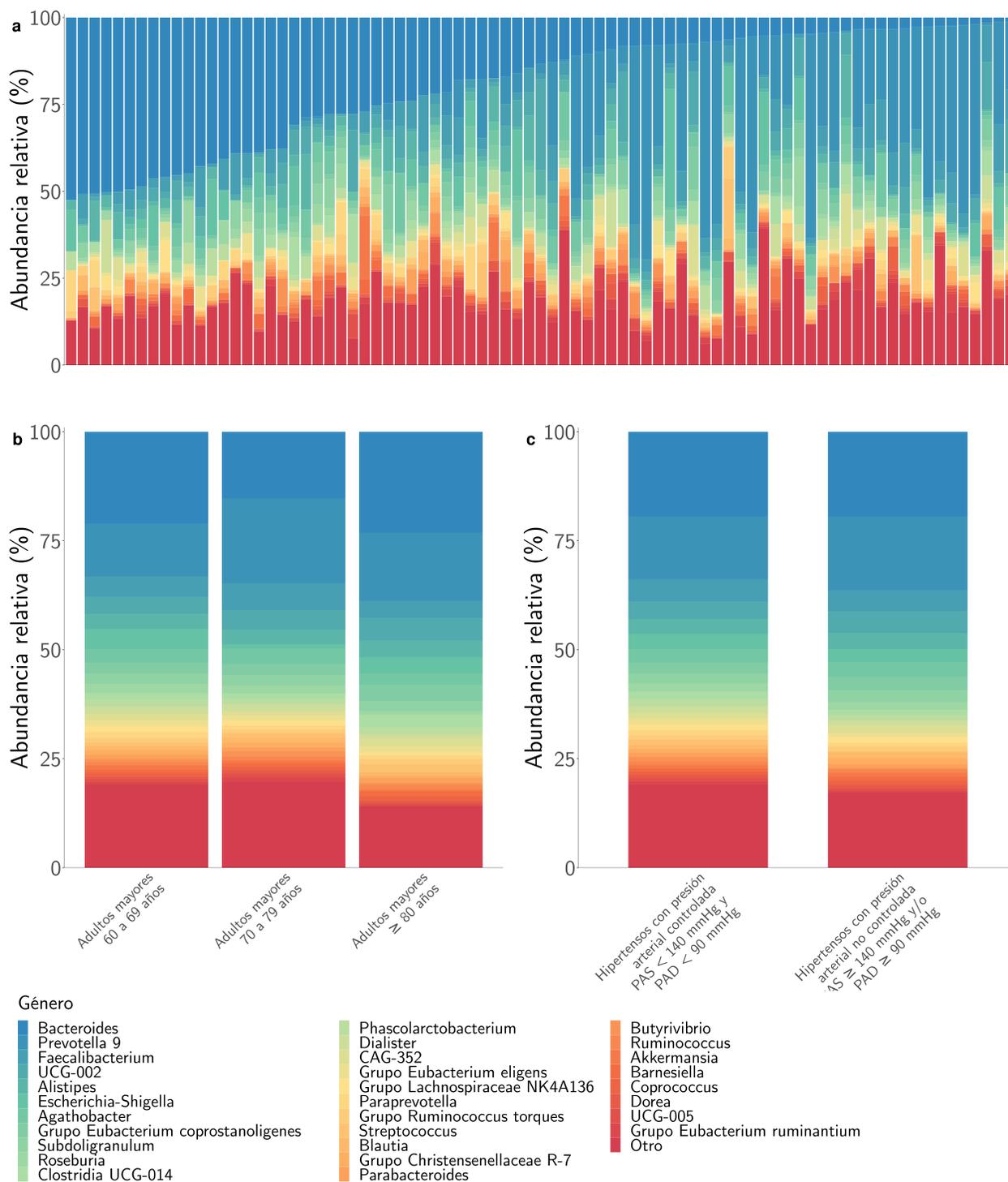


Figura 9: Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico a nivel de género. (a) Composición bacteriana por individuo; (b) Composición bacteriana por grupo; (c) Composición bacteriana por grupo según niveles de PA. Se presentan los 30 géneros bacterianos más abundantes. La composición bacteriana por grupo se presenta como la media de la abundancia relativa de los taxones. Hipertensos con PA controlada: Presión arterial sistólica < 140 mmHg y presión arterial diastólica < 90 mmHg. Hipertensos con PA no controlada: Presión arterial sistólica \geq 140 mmHg y/o presión arterial diastólica \geq 90 mmHg. PA: Presión arterial

5.5. Índice *Firmicutes*/*Bacteroidota* de adultos mayores hipertensos bajo tratamiento farmacológico

El índice F/B se puede relacionar con cambios en la salud, debido a que los filos *Firmicutes* y *Bacteroidota* son los taxones más abundantes de la microbiota intestinal bacteriana¹²⁸⁻¹³⁰. El índice F/B en la población de estudio tuvo una mediana de 1.23 con una variación de 0.28 a 12.11.

El índice F/B se comparó entre adultos mayores de 60 a 69 años, adultos mayores de 70 a 79 años y adultos mayores de 80 años o más (**Figura 10a**). No se encontró diferencia significativa entre los grupos (Kruskal-Wallis, $p = 0.510$).

El índice F/B también se comparó entre hipertensos con PA controlada e hipertensos con PA no controlada (**Figura 10b**). No se encontró diferencia significativa entre los grupos (*U* de Mann - Whitney, $p = 0.772$).

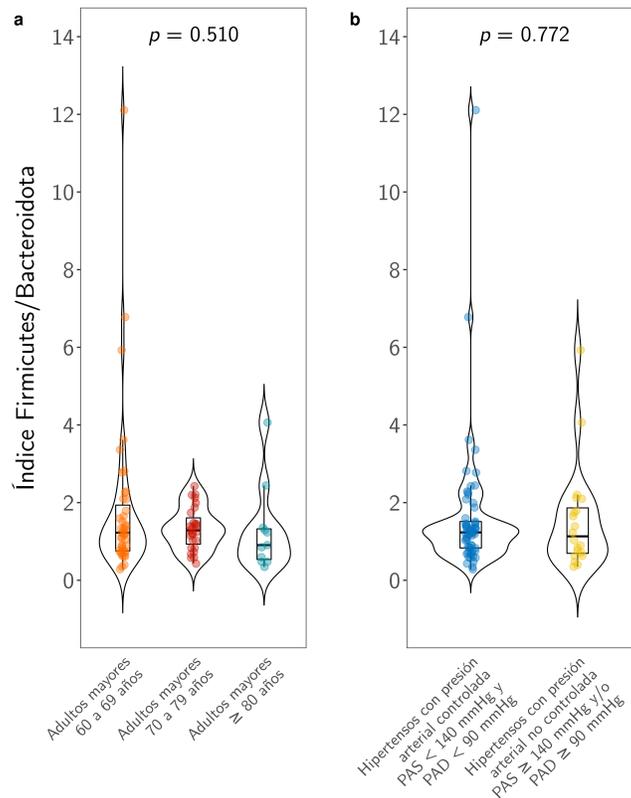


Figura 10: Gráficos de violín de índice *Firmicutes*/*Bacteroidota*. (a) Comparación de adultos mayores mexicanos clasificados por grupo de edad. El valor de p se calculó con la prueba Kruskal-Wallis; (b) Comparación de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con presión arterial no controlada. El valor de p se calculó con la prueba *U* de Mann - Whitney. ANOVA: Análisis de varianza; PAD: Presión arterial diastólica; PAS: Presión arterial sistólica

5.6. Abundancia diferencial de taxones de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con presión arterial no controlada

Con el objetivo de identificar taxones, tanto a nivel de filo como de género, con abundancia diferencial entre hipertensos con PA controlada e hipertensos con PA no controlada se utilizaron tres métodos estadísticos distintos: LEfSe, GLM-CLR y GLM-NB. En primer lugar, los análisis se realizaron sin considerar variables de confusión o variables clínicas.

El análisis con LEfSe mostró diferencia significativa en la abundancia de cuatro géneros bacterianos (**Figura 11a**). El género *Intestinibacter* (LDA = 2.30, $p = 0.014$) se encontró enriquecido en hipertensos con PA controlada, mientras que los géneros *Ralstonia* (LDA = 1.66, $p = 0.042$), *Marvinbryantia* (LDA = 1.92, $p = 0.018$) y *Grupo Lachnospiraceae FCS020* (LDA = 2.28, $p = 0.016$) se encontraron enriquecidos en hipertensos con PA no controlada. Ninguno de los taxones conservó su significancia estadística tras el ajuste por FDR (p ajustado > 0.05).

Con el método GLM-CLR sin variables clínicas se identificaron cinco géneros bacterianos con abundancia diferencial entre grupos (**Figura 11b**). Los géneros *Tyzerella* ($\beta = -0.78$, $p = 0.050$) y *Allisonella* ($\beta = -0.54$, $p = 0.047$) se encontraron disminuidos en hipertensos con PA no controlada con respecto a hipertensos con PA controlada, mientras que los géneros *Intestinibacter* ($\beta = 0.77$, $p = 0.038$), *Marvinbryantia* ($\beta = 0.62$, $p = 0.033$) y *Grupo Lachnospiraceae FCS020* ($\beta = 1.06$, $p = 0.010$) se encontraron enriquecidos. No obstante, la significancia estadística de los taxones no se conservó tras el ajuste por FDR (p ajustado > 0.05).

El método GLM-NB sin variables clínicas determinó abundancia diferencial en dos géneros bacterianos (**Figura 11b**). Tanto el género *Tyzerella* ($\beta = -3.44$, $p = 0.015$), como *Streptococcus* ($\beta = -1.48$, $p = 0.003$) se encontraron disminuidos en hipertensos con PA no controlada con respecto a hipertensos con PA controlada. Ninguno de los taxones resultó estadísticamente significativo tras el ajuste por FDR (p ajustado > 0.05).

Al comparar los resultados de los métodos sin variables clínicas y previo al ajuste por FDR, se encontró que ningún taxón con abundancia diferencial fue identificado por los tres métodos. Sin embargo, los géneros *Tyzerella*, *Marvinbryantia* y *Grupo Lachnospiraceae FCS020* mostraron enriquecimiento en el mismo grupo de pacientes hipertensos utilizando dos métodos estadísticos distintos (**Figura 11c**).

Únicamente se añadieron variables clínicas a los análisis con GLM-CLR y GLM-NB, puesto que LEfSe no permite este tipo de ajuste. Las variables clínicas incluidas en los modelos fueron: (a) sexo, (b) edad, (c) IMC, y (d) nivel de adherencia terapéutica.

Utilizando el método GLM-CLR con variables clínicas, los géneros *Grupo Lachnospiraceae FCS020* ($\beta = 1.01$, $p = 0.020$) y *Grupo Familia XIII AD3011* ($\beta = 0.75$, $p = 0.046$) se encontraron sobrerrepresentados en hipertensos con PA no controlada (**Figura 12a**). En tanto que, el método GLM-NB con variables clínicas mostró abundancia diferencial para el género *Tyzerella* ($\beta = -3.94$, $p = 0.031$), el cual se encontró enriquecido en hipertensos con PA controlada (**Figura 12a**). La significancia estadística de los taxones no se conservó después del ajuste por FDR (p ajustado > 0.05).

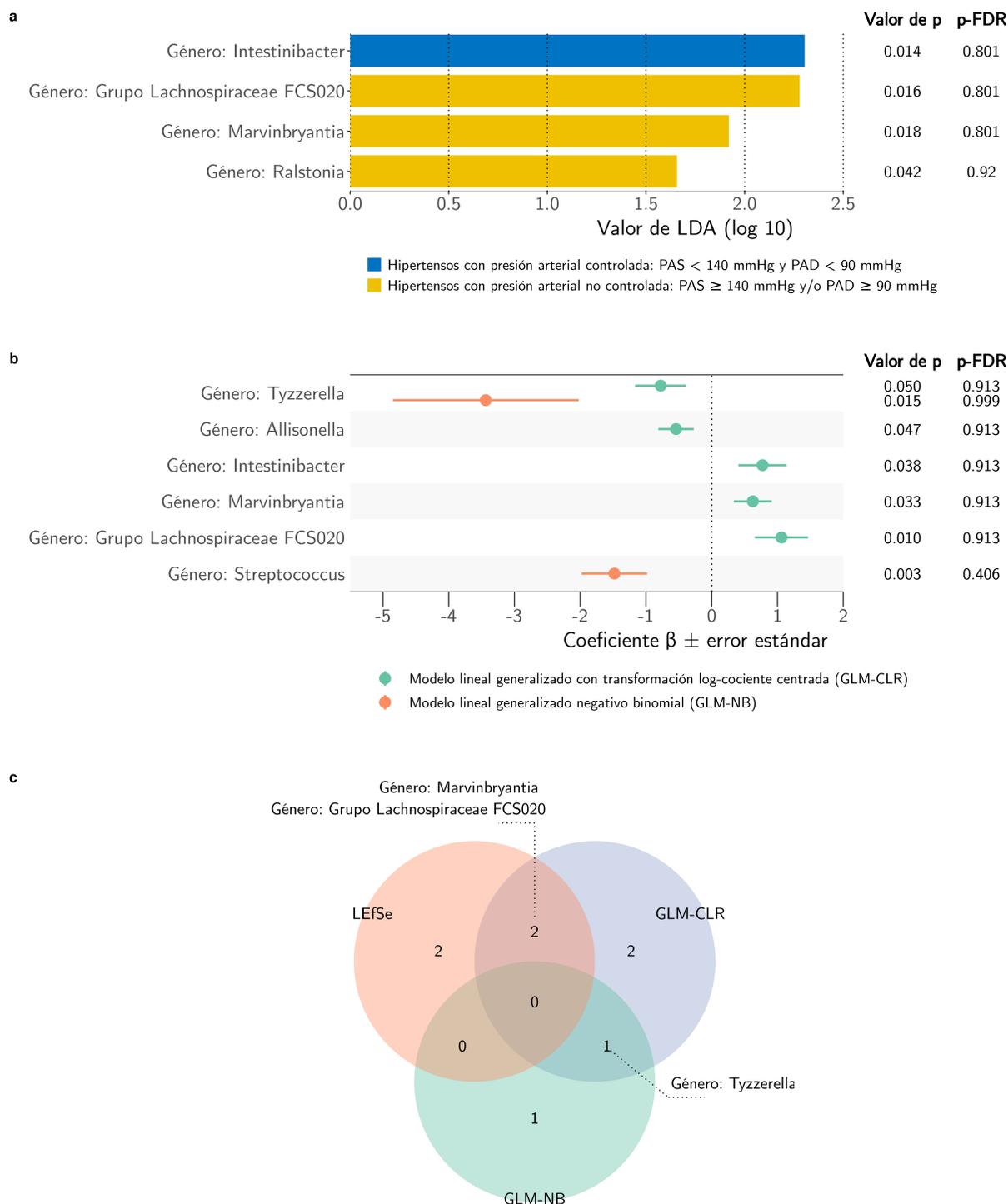


Figura 11: Abundancia diferencial de taxones utilizando métodos estadísticos sin variables clínicas. (a) LefSe; (b) GLM-CLR y GLM-NB. Taxones con valor β negativo enriquecidos en hipertensos con PA controlada, taxones con valor β positivo enriquecidos en hipertensos con PA no controlada; (c) Diagrama de Venn indicando los taxones con abundancia diferencial identificados por al menos dos métodos estadísticos distintos, previo a la corrección por el método FDR. p-FDR: Valor de p ajustado por el método FDR. GLM-CLR: Modelo lineal generalizado con transformación log-cociente centrada; GLM-NB: Modelo lineal generalizado negativo binomial; FDR: *False discovery rate*/Tasa de descubrimientos falsos; LefSe; *Linear discriminant analysis effect size*; LDA: *Análisis discriminante lineal*; PAD: *Presión arterial diastólica*; PAS: *Presión arterial sistólica*

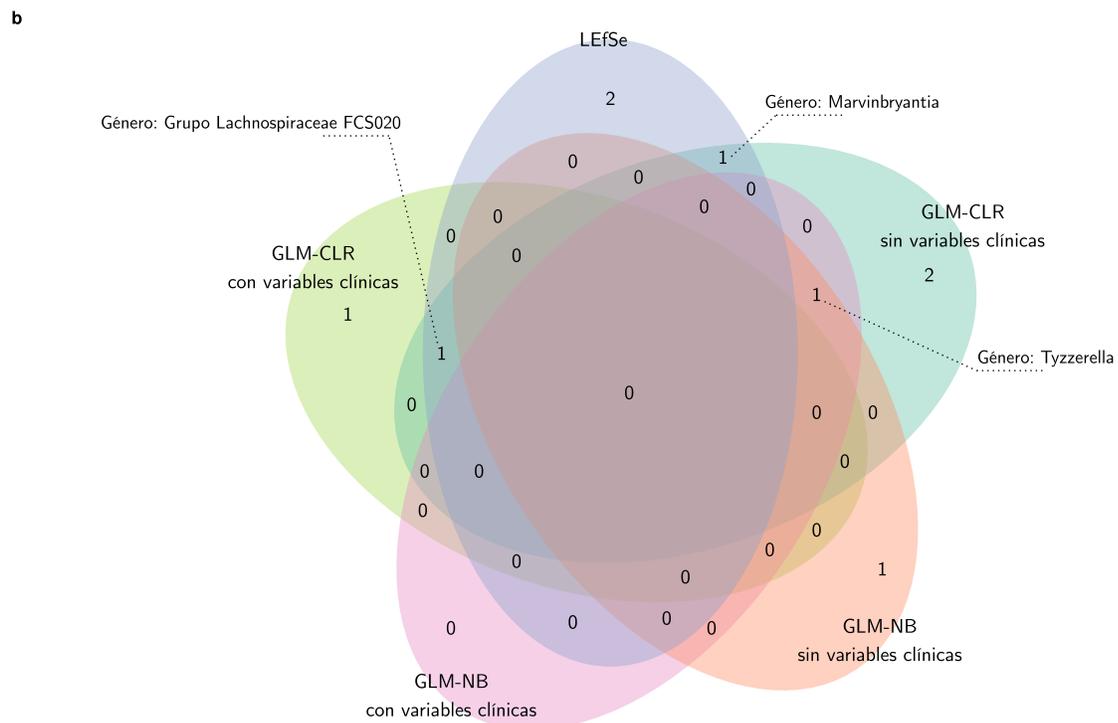
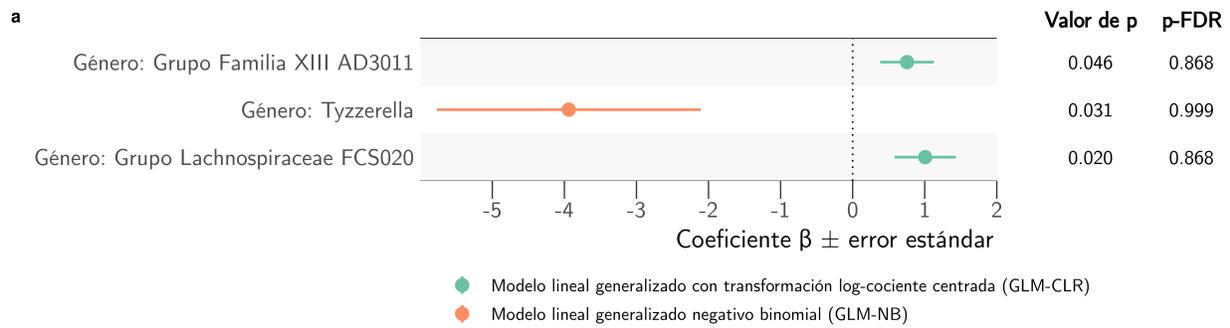


Figura 12: Abundancia diferencial de taxones utilizando métodos estadísticos con variables clínicas. **(a)** GLM-CLR y GLM-NB. Taxones con valor β negativo enriquecidos en hipertensos con PA controlada, taxones con valor β positivo enriquecidos en hipertensos con PA no controlada; **(b)** Diagrama de Venn indicando los taxones con abundancia diferencial identificados por al menos dos métodos estadísticos distintos, con y sin variables clínicas, previo a la corrección por el método FDR. p -FDR: Valor de p ajustado por el método FDR. GLM-CLR: Modelo lineal generalizado con transformación log-cociente centrada; GLM-NB: Modelo lineal generalizado negativo binomial; FDR: *False discovery rate*/Tasa de descubrimientos falsos

Si bien, no hubo coincidencia en los resultados de los métodos estadísticos con variables clínicas previo al ajuste por FDR, los géneros *Tyzerella* y *Grupo Lachnospiraceae FCS020* ya habían sido previamente identificados con abundancia diferencial al emplear los métodos estadísticos sin variables clínicas.

En resumen, la abundancia diferencial de los géneros *Tyzerella*, *Marvinbryantia* y *Grupo Lachnospiraceae FCS020* fue identificada por distintos métodos estadísticos, con y sin ajuste por variables clínicas, previo a la corrección por FDR (**Figura 12b**). En este sentido, la abundancia del género *Tyzerella* fue mayor en hipertensos con PA controlada que en hipertensos con PA no controlada. Mientras que los géneros *Marvinbryantia* y *Grupo Lachnospiraceae FCS020* se encontraron en mayor proporción en hipertensos con PA no controlada que en hipertensos con PA controlada. Sin embargo, estos hallazgos deber ser validados con experimentos dirigidos, o bien, en un grupo de estudio con mayor tamaño muestral.

5.7. Composición funcional de la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial: PICRUSt 2

Se llevó a cabo la predicción de la composición funcional de la microbiota intestinal bacteriana de la población de estudio con el *software* PICRUSt 2¹⁴⁰ y utilizando la base de datos MetaCyc¹⁴¹. Se identificaron un total de 348 vías metabólicas relacionadas con la microbiota intestinal bacteriana. Entre las vías metabólicas más abundantes en la población de estudio se encontraron la vía de la pentosa fosfato, biosíntesis anaeróbica de gondoato, biosíntesis II de L - isoleucina, degradación V de almidón y fermentación de piruvato a isobutanol (**Tabla 6**). La abundancia relativa de las vías metabólicas no mostró diferencia significativa entre hipertensos con PA controlada e hipertensos con PA no controlada con LEfSe (LDA < 1.5, *p* > 0.05).

Tabla 6: Predicción funcional de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial

Vía metabólica	Abundancia relativa (%)		
	Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo
Vía pentosa fosfato (rama no oxidativa)	1.15 ± 0.13	1.12	0.88 – 1.53
Biosíntesis de gondoato (anaeróbica)	1.03 ± 0.09	1.04	0.78 – 1.27
Biosíntesis II de L-isoleucina	1.01 ± 0.10	1.00	0.75 – 1.28
Degradación V de almidón	0.98 ± 0.11	0.98	0.66 – 1.18
Fermentación de piruvato a isobutanol	0.98 ± 0.10	0.96	0.74 – 1.21
Biosíntesis de ácido cis - vaccénico	0.96 ± 0.08	0.97	0.74 – 1.27
Biosíntesis I de L-isoleucina (a partir de treonina)	0.94 ± 0.09	0.93	0.73 – 1.18
Biosíntesis de L-valina	0.94 ± 0.09	0.93	0.73 – 1.18
Biosíntesis IV de L-isoleucina	0.93 ± 0.10	0.93	0.70 – 1.25
Biosíntesis <i>de novo</i> de ribonucleótidos de adenosina	0.93 ± 0.09	0.92	0.70 – 1.17

Predicción funcional con PICRUSt 2 y la base de datos MetaCyc. Se muestran las 10 vías metabólicas más abundantes. DE: Desviación estándar

6. Discusión

La HTA es un problema de salud pública que afecta a 31.1 % de los adultos a nivel global, con una prevalencia del 30.2% en México¹². La PA incrementa con la edad como resultado del proceso de envejecimiento, por lo que la HTA afecta principalmente a adultos mayores (≥ 60 años)¹⁴³⁻¹⁴⁵. Debido a esto y al rápido envejecimiento poblacional actual, se espera que la prevalencia de HTA incremente en los próximos años¹⁴³. Además, niveles elevados de PA incrementan el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular, lo que resalta la importancia del control adecuado de la enfermedad, sobre todo en pacientes adultos mayores¹⁴³⁻¹⁴⁶. No obstante, en México únicamente la mitad de los pacientes hipertensos tiene valores de PA controlados¹².

La HTA tiene un origen multifactorial que involucra factores de riesgo tanto genéticos como ambientales¹⁴⁷. Recientemente, se ha demostrado que alteraciones en la microbiota intestinal se asocian con la HTA. En este estudio se caracterizó la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial bajo tratamiento farmacológico. Asimismo, se comparó su composición y estructura entre hipertensos con PA controlada (PAS < 140 mmHg y PAD < 90 mmHg) e hipertensos con PA no controlada (PAS ≥ 140 mmHg y/o PAD ≥ 90 mmHg), siendo el primer estudio en su tipo reportado.

6.1. Microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos

La microbiota intestinal humana cambia con la edad^{34,148} como consecuencia de cambios fisiológicos en el tracto gastrointestinal y en los patrones dietéticos, así como del deterioro en la función normal del sistema inmune (inmunosenescencia) que puede incrementar el riesgo de sufrir infecciones y fragilidad¹⁴⁹. Estos cambios son más evidentes en adultos mayores, población cuya proporción incrementará en los próximos años debido al envejecimiento demográfico que se vive actualmente¹⁴³. Debido a ello, es importante ahondar en la caracterización de factores, como la microbiota intestinal, que permitan modular condiciones de salud y enfermedad en este sector de la población¹⁵⁰.

6.1.1. Diversidad alfa de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos

La microbiota del tracto gastrointestinal humano forma un denso ecosistema dominado por bacterias¹⁵¹. Mantener la suficiente riqueza y diversidad bacteriana en dicho ecosistema resulta importante para brindar a la microbiota intestinal redundancia funcional, adaptabilidad y resiliencia frente a distintas condiciones ambientales^{34,152}. Esta riqueza y variabilidad en un solo ecosistema se conoce como diversidad alfa^{90,116}. En este estudio, la diversidad alfa se midió utilizando cuatro métricas distintas: (a) número de ASVs observados, (b) índice de Shannon, (c) índice de homogeneidad de Simpson, e (d) índice de diversidad filogenética de Faith.

Con el fin de contribuir a la caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos, se describió la diversidad alfa de la población de estudio (**Tabla 5**). Utilizando el índice de Shannon, la diversidad alfa de adultos mayores mexicanos fue de 5.42, similar al índice aproximado de 4.00 a 7.00 previamente reportado para adultos mayores en Japón³⁴. Por el contrario, la diversidad alfa fue menor en comparación con el índice de 6.40 reportado para adultos mayores en China³⁸, y mayor al comparar con los índices aproximados de 0.20 a 4.50, 1.50 a 3.50 y 3.09 a 4.86 reportados para adultos mayores en Estados Unidos¹⁵³, Italia¹⁵⁴ y Corea del Sur¹⁵⁵. Si bien, esta variación en la diversidad bacteriana con respecto a otras poblaciones puede deberse a diferencias en las estrategias metodológicas utilizadas como el procedimiento de extracción de ADN o el análisis bioinformático, también puede deberse al distinto origen geográfico, étnico y/o racial de las poblaciones^{148,156-158}. Esta variación entre poblaciones de origen distinto se ha reportado antes y se ha atribuido a distintos factores como variabilidad genética de los individuos, diferencias en la inmunidad innata y adaptativa, dieta, higiene, estilo de vida, condiciones ambientales del entorno, enfermedades crónico-degenerativas, entre otros^{148,156-159}.

Debido a estos cambios en la microbiota intestinal de poblaciones de origen diferente, Gupta *et al.* (2017) mencionan la necesidad de que las estrategias terapéuticas derivadas de estudios de microbiota humana tengan un enfoque comunitario propio de cada área geográfica. Sin embargo, en la actualidad, a nivel mundial, las regiones de Europa y Norteamérica son las más representadas en investigaciones sobre microbiota humana, mientras que Latinoamérica, incluyendo México, es la quinta región menos representada¹⁶⁰. Esto resalta la importancia del presente estudio y su contribución a la caracterización de la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos, así como la necesidad de ampliar los estudios en población mexicana que permitan generar conclusiones más significativas.

La diversidad alfa, además, se comparó estadísticamente entre adultos mayores de 60 a 69 años, adultos mayores de 70 a 79 años y adultos mayores de 80 años o más (**Figura 4**). Los resultados no mostraron diferencia significativa en la diversidad alfa de los grupos de estudio. Estos resultados son similares a lo reportado previamente en el estudio de Kim *et al.* (2019), en el cual se comparó la microbiota intestinal de centenarios (95 a 108 años), adultos mayores (67 a 79 años) y adultos jóvenes (26 a 43 años). En ese estudio, no se encontró diferencia significativa en la diversidad alfa entre los grupos de estudio, aún cuando la dieta de centenarios y adultos mayores era significativamente distinta a la de adultos jóvenes.

Mientras la diversidad alfa describe la riqueza y variabilidad de especies en un ecosistema o individuo, la diversidad beta identifica diferencias en la composición de distintos ecosistemas o individuos^{90,116}. En este estudio, la diversidad beta se midió utilizando cuatro métricas distintas: (a) índice de disimilitud de Jaccard, (b) índice de disimilitud Bray-Curtis, (c) UniFrac, y (d) UniFrac ponderado. A partir de dichas métricas, se generaron PCoAs para representar gráficamente la diversidad beta de los adultos mayores mexicanos incluidos en este estudio (**Figura 6**). En primer lugar, los PCoAs muestran la alta variabilidad que existe en la composición de la microbiota intestinal humana. En segundo lugar, con el índice de disimilitud de Jaccard y el índice de disimilitud Bray-Curtis, métricas basadas en la presencia-ausencia de especies bacterianas¹²¹⁻¹²³, se observó la separación parcial entre adultos mayores de 60 a 69 años y adultos mayores de 70 a 79 años, lo cual podría indicar que existen taxones bacterianos presentes únicamente en alguno de los dos grupos. Esto coincide con otros estudios en los que se ha reportado una separación evidente entre adultos mayores de distintas edades al comparar su diversidad beta^{34,38,154,155}. Sin embargo, a diferencia de esos estudios, en el presente proyecto la separación de los grupos es parcial, además de que las métricas de diversidad beta se calcularon a nivel de ASVs y utilizando el método de rarefacción para la normalización de los datos. Por tanto, utilizar otros métodos de normalización, así como calcular las métricas de diversidad beta en distintos niveles taxonómicos, podría ayudar a visualizar patrones de separación concretos entre adultos mayores mexicanos de distintas edades.

6.1.2. Composición taxonómica de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos

En este estudio, tal como se ha reportado previamente, los filos dominantes de la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos fueron *Firmicutes*, 50.61%, y *Bacteroidota*, 42.10%, representando en conjunto más del 90% de la composición bacteriana, seguidos por *Proteobacteria*, 2.18%, y *Actinobacteriota*, 0.10%^{128,130,161}. En menor proporción se encontraron los filos *Verrucomicrobiota*, *Fusobacteriota*, *Desulfobacterota* y *Cyanobacteria*, con menos del 0.04% de abundancia (**Figura 8** y **Tabla D1**). Esta composición a nivel de filo se ha reportado tanto en individuos sanos como en condiciones de enfermedad, lo cual se debe a la plasticidad de la microbiota que permite el rápido regreso a su composición inicial¹²⁸

La relación entre los filos *Firmicutes* y *Bacteroidota*, conocida como índice F/B, se ha asociado con el mantenimiento de la homeostasis y cambios en este índice se relacionan con la progresión de la edad así como con diversas patologías^{128,130}. En este estudio, el índice F/B de adultos mayores mexicanos fue de 1.23, presentando una alta variabilidad inter-individual con índices desde 0.28 hasta 12.11 (**Figura 10a**). Esta variabilidad fue reflejo de la variación en la abundancia relativa de los filos *Firmicutes*, 19.10% a 83.74%, y *Bacteroidota*, 6.02% a 74.03%. Previamente, se ha reportado que los adultos mayores presentan una extensa variabilidad inter-individual en la composición de la microbiota intestinal, y que dicha variabilidad es aún mayor que la observada en adultos sanos¹⁶².

Aunado a lo anterior, el índice F/B de la población de estudio, 1.23, resultó elevado en comparación con el índice de 0.6 previamente reportado para adultos mayores en Francia¹⁶³, disminuido en comparación con el índice de 4.5 reportado para adultos mayores en Tailandia¹⁶⁴ y similar al índice de 1.42 reportado

para adultos mayores en Ucrania¹⁶⁵. Como se mencionó anteriormente, estas diferencias pueden deberse a variaciones en las estrategias metodológicas utilizadas, o bien, a variaciones existentes entre poblaciones de origen distinto derivadas de factores como la dieta. En este caso, el estudio de adultos mayores en Francia reporta el consumo de una dieta occidental (alto consumo de grasas saturadas y sucrosa y bajo consumo de fibra¹⁶⁶) sin restricciones, y el estudio en adultos mayores en Tailandia reporta un alto consumo de vegetales y frutas, mientras que tanto en el presente estudio como en el de adultos mayores en Ucrania no se reporta información sobre la dieta de los pacientes. Con esto se reitera la importancia de caracterizar la microbiota humana de forma específica para cada población, así como de incluir variables que pueden influir en su composición.

El índice F/B se comparó estadísticamente entre adultos mayores de 60 a 69 años, adultos mayores de 70 a 79 años y adultos mayores de 80 años o más. El índice F/B no mostró diferencia significativa entre los grupos de estudio, sin embargo, se observaron valores disminuidos, 0.91, en adultos mayores de 80 años o más (**Figura 10a**). Esto coincide con la prevalencia del filo *Bacteroidota*, 47,10 %, sobre el filo *Firmicutes*, 45.64 %, observada en este grupo de edad (**Figura 8b**). Estudios previos han reportado la disminución del índice F/B con el incremento de la edad^{162-164,167}, así como el incremento en la abundancia relativa del filo *Bacteroidota*^{34,162}, lo cual se ha atribuido a los cambios fisiológicos digestivos característicos de la senectud, como reducción en el tránsito y secreciones digestivas¹⁶³, que podrían favorecer la colonización de unas bacterias sobre otras.

Además de lo anterior, se observó una tendencia a la disminución del filo *Proteobacteria* con el incremento de la edad, con una abundancia de 3.51 %, 1.61 % y 1.10 % en adultos mayores de 60 a 69 años, 70 a 79 años y 80 años o más, respectivamente. La misma tendencia se observó para el filo *Actinobacteriota*, con abundancias de 0.11 %, 0.07 % y 0.03 % para adultos mayores de 60 a 69 años, 70 a 79 años y 80 años o más, respectivamente (**Figura 8b**). Previamente se ha reportado que la abundancia relativa del filo *Actinobacteriota* comienza a disminuir en edades tempranas, específicamente durante el proceso de destete, y que dicha disminución continúa con el progreso de la edad³⁴. No obstante, para el filo *Proteobacteria*, filo asociado con bacterias patógenas, se ha reportado el incremento en la abundancia relativa a partir de los 60 o 70 años de edad como consecuencia del proceso de disfunción inmunológica que ocurre con la edad y que podría favorecer la colonización de patógenos oportunistas^{34,162,168}. Si bien es necesario comprobar estadísticamente las tendencias aquí descritas, esta discrepancia con otros estudios podría deberse a diferencias en las estrategias metodológicas utilizadas, así como al origen distinto de las poblaciones como se mencionó antes, e incluso a diferencias en las características de los pacientes como edad, sexo, padecimiento de enfermedades, entre otros.

A nivel de género, se encontró que la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos se compone por 136 géneros bacterianos distintos (**Tabla D2**). El género *Bacteroides*, 13.36 %, fue el más abundante en la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos, seguido por *Prevotella 9*, 4.97 % (**Figura 9**). Esta predominancia de *Bacteroides* sobre *Prevotella* se ha asociado con el consumo de dietas ricas en carbohidratos y grasas en países industrializados¹⁶⁹⁻¹⁷¹. *Faecalibacterium*, *Alistipes* y *UCG - 002* de la familia *Ruminococcaceae* también se encontraron dentro de los géneros con mayor abundancia relativa, con valores de 4.14 %, 2.59 % y 2.44 %, respectivamente. Esta composición a nivel de género

de la microbiota intestinal bacteriana ha sido previamente descrita tanto en adultos mayores como en individuos con HTA^{59,172}.

Por otra parte, la abundancia relativa del género *Bacteroides* presentó una tendencia a la disminución con el incremento de la edad, de 17.44 % en adultos mayores de 60 a 69 años a 8.16 % en adultos mayores de 70 a 79 años. De manera simultánea, el género *Prevotella 9* presentó una tendencia al incremento, de 0.42 % en adultos mayores de 60 a 69 años a 20.36 % en adultos mayores de 70 a 79 años. Sin embargo, dichas tendencias se invirtieron en adultos mayores de 80 años o más, es decir, mientras el género *Bacteroides* incrementó a 17.81 % en este grupo de edad, el género *Prevotella 9* disminuyó a 5.11 % (**Figura 9b**). Aunque estas observaciones necesitan comprobación estadística, previamente se ha reportado que el dominio del género *Bacteroides* en la microbiota intestinal se asocia con el consumo de dietas occidentales, ricas en proteínas y grasas de origen animal, mientras que el dominio del género *Prevotella* se asocia con dietas no occidentales ricas en fibra¹⁷³⁻¹⁷⁶. Esto indica que las tendencias observadas pueden deberse a la dieta de los pacientes, la cual, como se ha mencionado, varía debido a los cambios fisiológicos derivados del proceso de envejecimiento, tales como el funcionamiento del tracto gastrointestinal y la pérdida de dientes.

Si bien la dieta puede ser la causa de las tendencias observadas para los géneros *Bacteroides* y *Prevotella 9*, previamente Wilmanski *et al.* (2021) reportaron que la disminución en la abundancia del género *Bacteroides* es una de las principales características de un envejecimiento saludable, y que en individuos cercanos a edades extremas (≥ 85 años) la retención de una abundancia relativa alta de este género bacteriano se asocia con una supervivencia significativamente menor, así como con un envejecimiento poco saludable. Por tanto, es posible que los adultos mayores de 70 a 79 años incluidos en este estudio estén sobrellevando un envejecimiento saludable, no siendo este el caso de adultos mayores de 80 años o más. Estas observaciones, además, remarcan la necesidad de llevar a cabo estudios longitudinales que permitan identificar de manera precisa cambios en la microbiota humana que favorezcan un envejecimiento saludable.

También se observó la tendencia a la disminución del género *Faecalibacterium*, de 3.90 % en adultos mayores de 60 a 69 años y 5.96 % en adultos mayores de 70 a 79 años, a 3.01 % en adultos mayores de 80 años o más (**Figura 9b**). Esto coincide con el estudio de Salazar *et al.* (2019) en el que se reportó que a diferencia de géneros bacterianos como *Akkermansia* y *Lactobacillus*, la abundancia del género *Faecalibacterium* disminuía con el incremento de la edad, incluso en individuos de más de 80 años de edad, sugiriendo que los individuos longevos presentan un perfil de microbiota intestinal único. Esto nuevamente resalta la importancia de generar estudios enfocados en un envejecimiento saludable.

Además, se observó una abundancia relativa alta del género *Escherichia-Shigella* en adultos mayores de 60 a 69 años, 1.57 %, en comparación con adultos mayores de 70 a 79 años, 0.33 %, y adultos mayores de 80 años o más, 0.37 % (**Figura 9b**). Esto difiere de otros estudios en los que se ha reportado que el género *Escherichia-Shigella*, género bacteriano reconocido como patógeno, incrementa en individuos adultos mayores como resultado de la inmunosenescencia, proceso de disfunción inmunológica que ocurre con la edad y que podría permitir la colonización de patógenos oportunistas^{164,168,179}. Estas discrepancias pueden deberse a variaciones existentes en poblaciones de origen distinto, tales como el estilo de vida y

las condiciones higiénico-sanitarias en que habitan. Por tanto, es importante comprobar estadísticamente las observaciones aquí descritas, así como ampliar los estudios sobre adultos mayores tanto en México como en el mundo.

6.2. Microbiota intestinal bacteriana de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con presión arterial no controlada

6.2.1. Diversidad alfa y beta de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con presión arterial no controlada

Como se mencionó antes, la riqueza y variabilidad de bacterias en un solo ecosistema se conoce como diversidad alfa^{90,116}. En este estudio, la diversidad bacteriana, medida por el índice de homogeneidad de Simpson (**Figura 5c**), fue significativamente menor en hipertensos con PA no controlada ($PAS \geq 140$ mmHg y/o $PAD \geq 90$ mmHg) en comparación con hipertensos con PA controlada ($PAS < 140$ mmHg y $PAD < 90$ mmHg), con índices de 0.15 y 0.18, respectivamente. El decremento en la diversidad alfa en pacientes con HTA o con niveles elevados de PA sin tratamiento farmacológico ha sido reportado en múltiples estudios previamente, y la misma tendencia ha sido encontrada en condiciones de obesidad, hiperinsulinemia y dislipidemia^{147,180}. Además, se ha visto que individuos con menor diversidad bacteriana son más propensos al desarrollo de HTA¹⁸¹. Esto indica que la falta de eficacia del tratamiento farmacológico antihipertensivo conlleva a una microbiota intestinal característica de estados de enfermedad.

Por otra parte, la diversidad beta, la cual identifica diferencias en la composición de distintos ecosistemas o individuos^{90,116}, se midió utilizando cuatro métricas distintas: (a) índice de disimilitud Jaccard, (b) índice de disimilitud Bray-Curtis, (c) UniFrac, y (d) UniFrac ponderado (**Figura 7**). En ningún caso se identificó diferencia estadística significativa en la diversidad beta de hipertensos con PA controlada ($PAS < 140$ mmHg y $PAD < 90$ mmHg) e hipertensos con PA no controlada ($PAS \geq 140$ mmHg y/o $PAD \geq 90$ mmHg). Esto difiere de otros estudios en los que se ha incluido cierta proporción de pacientes con tratamiento farmacológico antihipertensivo para comparar entre grupos de pacientes con HTA y pacientes sanos^{50,57}. A diferencia de esos estudios, la totalidad de los pacientes incluidos en este proyecto se encuentran bajo tratamiento farmacológico antihipertensivo, el cual se ha visto puede inducir cambios en la microbiota intestinal¹⁸². Es decir, la inclusión de pacientes hipertensos con y sin tratamiento farmacológico pudo interferir en la diferencia observada en esos estudios. Por otra parte, en el análisis de diversidad beta del presente estudio no se consideraron variables que pueden influir en la composición de la microbiota intestinal (sexo, edad, IMC, etc.), lo cual se ha visto afecta los métodos estadísticos empleados¹⁸³.

Si bien no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la diversidad beta de hipertensos con PA controlada ($PAS < 140$ mmHg y $PAD < 90$ mmHg) e hipertensos con PA no controlada ($PAS \geq 140$ mmHg y/o $PAD \geq 90$ mmHg), en los PCoA generados a partir del índice de disimilitud

Bray-Curtis y UniFrac ponderado se observó una tendencia de agrupamiento de los grupos de estudio (**Figura 7b y 7d**). Tanto el índice de disimilitud de Bray-Curtis como la métrica UniFrac ponderado consideran el origen filogenético de las especies, por lo que identificar dicho patrón de agrupamiento resalta la importancia de la funcionalidad y complejidad del ecosistema formado por la microbiota intestinal^{122,123,184}. En este sentido, taxones filogenéticamente relacionados pueden tener funciones similares y brindar resiliencia a la microbiota intestinal, pues si la presencia de alguna especie se compromete, las especies con funciones similares pueden sustituir su actividad^{152,181}. Por tanto, considerar variables ambientales, variables propias del paciente (clínicas, genéticas, etc.) y variables de funcionalidad microbiana podría resultar importante para identificar diferencias y patrones definidos de separación con respecto a la composición de la microbiota intestinal bacteriana entre grupos de estudio¹⁸⁵.

6.2.2. Índice *Firmicutes*/*Bacteroidota* de hipertensos con presión arterial controlada versus hipertensos con presión arterial no controlada

Anteriormente se mencionó que los filos *Firmicutes* y *Bacteroidota* fueron los más abundantes de la población de estudio en general, representando más del 90 % de la composición bacteriana de la microbiota intestinal (**Figura 8 y Tabla D1**). También se mencionó que la relación entre estos dos filos, conocida como índice F/B, se ha asociado con el mantenimiento de la homeostasis y que cambios en este índice se han relacionado con diversas patologías^{128,130}.

El índice F/B de hipertensos con PA controlada (PAS < 140 mmHg y PAD < 90 mmHg), 1.23, fue mayor al índice de hipertensos con PA no controlada (PAS ≥ 140 mmHg y/o PAD ≥ 90 mmHg), 1.13, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 10b**). Índices F/B elevados pueden ser indicativos de incrementos en la abundancia relativa del filo *Firmicutes* y/o disminución en la abundancia relativa del filo *Bacteroidota*. Este tipo de cambios no ha sido identificado previamente en individuos con niveles de PA controlada, pero sí se ha reportado en condiciones de obesidad y consumo de dietas ricas en carbohidratos, grasas y alimentos procesados^{57,147,186,187}, lo cual resalta la influencia de la dieta en la composición de la microbiota intestinal y la importancia de incluir este tipo de variables en estudios posteriores.

6.2.3. Abundancia diferencial de taxones de hipertensos con presión arterial controlada versus hipertensos con presión arterial no controlada

Con el fin de identificar posibles biomarcadores que permitieran diferenciar entre hipertensos con PA controlada (PAS < 140 mmHg y PAD < 90 mmHg) e hipertensos con PA no controlada (PAS ≥ 140 mmHg y/o PAD ≥ 90 mmHg), se realizó el análisis de abundancia diferencial de taxones a nivel de filo y género. La comparación entre grupos de estudio mostró abundancia diferencial en tres géneros bacterianos (**Figura 11 y 12**). El género *Tyzzarella* resultó enriquecido en hipertensos con PA controlada (PAS < 140 mmHg y PAD < 90 mmHg), lo cual coincide con lo reportado en estudios previos^{58,65}. Por ejemplo, en el estudio de Li *et al.* (2019) el género *Tyzzarella* permitió la diferenciación de individuos sanos e individuos hipertensos bajo tratamiento farmacológico de hipertensos sin tratamiento previo. De igual manera, en el

estudio de Palmu *et al.* (2020) se observó una asociación negativa entre este género y los niveles de PA. *Tyzzarella* también se ha asociado con inflamación y riesgo cardiovascular^{188,189}.

Por otro lado, los géneros *Marvinbryantia* y grupo *Lachnospiraceae FCS020* resultaron enriquecidos en hipertensos con PA no controlada ($PAS \geq 140$ mmHg y/o $PAD \geq 90$ mmHg). Ambos géneros pertenecen a la familia *Lachnospiraceae* del filo *Firmicutes*. Esta familia es una de las más abundantes en la microbiota intestinal bacteriana, y sus miembros son los principales productores de SCFAs, metabolitos derivados de la fermentación de la fibra dietética: acetato, propionato y butirato, principalmente^{43,190}. Mientras *Marvinbryantia* se caracteriza por la producción de acetato, grupo *Lachnospiraceae FCS020* se caracteriza por la producción de butirato^{44,191}. Se ha visto que los SCFAs juegan un papel importante en la regulación de la PA a través de la interacción con receptores acoplados a proteína G^{48-50,192}: OR51E2 (Olf78 en murinos), expresado en vasos sanguíneos y en la arteriola aferente renal⁴⁹, y Gpr41, expresado en endotelio y ganglios autonómicos del sistema nervioso simpático¹⁹³. Sin embargo, aún existen resultados contradictorios sobre si los SCFA y las bacterias productoras de SCFA se asocian positiva o negativamente con la HTA¹⁹⁴.

En el estudio de Pluznick *et al.* (2013) en modelos murinos, se observó que la administración exógena de propionato en ratones *knockout* para Olf78 tenía un efecto hipotensivo, mientras que la administración del mismo SCFA en ratones *knockout* para Gpr41 tenía el efecto contrario, es decir, un efecto hipertensivo. Además se observó que estos efectos opuestos sobre los niveles de PA podían estar relacionados con la sensibilidad de los receptores a la concentración de los SCFAs. Como consecuencia se concluyó que concentraciones plasmáticas basales de SCFAs (0.1–0.9 mmol) podrían activar al receptor Gpr41 induciendo vasodilatación y la disminución de los niveles de PA, mientras que concentraciones elevadas de SCFAs (> 0.9 mmol) podrían activar al receptor Olf78 incrementando la secreción de renina así como los niveles de PA.

En otro estudio enfocado en el efecto del butirato sobre los niveles de PA, Yang *et al.* (2019) reportaron que a pesar de la administración oral de butirato, modelos murinos con HTA presentaban niveles séricos bajos del SCFA, así como una baja expresión de transportadores de SCFAs a nivel intestinal. En consecuencia, se concluyó que bajos niveles de butirato circulante, debidos a un transporte disfuncional del compuesto a nivel intestinal, podrían contribuir al desarrollo de HTA.

Con base en lo anterior, es posible que en el presente estudio haya variaciones en la expresión de los receptores Olf78 y/o Gpr41, variaciones en la expresión de transportadores de SCFAs a nivel intestinal, o bien, variaciones en la producción de SCFAs por parte de la microbiota intestinal bacteriana de hipertensos con PA no controlada ($PAS \geq 140$ mmHg y/o $PAD \geq 90$ mmHg), lo que podría explicar los niveles elevados de PA a pesar del enriquecimiento de géneros bacterianos productores de SCFAs. Por tanto, es necesario evaluar la expresión de los receptores Olf78 y Gpr41, la expresión de transportadores de SCFAs a nivel intestinal, así como los niveles séricos e incluso fecales de SCFAs, y la capacidad funcional de la microbiota intestinal bacteriana para producir SCFAs a fin de comprobar las observaciones e hipótesis aquí presentadas.

Por otra parte, la significancia estadística en la abundancia diferencial de los tres géneros bacterianos mencionados no se conservó tras el ajuste por FDR, lo cual pudo deberse al tamaño de la población

de estudio, así como de los grupos comparados¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Se ha reportado que para encontrar diferencias estadísticamente significativas en estudios de microbiota humana comparando dos grupos, específicamente en la diversidad alfa, se requiere una población de estudio de al menos 110 individuos, con 55 individuos por grupo¹⁹⁸, mientras que en el presente proyecto el tamaño total de la población de estudio fue de 81 individuos, 61 clasificados como hipertensos con PA controlada y 20 como hipertensos con PA no controlada (**Tablas 4**). Por consiguiente, es necesario incrementar la población de estudio así como el número de individuos considerados como hipertensos con PA no controlada para comprobar los resultados reportados.

6.2.4. Composición funcional de la microbiota intestinal bacteriana de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con presión arterial no controlada

Como se ha mencionado, tanto los taxones bacterianos como las capacidades funcionales que alberga la microbiota intestinal pueden tener influencia o ser influenciados por las características y procesos fisiológicos de los individuos. Con el objetivo de tener un acercamiento a la composición funcional de la microbiota intestinal bacteriana de la población de estudio, se llevó a cabo la predicción de las vías metabólicas involucradas utilizando el *software* PICRUSt2.

Se identificaron un total de 348 vías metabólicas posiblemente presentes en la microbiota intestinal bacteriana de la población de estudio en general. Entre las vías metabólicas con mayor abundancia se encontraron la vía pentosa fosfato y la vía de degradación de almidón, relacionadas con el metabolismo de carbohidratos¹⁹⁹, así como las vías de biosíntesis de L-isoleucina y L-valina, relacionadas con el metabolismo de aminoácidos ramificados²⁰⁰ (**Tabla 6**). Previamente se ha reportado que tanto la vía pentosa fosfato como la vía de degradación de almidón son necesarias para la producción de SCFAs, metabolitos que, como se mencionó antes, modulan la PA a través de receptores acoplados de proteína G: Olfr78 y Gpr41^{194,199,201}. Por otra parte, se ha visto que el consumo de dietas ricas en aminoácidos ramificados, como L-isoleucina y L-valina, se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollar HTA²⁰². Esto sugiere que la composición funcional de la microbiota intestinal bacteriana de la población de estudio puede estar relacionada con el padecimiento de HTA, sin embargo, la comparación entre hipertensos con PA controlada (PAS < 140 mmHg y PAD < 90 mmHg) e hipertensos con PA no controlada (PAS ≥ 140 mmHg y/o PAD ≥ 90 mmHg) no mostró diferencias estadísticas significativas. Estos resultados reiteran la importancia de ampliar el presente estudio, así como de abordar la relación entre microbiota intestinal e HTA desde una perspectiva integral de las ciencias ómicas.

6.3. Limitaciones

Durante el desarrollo de este estudio, se identificaron ciertas limitaciones que deben tenerse en cuenta al interpretar los resultados obtenidos y generalizar las conclusiones alcanzadas. A continuación, se detallan estas limitaciones con el fin de proporcionar una visión completa y transparente del alcance y las implicaciones del estudio:

- **Diseño transversal:** El diseño transversal del estudio, así como la ausencia de un grupo control sin HTA, limitan la capacidad del estudio para establecer relaciones causales entre microbiota intestinal e HTA. Por lo tanto, es necesario interpretar los resultados en el contexto de un estudio observacional.
- **Tamaño de muestra:** El tamaño de muestra fue relativamente pequeño, con un total de 81 pacientes incluidos en el estudio. Esta muestra limitada puede afectar la representatividad de los resultados y la generalización de los hallazgos a la población general. Una muestra más amplia permitiría una visión más representativa y completa de la población de adultos mayores hipertensos.
- **Dimorfismo sexual:** Aunque en los análisis estadísticos se consideró el sexo de los pacientes como una covariable clínica de interés, el dimorfismo sexual y su influencia en la HTA no se abordó de manera explícita en el desarrollo del estudio. En investigaciones futuras, se recomienda explorar más a fondo la influencia del dimorfismo sexual tanto en la HTA como en la microbiota intestinal en adultos mayores.
- **Comorbilidades:** No se excluyeron del estudio pacientes con comorbilidades, además de que éstas no se tomaron en cuenta en los análisis estadísticos. La falta de consideración de estas condiciones limita la comprensión de la interacción entre distintas enfermedades y la microbiota intestinal.
- **Tratamiento farmacológico:** En los análisis estadísticos no se incluyeron variables relacionadas con el tratamiento farmacológico de los pacientes, como el número de antihipertensivos utilizados o la medicación para otras enfermedades concomitantes. Estas variables podrían tener un impacto en la composición de la microbiota intestinal, así como en la bioquímica relacionada con la HTA.
- **Dieta:** No se recopiló información específica sobre la dieta de los pacientes. La dieta desempeña un papel fundamental en la configuración de la microbiota intestinal, así como en el tratamiento de la HTA. La falta de información al respecto limita el entendimiento de cómo los hábitos alimentarios pueden influir en la relación entre microbiota intestinal e HTA.

A pesar de estas limitaciones, es importante destacar que este estudio proporciona información valiosa y relevante sobre la relación entre la microbiota intestinal y la HTA en adultos mayores. Los hallazgos obtenidos contribuyen al conocimiento actual en el campo y resaltan la importancia de investigaciones futuras más completas y exhaustivas que aborden las limitaciones mencionadas y profundicen en la comprensión de esta compleja interacción.

7. Conclusiones y perspectivas

En conclusión, este estudio reportó la primera caracterización de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos, identificando 8 filos y 136 géneros bacterianos distintos. Se observaron tendencias de cambio en la diversidad y composición de la microbiota intestinal de adultos mayores con el incremento de la edad, incluyendo una alta variabilidad inter-individual en los filos *Firmicutes* y *Bacteroidota*, así como la disminución de los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteriota*, y de los géneros *Bacteroides* y *Faecalibacterium*. Estos cambios coinciden con hallazgos previos en poblaciones con dietas ricas en fibra y con un envejecimiento saludable.

Además, se encontraron diferencias en la diversidad y composición de la microbiota intestinal bacteriana entre pacientes con HTA con niveles de PA controlados y no controlados. Los hipertensos con PA no controlada mostraron una disminución significativa de la diversidad alfa, así como un enriquecimiento de los géneros *Marvinbryantia* y grupo *Lachnospiraceae FCS020*, mientras que los hipertensos con PA controlada presentaron un enriquecimiento del género *Tyzzereella*.

No obstante, para fortalecer y ampliar los resultados obtenidos, se requieren estudios futuros con muestras más grandes, así como diseños longitudinales y experimentales que permitan establecer relaciones de causalidad. También se recomienda considerar variables adicionales, como la dieta, las comorbilidades y los tratamientos farmacológicos asociados, para obtener una comprensión más completa de las complejas interacciones entre la microbiota intestinal y la HTA en adultos mayores.

En resumen, este estudio realiza valiosas aportaciones sobre la microbiota intestinal de adultos mayores mexicanos, una población poco representada en la investigación. Dado el envejecimiento demográfico y el aumento en la prevalencia de enfermedades como la HTA, es esencial profundizar en la investigación de estrategias que promuevan un envejecimiento saludable, en las cuales la microbiota intestinal puede jugar un papel importante. Asimismo, se destaca la necesidad de aumentar la representación de México y América Latina en los estudios de microbiota humana, y se insta a investigar posibles biomarcadores microbiológicos que puedan contribuir a un envejecimiento saludable y al control más preciso de enfermedades como la HTA a través del desarrollo de intervenciones clínicas.

Referencias

1. Beard, J. R. *et al.* The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *The Lancet* **387**, 2145-2154 (2016).
2. Ogura, S. y Jakovljevic, M. M. Editorial: Global Population Aging - Health Care, Social and Economic Consequences. *Frontiers in Public Health* **6**, 335 (2018).
3. He, W., Goodkind, D. y Kowal, P. Census Bureau, International Population Reports, P95/16.1, An Aging World. *Government Publishing Office* (2016).
4. Consejo Nacional de la Población (CONAPO). *Colección. Proyecciones de la Población de México y de las Entidades Federativas, 2016-2050* 67 (Ciudad de México, 2019).
5. World Health Organization. *World report on ageing and health* 246 (Luxembourg, 2015).
6. Angel, J. L., Vega, W. y López-Ortega, M. Aging in Mexico: Population Trends and Emerging Issues. *The Gerontologist* **57**, 153-162 (2016).
7. Wong, R. *et al.* Progression of aging in Mexico: the Mexican Health and Aging Study (MHAS) 2012. *Salud Pública de México* **57**, 79-89 (2015).
8. Al Khodor, S., Reichert, B. y Shatat, I. F. The Microbiome and Blood Pressure: Can Microbes Regulate Our Blood Pressure? *Frontiers in Pediatrics* **5**, 138 (2017).
9. Anker, D. *et al.* Screening and treatment of hypertension in older adults: less is more? *Public Health Reviews* **39**, 26 (2018).
10. Dan, X. *et al.* Differential Analysis of Hypertension-Associated Intestinal Microbiota. *International Journal of Medical Sciences* **16**, 872-881 (2019).
11. Zhou, B. *et al.* Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *The Lancet* **389**, 37-55 (2017).
12. Campos-Nonato, I. *et al.* Epidemiología de la hipertensión arterial en adultos mexicanos: diagnóstico, control y tendencias. Ensanut 2020. *Salud Pública de México* **63**, 692-704 (2021).
13. Beevers, G., Lip, G. Y. H. y O'Brien, E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ* **322**, 912-916 (2001).
14. Sonkusare, S. *et al.* Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. *Vascular Pharmacology* **44**, 131-142 (2006).
15. Ma, T. K., Kam, K. K., Yan, B. P. y Lam, Y.-Y. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *British Journal of Pharmacology* **160**, 1273-1292 (2010).

16. Pérez-Díaz, I., Hiriart, M., Olivares-Reyes, J. A. y Robles-Díaz, G. Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2: Características y su papel en el funcionamiento celular. *Revista de Educación Bioquímica* **25**, 55-60 (2006).
17. Hall, J. E. *et al.* Hypertension: physiology and pathophysiology. *Comprehensive Physiology* **2**, 2393-442 (2012).
18. Bellido, C. M., Fernández, E. L., López, J. A., Simón, P. H. y Rodríguez, L. Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio* **V**, 141-160 (2003).
19. Secretaría de Salud. *Diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial en el adulto mayor y situaciones especiales* (ed. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud) 52 (CENETEC, 2010).
20. Marín, R. y Gorostidi, Y. M. *Ventana a otras especialidades. Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial* **4**, 44-48 (2003).
21. Wright, J. M., Musini, V. M. y Gill, R. First-line drugs for hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2018).
22. Mukete, B. N. y Ferdinand, K. C. Polypharmacy in Older Adults With Hypertension: A Comprehensive Review. *The Journal of Clinical Hypertension* **18**, 10-18 (2016).
23. Hugtenburg, J., Vervloet, M., van Dijk, L., Timmers, L. y Elders. Definitions, variants, and causes of nonadherence with medication: a challenge for tailored interventions. *Patient Preference and Adherence* **7**, 675-82 (2013).
24. Carey, R. M. *et al.* Resistant Hypertension: Detection, Evaluation, and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension* **72**, E53-E90 (2018).
25. Masnoon, N., Shakib, S., Kalisch-Ellett, L. y Caughey, G. E. What is polypharmacy? A systematic review of definitions. *BMC Geriatrics* **17**, 230 (2017).
26. Butler, M. G. Genetics of hypertension. Current status. *Le Journal medical libanais. The Lebanese medical journal* **58**, 175-8 (2010).
27. Cooper-DeHoff, R. M. y Johnson, J. A. Hypertension pharmacogenomics: in search of personalized treatment approaches. *Nature Reviews Nephrology* **12**, 110-122 (2016).
28. Egan, B. M. *et al.* Improving Hypertension Control in Primary Care With the Measure Accurately, Act Rapidly, and Partner With Patients Protocol. *Hypertension* **72**, 1320-1327 (2018).
29. Noubiap, J. J. *et al.* Global prevalence of resistant hypertension: a meta-analysis of data from 3.2 million patients. *Heart* **105**, 98-105 (2019).
30. Barko, P., McMichael, M., Swanson, K. y Williams, D. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **32**, 9-25 (2018).
31. Knight, R. *et al.* The Microbiome and Human Biology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **18**, 65-86 (2017).

32. Katsi, V. *et al.* GUT Microbiome-GUT Dysbiosis-Arterial Hypertension: New Horizons. *Current Hypertension Reviews* **15**, 40-46 (2019).
33. Fava, F., Rizzetto, L. y Tuohy, K. M. Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1-12 (2018).
34. Odamaki, T. *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology* **16**, 90 (2016).
35. Vemuri, R. *et al.* Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. *BioMed Research International* **2018**, 4178607 (2018).
36. O'Toole, P. W. y Claesson, M. J. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal* **20**, 281-291 (2010).
37. Jeffery, I. B., Lynch, D. B. y O'Toole, P. W. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *The ISME Journal* **10**, 170-182 (2016).
38. Yu, X. *et al.* Analysis of the intestinal microbial community structure of healthy and long-living elderly residents in Gaotian Village of Liuyang City. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**, 9085-9095 (2015).
39. Biagi, E. *et al.* The gut microbiota of centenarians: Signatures of longevity in the gut microbiota profile. *Mechanisms of Ageing and Development* **165**, 180-184 (2017).
40. Pevsner-Fischer, M., Blacher, E., Tatirovsky, E., Ben-Dov, I. Z. y Elinav, E. The gut microbiome and hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **26**, 1-8 (2017).
41. Li, J. *et al.* Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome* **5**, 14 (2017).
42. Honour, J. The possible involvement of intestinal bacteria in steroidal hypertension. *Endocrinology* **110**, 285-287 (1982).
43. Ma, J. y Li, H. The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension. *Frontiers in Pharmacology* **9**, 1082 (2018).
44. Yang, T. *et al.* Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension. *Hypertension* **65**, 1331-1340 (2015).
45. Adnan, S. *et al.* Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. *Physiological Genomics* **49**, 96-104 (2017).
46. Kang, Y. y Cai, Y. Gut microbiota and hypertension: From pathogenesis to new therapeutic strategies. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **42**, 110-117 (2018).
47. Mell, B. *et al.* Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiological Genomics* **47**, 187-197 (2015).
48. Pluznick, J. L. *et al.* Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 4410-4415 (2013).

49. Natarajan, N. *et al.* Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41. *Physiological Genomics* **48**, 826-834 (2016).
50. Yan, Q. *et al.* Alterations of the Gut Microbiome in Hypertension. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, 1-9 (2017).
51. Ge, X. *et al.* The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* **11**, 66-76 (2020).
52. Nichols, R. G., Peters, J. M. y Patterson, A. D. Interplay Between the Host, the Human Microbiome, and Drug Metabolism. *Human Genomics* **13**, 27 (2019).
53. Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R. y Goodman, A. L. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature* **570**, 462-467 (2019).
54. Kang, G. *et al.* Predictive value of gut microbiota in long-term blood pressure control: a cross-sectional study. *European Journal of Medical Research* **28**, 115 (2023).
55. Wang, Y. *et al.* Gut Microbiota and Host Plasma Metabolites in Association with Blood Pressure in Chinese Adults. *Hypertension* **77**, 706-717 (2 2021).
56. Verhaar, B. J. H. *et al.* Associations between gut microbiota, faecal short-chain fatty acids, and blood pressure across ethnic groups: the HELIUS study. *European Heart Journal* **41**, 4259-4267 (44 2020).
57. Silveira-Nunes, G. *et al.* Hypertension Is Associated With Intestinal Microbiota Dysbiosis and Inflammation in a Brazilian Population. *Frontiers in Pharmacology* **11**, 258 (2020).
58. Palmu, J. *et al.* Association Between the Gut Microbiota and Blood Pressure in a Population Cohort of 6953 Individuals. *Journal of the American Heart Association* **9** (2020).
59. Calderón-Pérez, L. *et al.* Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study. *Scientific Reports* **10**, 6436 (2020).
60. Changes in the Gut Microbiota are Associated with Hypertension, Hyperlipidemia, and Type 2 Diabetes Mellitus in Japanese Subjects. *Nutrients* **12**, 1-13 (10 2020).
61. Chang, Y. *et al.* Short-chain fatty acids accompanying changes in the gut microbiome contribute to the development of hypertension in patients with preeclampsia. *Clinical Science* **134**, 289-302 (2 2020).
62. Kim, S. *et al.* Altered gut microbiome profile in patients with pulmonary arterial hypertension. *Hypertension*, 1063-1071 (2020).
63. Sun, S. *et al.* Gut Microbiota Composition and Blood Pressure. The CARDIA study. *Hypertension* **73**, 998-1006 (2019).
64. Mushtaq, N. *et al.* Molecular characterization of alterations in the intestinal microbiota of patients with grade 3 hypertension. *International Journal of Molecular Medicine* **44**, 513-522 (2 2019).

65. Li, H. *et al.* Characteristics of Gut Microbiota in Patients with Hypertension and/or Hyperlipidemia: A Cross-Sectional Study on Rural Residents in Xinxiang County, Henan Province. *Microorganisms* **7** (2019).
66. Huart, J. *et al.* Gut Microbiota and Fecal Levels of Short-Chain Fatty Acids Differ Upon 24-Hour Blood Pressure Levels in Men. *Hypertension* **74**, 1005-1013 (4 2019).
67. Zuo, K. *et al.* Dysbiotic gut microbes may contribute to hypertension by limiting vitamin D production (2019).
68. Kim, S. *et al.* Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. *Clinical Science* **132**, 701-718 (6 2018).
69. Han, M., Yang, P., Zhong, C. y Ning, K. The Human Gut Virome in Hypertension. *Frontiers in Microbiology* **9** (2018).
70. Tuteja, S. y Ferguson, J. F. Gut Microbiome and Response to Cardiovascular Drugs. *Circulation: Genomic and Precision Medicine* **12**, 421-429 (2019).
71. Choi, M. S., Yu, J. S., Yoo, H. H. y Kim, D. H. The role of gut microbiota in the pharmacokinetics of antihypertensive drugs. *Pharmacological Research* **130**, 164-171 (2018).
72. Wilson, I. D. y Nicholson, J. K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Translational Research* **179**, 204-222 (2017).
73. Choi, Y. *et al.* Structural Insights into the FtsQ/FtsB/FtsL Complex, a Key Component of the Divisome. *Scientific Reports* **8**, 1-12 (2018).
74. Sarangi, A. N., Goel, A. y Aggarwal, R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* **9**, 62-73 (2019).
75. Breitwieser, F. P., Lu, J. y Salzberg, S. L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics* **20**, 1125-1136 (2019).
76. Del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S. y Ferrer-Martínez, M. Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **36**, 241-245 (2018).
77. Jo, J.-H., Kennedy, E. A. y Kong, H. H. Research Techniques Made Simple: Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing in Cutaneous Research. *Journal of Investigative Dermatology* **136**, e23-e27 (2016).
78. Moreno-Tamayo, K., Ramírez-García, E. y Sánchez-García, S. Trastornos del sueño en personas mayores . ¿Cómo duermen las personas mayores de la Ciudad de México? **59** (2021).
79. Ramírez-García, E., Moreno-Tamayo, K., Briseño-Fabian, S. C. y Sánchez-García, S. Sarcopenia and Sarcopenic Obesity in Older Community-Dwelling Adults With Favorable Health Conditions. *J Aging Res Clin Practice* **6**, 143-148 (2017).

80. Doubova, S. V., Sánchez-García, S., Infante-Castañeda, C. y Pérez-Cuevas, R. Factors associated with regular physical exercise and consumption of fruits and vegetables among Mexican older adults. *BMC Public Health* **16**, 952 (2016).
81. Sánchez-García, S. *et al.* Frailty in community-dwelling older adults: association with adverse outcomes. *Clinical Interventions in Aging* **12**, 1003-1011 (2017).
82. Goodrich, J. K. *et al.* Conducting a Microbiome Study. *Cell* **158**, 250-262 (2014).
83. James, P. A. *et al.* 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults. Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* **311**, 507 (5 2014).
84. Woong Whon, T. *et al.* The effects of sequencing platforms on phylogenetic resolution in 16 S rRNA gene profiling of human feces. *Scientific Data* **5**, 180068 (2018).
85. Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. y Schloss, P. D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 5112-5120 (2013).
86. Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41**, e1 (2013).
87. Chen, Z. *et al.* Impact of Preservation Method and 16S rRNA Hypervariable Region on Gut Microbiota Profiling. *mSystems* **4**, 00271-18 (2019).
88. Rodríguez-Hernández, J. I. *Ensamblaje y caracterización genómica de una bacteria celulolítica aislada del rumen bovino* Tesis doct. (Universidad Argentina de la Empresa, 2017), 138.
89. Rodríguez-Santiago, B. y Armengol, L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal* **23**, 56-66 (2012).
90. Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D. y Eiros, J. M. Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología* **52**, 150-161 (2020).
91. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* **37**, 852-857 (2019).
92. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Austria. URL: <http://www.r-project.org> (2022).
93. Muzzey, D. Understanding the basics of NGS in the context of NIPT en *Noninvasive Prenatal Testing (NIPT): Applied Genomics in Prenatal Screening and Diagnosis* 7-24 (Elsevier Inc., 2018).
94. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10 (2011).
95. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**, 581-583 (2016).

96. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**, D590-D596 (2013).
97. Yilmaz, P. *et al.* The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* **42**, D643-D648 (2014).
98. Glöckner, F. O. *et al.* 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology* **261**, 169-176 (2017).
99. Robeson, M. S. *et al.* RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLOS Computational Biology* **17**, e1009581 (2021).
100. Bokulich, N. A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2’s q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **6**, 1-17 (2018).
101. Pedregosa FABIANPEDREGOSA, F. *et al.* Scikit-learn: Machine Learning in Python Gaël Varoquaux Bertrand Thirion Vincent Dubourg Alexandre Passos PEDREGOSA, VAROQUAUX, GRAMFORT ET AL. Matthieu Perrot. *Journal of Machine Learning Research* **12**, 2825-2830 (2011).
102. Lun, A. T., McCarthy, D. J. y Marioni, J. C. A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Research* **5** (2016).
103. Minich, J. J. *et al.* High-Throughput Miniaturized 16S rRNA Amplicon Library Preparation Reduces Costs while Preserving Microbiome Integrity. *mSystems* **3** (2018).
104. Palmeira, O. *et al.* Longitudinal 16S rRNA gut microbiota data of infant triplets show partial susceptibility to host genetics. *iScience* **25**, 103861 (2022).
105. Peterson, D. *et al.* Comparative analysis of 16S rRNA gene and metagenome sequencing in pediatric gut microbiomes. *bioRxiv*, 2021.02.20.432118 (2021).
106. Almonacid, D. E. *et al.* 16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome. *PLOS ONE* **12**, e0176555 (2017).
107. Caporaso, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 4516-4522 (2011).
108. Yarza, P. *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 635-645 (2014).
109. Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J., Emelko, M. B. y Müller, K. M. *To rarefy or not to rarefy: Enhancing microbial community analysis through next-generation sequencing* 2020.
110. Weiss, S. J. *et al.* Effects of library size variance, sparsity, and compositionality on the analysis of microbiome data. *PeerJ PrePrints* **3**, e1157v1 (2015).
111. Weiss, S. *et al.* Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* **5**, 27 (2017).

112. Willis, A. D. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology* **10**, 2407 (2019).
113. Sanders, H. L. Marine Benthic Diversity: A Comparative Study. *The American Naturalist* **102**, 243-282 (1968).
114. Kleine Bardenhorst, S., Vital, M., Karch, A. y RübSamen, N. Richness estimation in microbiome data obtained from denoising pipelines. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **20**, 508-520 (2022).
115. Andersen, K., Kirkegaard, R., Karst, S. y Albertsen, M. ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *bioRxiv* (2018).
116. Calderón-Patrón, J. M., Moreno, C. E. y Zuria, I. La diversidad beta: medio siglo de avances. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **83**, 879-891 (2012).
117. Finotello, F., Mastrorilli, E. y Camillo, B. D. Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Briefings in Bioinformatics* **19**, 679-692 (2018).
118. Yin, L. *et al.* Association Between Gut Bacterial Diversity and Mortality in Septic Shock Patients: A Cohort Study. *Med Sci Monit* **25**, 7376-7382 (2019).
119. Fedor, P. y Zvaríková, M. Biodiversity Indices en *Encyclopedia of Ecology* 337-346 (Elsevier, 2019).
120. Chao, A. *et al.* Rarefaction and extrapolation of phylogenetic diversity. *Methods in Ecology and Evolution* **6** (ed. O'Hara, R. B.) 380-388 (2015).
121. Jaccard, P. Contribution au problème de l'immigration post-glaciaire de la flore alpine. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **36**, 87-130 (1900).
122. Hao, M. *et al.* Assessing biological dissimilarities between five forest communities. *Forest Ecosystems* **6**, 30 (2019).
123. Bray, J. y Curtis, J. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* **27**, 325-349 (1957).
124. Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J. y Knight, R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal* **5**, 169-172 (2011).
125. Wong, R. G., Wu, J. R. y Gloor, G. B. Expanding the UniFrac Toolbox. *PLOS ONE* **11** (ed. Moreno-Hagelsieb, G.) e0161196 (2016).
126. Paradis, E. y Schliep, K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* **35**, 526-528 (2019).
127. Oksanen, J. *et al.* vegan: Community Ecology Package, 6-2 (2022).
128. Magne, F. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* **12**, 1474 (2020).
129. Di Pierro, F. Gut Microbiota Parameters Potentially Useful in Clinical Perspective. *Microorganisms* **9**, 2402 (2021).

130. Stojanov, S., Berlec, A. y Štrukelj, B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms* **8**, 1715 (2020).
131. Lin, H. y Peddada, S. D. *Analysis of microbial compositions: a review of normalization and differential abundance analysis* 2020.
132. Kleine Bardenhorst, S. *et al.* Data Analysis Strategies for Microbiome Studies in Human Populations—a Systematic Review of Current Practice. *mSystems* **6** (2021).
133. Xia, Y. *Correlation and association analyses in microbiome study integrating multiomics in health and disease* 1.^a ed., 309-491 (Elsevier Inc., 2020).
134. Salinas-Rodríguez, A., Manrique-Espinoza, B. y Sosa-Rubí, S. G. Análisis estadístico para datos de conteo: Aplicaciones para el uso de los servicios de salud. *Salud Publica de Mexico* **51**, 397-406 (2009).
135. Luz Calle, M. Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics and Informatics* **17** (2019).
136. Wallen, Z. D. Comparison study of differential abundance testing methods using two large Parkinson disease gut microbiome datasets derived from 16S amplicon sequencing. *BMC Bioinformatics* **22**, 1-29 (2021).
137. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology* **12**, R60 (2011).
138. Brooks, M. E. *et al.* glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal* **9**, 378-400 (2017).
139. Benjamini, Y. y Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57** (1995).
140. Douglas, G. M. *et al.* PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology* **38**, 685-688 (2020).
141. Caspi, R. *et al.* The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research* **42**, D459-D471 (2014).
142. Hanshew, A. S., Mason, C. J., Raffa, K. F. y Currie, C. R. Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* **95**, 149-155 (2013).
143. Oliveros, E. *et al.* Hypertension in older adults: Assessment, management, and challenges. *Clinical cardiology* **43**, 99-107 (2020).
144. Gurven, M., Blackwell, A. D., Rodríguez, D. E., Stieglitz, J. y Kaplan, H. Does blood pressure inevitably rise with age?: Longitudinal evidence among forager-horticulturalists. *Hypertension* **60**, 25-33 (2012).
145. Sun, Z. Aging, arterial stiffness, and hypertension. *Hypertension* **65**, 252-256 (2015).

146. Alsarah, A., Alsara, O. y Bachauwa, G. Hypertension Management in the Elderly: What is the Optimal Target Blood Pressure? *Heart Views : The Official Journal of the Gulf Heart Association* **20**, 11 (2019).
147. Avery, E. G. *et al.* The Gut Microbiome in Hypertension: Recent Advances and Future Perspectives. *Circulation Research* **128**, 934-950 (2021).
148. Yatsunenkov, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222-227 (2012).
149. Salazar, N., Valdés-Varela, L., González, S., Gueimonde, M. y de los Reyes-Gavilán, C. G. Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes* **8**, 82 (2017).
150. Badal, V. D. *et al.* The Gut Microbiome, Aging, and Longevity: A Systematic Review. *Nutrients* **12**, 3759 (2020).
151. Derrien, M., Alvarez, A. S. y de Vos, W. M. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* **27**, 997-1010 (2019).
152. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. y Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220-230 (2012).
153. Singh, S. P., Bansal, S. y Pandey, A. Basics and Roots of Synthetic Biology en *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 3-22 (Elsevier, 2019).
154. Wu, L. *et al.* A Cross-Sectional Study of Compositional and Functional Profiles of Gut Microbiota in Sardinian Centenarians. *mSystems* **4** (2019).
155. Kim, B.-S. *et al.* Comparison of the Gut Microbiota of Centenarians in Longevity Villages of South Korea with Those of Other Age Groups. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **29**, 429-440 (2019).
156. Angelakis, E. *et al.* Comparison of the gut microbiota of obese individuals from different geographic origins. *New Microbes and New Infections* **27**, 40-47 (2019).
157. Schnorr, S. L. *et al.* Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications* **5**, 3654 (2014).
158. Gomez, A. *et al.* Gut Microbiome of Coexisting BaAka Pygmies and Bantu Reflects Gradients of Traditional Subsistence Patterns. *Cell Reports* **14**, 2142-2153 (2016).
159. Gupta, V. K., Paul, S. y Dutta, C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1162 (2017).
160. Abdill, R. J., Adamowicz, E. M. y Blekhman, R. Public human microbiome data are dominated by highly developed countries. *PLoS Biology* **20** (ed. Cadwell, K.) e3001536 (2022).
161. Gomaa, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **113**, 2019-2040 (2020).

162. Claesson, M. J. *et al.* Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 4586-4591 (2011).
163. Mariat, D. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology* **9**, 123 (2009).
164. La-Ongkham, O., Nakphaichit, M., Nakayama, J., Keawsompong, S. y Nitisinprasert, S. Age-related changes in the gut microbiota and the core gut microbiome of healthy Thai humans. **1**, 276 (0123).
165. Vaiserman, A. *et al.* Differences in the gut Firmicutes to Bacteroidetes ratio across age groups in healthy Ukrainian population. *BMC Microbiology* **20** (2020).
166. Statovci, D., Aguilera, M., Macsharry, J. y Melgar, S. The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front. Immunol* **8**, 838 (2017).
167. Shen, X. *et al.* Possible correlation between gut microbiota and immunity among healthy middle-aged and elderly people in southwest China. *Gut Pathogens* **10**, 1-9 (2018).
168. Victoria, M. *et al.* Gut microbiota alterations in critically ill older patients: a multicenter study. *BMC geriatrics* **22** (2022).
169. Hjorth, M. F. *et al.* Prevotella-to-Bacteroides ratio predicts body weight and fat loss success on 24-week diets varying in macronutrient composition and dietary fiber: results from a post-hoc analysis. *International Journal of Obesity* **43**, 149-157 (2019).
170. Rinninella, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**, 14 (2019).
171. Prasoodanan P. K., V. *et al.* Western and non-western gut microbiomes reveal new roles of Prevotella in carbohydrate metabolism and mouth–gut axis. *npj Biofilms and Microbiomes* **7**, 77 (2021).
172. Magzal, F. *et al.* Increased physical activity improves gut microbiota composition and reduces short-chain fatty acid concentrations in older adults with insomnia. *Scientific Reports* | **12**, 2265 (0123).
173. Wu, G. D. *et al.* Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **334**, 105-108 (2011).
174. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180 (2011).
175. Chen, T. *et al.* Fiber-utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides-dominated gut microbiota. *Scientific reports* **7** (2017).
176. Vangay, P. *et al.* US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell* **175**, 962-972 (2018).
177. Wilmanski, T. *et al.* Gut microbiome pattern reflects healthy ageing and predicts survival in humans. *Nature Metabolism* **3**, 274-286 (2021).

178. Salazar, N. *et al.* Age-Associated Changes in Gut Microbiota and Dietary Components Related with the Immune System in Adulthood and Old Age: A Cross-Sectional Study.
179. Sepp, E. *et al.* Comparative Analysis of Gut Microbiota in Centenarians and Young People: Impact of Eating Habits and Childhood Living Environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12** (2022).
180. Guo, Y., Li, X., Wang, Z. y Yu, B. Gut Microbiota Dysbiosis in Human Hypertension: A Systematic Review of Observational Studies. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **0**, 414 (2021).
181. Yano, Y. y Niiranen, T. J. Gut Microbiome over a Lifetime and the Association with Hypertension. *Current Hypertension Reports* **23**, 15 (2021).
182. Song, S. C. *et al.* Beneficial effects of a probiotic blend on gastrointestinal side effects induced by leflunomide and amlodipine in a rat model. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0231> **8**, 801-808 (2017).
183. Tang, Z. Z., Chen, G. y Alekseyenko, A. V. PERMANOVA-S: association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. *Bioinformatics* **32**, 2618 (2016).
184. Reese, A. T. y Dunn, R. R. Drivers of Microbiome Biodiversity: A Review of General Rules, Feces, and Ignorance. *mBio* **9**, 01294-18 (2018).
185. Tasnim, N., Abulizi, N., Pither, J., Hart, M. M. y Gibson, D. L. Linking the gut microbial ecosystem with the environment: Does gut health depend on where we live? *Frontiers in Microbiology* **8**, 1935 (2017).
186. Van der Merwe, M. *et al.* Intestinal Bacteroides Levels are Reduced by a Fruit and Vegetable Juice Concentrate. *Current Developments in Nutrition* **4**, 1596-1596 (2020).
187. Yañez, C. M. *et al.* Prevalence of Blastocystis and its association with Firmicutes/Bacteroidetes ratio in clinically healthy and metabolically ill subjects. *BMC Microbiology* **21**, 1-11 (2021).
188. Huang, W.-C. *et al.* Endurance exercise ameliorates Western diet-induced atherosclerosis through modulation of microbiota and its metabolites (0123).
189. Ascher, S., Reinhardt, C., Ascher, S. y Reinhardt, C. The gut microbiota: An emerging risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. *European Journal of Immunology* **48**, 564-575 (2018).
190. Vacca, M. *et al.* The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* **8**, 573 (2020).
191. Mayerhofer, C. C. *et al.* Low fibre intake is associated with gut microbiota alterations in chronic heart failure. *ESC Heart Failure* **7**, 456-466 (2020).
192. Pluznick, J. L. Gut microbiota in renal physiology: focus on short-chain fatty acids and their receptors. *Kidney International* **90**, 1191-1198 (2016).

193. Kimura, I. *et al.* Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 8030-8035 (2011).
194. Poll, B. G., Cheema, M. U. y Pluznick, J. L. Gut microbial metabolites and blood pressure regulation: Focus on SCFAs and TMAO. *Physiology* **35**, 275-284 (2020).
195. Yang, T. *et al.* Impaired butyrate absorption in the proximal colon, low serum butyrate and diminished central effects of butyrate on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica* **226**, e13256 (2019).
196. Albers, C. The problem with unadjusted multiple and sequential statistical testing.
197. Faber, J. y Fonseca, L. M. How sample size influences research outcomes. *Dental Press Journal of Orthodontics* **19**, 27 (2014).
198. Casals-Pascual, C. *et al.* Microbial Diversity in Clinical Microbiome Studies: Sample Size and Statistical Power Considerations (2020).
199. Stincone, A. *et al.* The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* **90**, 927-963 (2015).
200. Holeček, M. Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition and Metabolism* **15**, 1-12 (2018).
201. Deleu, S., Machiels, K., Raes, J., Verbeke, K. y Vermeire, S. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? *EBioMedicine* **66**, 103293 (2021).
202. Teymoori, F., Asghari, G., Mirmiran, P. y Azizi, F. Dietary amino acids and incidence of hypertension: A principle component analysis approach. *Scientific Reports* **7** (2017).

Apéndices

A. Dictamen de aprobación



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Ciudad de México, a 27 de agosto de 2018.

Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica

No. de registro: 20/2018/I

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

DICTAMEN APROBATORIO

Al proyecto titulado:

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

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

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

Atentamente

Dra. Lorena Orozco
Presidenta del Comité de Investigación

Figura A1: Dictamen de aprobación del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

B. Toma de muestra de materia fecal

RECOMENDACIONES

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

**CUALQUIER DUDA COMUNÍCATSE
CON NOSOTROS:**



56-27-69-00 Extensión 21213



53-50-19-00 Extensión 1212



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO

**Toma de Muestra
Fecal**

Figura B2: Instructivo de toma de muestra de materia fecal para los pacientes. Anverso. Elaborado en colaboración INMEGEN - CMN SXXI. INMEGEN: Instituto Nacional de Medicina Genómica. CMN SXXI: Centro Médico Nacional Siglo XXI

1. KIT

SAÚDE
Nombre: _____
Paciente de Servicio de Salud

Tarjeta de Identificación

Frasco para Muestras Bolsa de plástico Guante de Plástico

2. LEVANTE Y FORRE EL ASIENTO con la bolsa blanca

3. Hacer del baño, LAS HECES NO DEBEN DE TENER CONTACTO

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

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

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

Llenar los datos de la etiqueta.

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

Figura B3: Instructivo de toma de muestra de materia fecal para los pacientes. Reverso. Elaborado en colaboración INMEGEN - CMN SXXI. INMEGEN: Instituto Nacional de Medicina Genómica. CMN SXXI: Centro Médico Nacional Siglo XXI

C. Diversidad beta: Gráficos de sedimentación

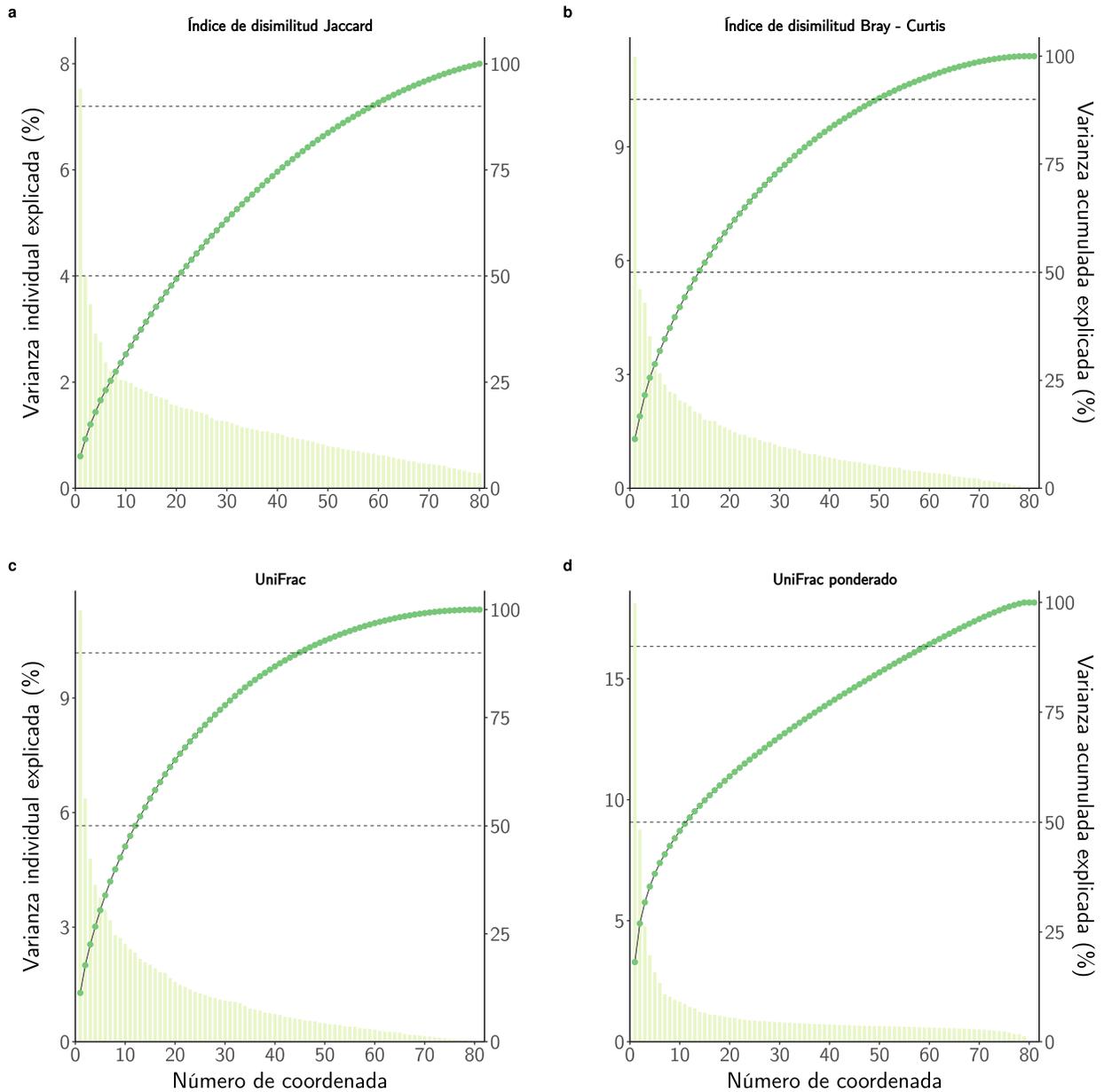


Figura C4: Gráficos de sedimentación de PCoA para diversidad beta. (a) Índice de disimilitud Jaccard; (b) Índice de disimilitud Bray - Curtis; (c) UniFrac; (d) UniFrac ponderado. Con líneas punteadas se muestra el número de PCos necesarias para explicar 50% y 90% de la varianza total de los datos. Todas las matrices de distancia para los análisis de diversidad beta fueron calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. ASV: *Amplicon Sequence Variant*; PCo: Coordenada principal, PCoA: Análisis de coordenadas principales.

D. Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos

Tabla D1: Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial: Filo

Reino	Filo	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
		Media \pm DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	50.30 \pm 13.34	50.61	19.10 – 82.74	50.30
Bacteria	Bacteroidota	42.77 \pm 14.67	42.10	6.02 – 74.03	93.07
Bacteria	Proteobacteria	4.63 \pm 6.28	2.18	0 – 34.30	97.70
Bacteria	Actinobacteriota	0.98 \pm 2.49	0.10	0 – 13.39	98.68
Bacteria	Verrucomicrobiota	0.82 \pm 2.60	0	0 – 18.33	99.50
Bacteria	Fusobacteriota	0.25 \pm 1.85	0	0 – 16.53	99.75
Bacteria	Desulfobacterota	0.21 \pm 0.36	0.04	0 – 1.72	99.96
Bacteria	Cyanobacteria	0.06 \pm 0.35	0	0 – 3.13	100.00

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Tabla D2: Composición de la microbiota intestinal bacteriana de adultos mayores mexicanos con hipertensión arterial: Género

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)	
						Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo		
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	19.42 ± 16.43	13.36	1.20 – 52.50	19.42	
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 9	15.04 ± 19.21	4.97	0 – 61.58	34.46	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	5.04 ± 3.78	4.14	0 – 16.45	39.50	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-002	4.28 ± 4.74	2.44	0 – 26.17	43.78	
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes	3.49 ± 3.51	2.59	0 – 18.12	47.27	
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia-Shigella	3.27 ± 5.83	0.74	0 – 34.21	50.54	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Agathobacter	3.22 ± 3.33	2.04	0 – 17.14	53.76	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Grupo Eubacterium coprostanoligenes	Grupo Eubacterium coprostanoligenes	2.64 ± 2.82	1.69	0 – 12.96	56.40	
87	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Subdoligranulum	2.39 ± 2.00	1.78	0 – 8.35	58.79
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Roseburia	1.82 ± 2.45	1.00	0 – 14.33	60.61	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	Clostridia UCG-014	Clostridia UCG-014	1.61 ± 2.72	0.35	0 – 13.82	62.22	
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Acidaminococcales	Acidaminococcaceae	Phascolarctobacterium	1.54 ± 2.03	0.54	0 – 7.77	63.76	
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales-Selenomonadales	Veillonellaceae	Dialister	1.47 ± 3.17	0	0 – 15.66	65.23	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	CAG-352	1.34 ± 2.84	0	0 – 15.25	66.57	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Eubacterium eligens	1.34 ± 1.55	0.84	0 – 6.88	67.91	

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media \pm DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Lachnospiraceae NK4A136	1.22 \pm 1.51	0.77	0 – 8.87	69.13
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Paraprevotella	1.12 \pm 2.39	0	0 – 12.17	70.25
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Ruminococcus torques	1.04 \pm 1.46	0.47	0 – 9.02	71.29
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	1.02 \pm 2.86	0.17	0 – 17.23	72.31
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia	0.99 \pm 0.88	0.69	0.07 – 4.38	73.30
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Christensenellales	Christensenellaceae	Grupo Christensenellaceae R-7	0.98 \pm 1.25	0.36	0 – 5.52	74.28
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Tannerellaceae	Parabacteroides	0.95 \pm 0.92	0.76	0 – 6.79	75.23
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Butyrivibrio	0.85 \pm 1.74	0	0 – 8.36	76.08
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	0.83 \pm 0.89	0.50	0 – 4.02	76.91
Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	Akkermansia	0.81 \pm 2.60	0	0 – 18.33	77.72
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae	Barnesiella	0.79 \pm 1.12	0.22	0 – 4.31	78.51
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Coprococcus	0.77 \pm 1.15	0.35	0 – 6.93	79.28
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Dorea	0.74 \pm 0.72	0.53	0 – 4.46	80.02
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-005	0.74 \pm 1.15	0.38	0 – 7.03	80.76
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Eubacterium ruminantium	0.66 \pm 1.29	0	0 – 6.44	81.42
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospira	0.66 \pm 0.84	0.35	0 – 3.58	82.08

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales- Selenomonadales	Veillonellaceae	Veillonella	0.65 ± 1.48	0.07	0 – 10.05	82.73
Bacteria	Actinobacterio- ta	Actinobacteria	Bifidobacteria- les	Bifidobacteria- ceae	Bifidobacterium	0.63 ± 2.10	0	0 – 12.89	83.36
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Grupo NK4A214	0.62 ± 0.67	0.43	0 – 3.87	83.98
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotricha- les	Erysipelato- clostridiaceae	Erysipelotrichaceae UCG-003	0.61 ± 1.20	0.19	0 – 7.20	84.59
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-003	0.56 ± 0.50	0.46	0 – 2.31	85.15
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Fusicatenibacter	0.52 ± 0.56	0.35	0 – 3.03	85.67
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Grupo Eubacterium siraenum	0.43 ± 0.82	0.09	0 – 4.92	86.10
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	0.41 ± 1.95	0	0 – 16.19	86.51
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	UCG-010	UCG-010	0.40 ± 0.59	0.15	0 – 2.82	86.91
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculaceae	0.37 ± 1.12	0	0 – 6.17	87.28
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	No cultivado	0.36 ± 0.53	0.11	0 – 3.12	87.64
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Lachnospiraceae ND3007	0.32 ± 0.38	0.20	0 – 2.12	87.96
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteo- bacteria	Burkholderiales	Sutterellaceae	Sutterella	0.32 ± 0.66	0	0 – 4.28	88.28
Bacteria	Actinobacterio- ta	Coriobacteriia	Coriobacteria- les	Coriobacteriaceae	Collinsella	0.30 ± 1.11	0	0 – 8.32	88.58
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Incertae Sedis	0.30 ± 0.42	0.14	0 – 1.87	88.88
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium sensu stricto 1	0.29 ± 0.87	0.03	0 – 6.91	89.17

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Sutterellaceae	Parasutterella	0.26 ± 0.71	0	0 – 4.93	89.43
Bacteria	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	0.25 ± 1.85	0	0 – 16.53	89.68
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Grupo	0.25 ± 1.32	0	0 – 9.19	89.93
				Rikenellaceae					
					RC9 intestinal				
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	Odoribacter	0.24 ± 0.24	0.20	0 – 1.10	90.17
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Alloprevotella	0.24 ± 0.79	0	0 – 4.48	90.41
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo	0.23 ± 1.27	0	0 – 11.15	90.64
					Ruminococcus				
					gnavus				
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium	0.22 ± 0.43	0.08	0 – 2.20	90.86
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Monoglobales	Monoglobaceae	Monoglobus	0.21 ± 0.24	0.17	0 – 1.37	91.07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Eubacterium	0.21 ± 0.73	0.03	0 – 5.48	91.28
					ventriosum				
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Holdemanella	0.21 ± 0.47	0	0 – 2.11	91.49
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	0.20 ± 0.28	0.10	0 – 1.60	91.69
					UCG-010				
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	No cultivado	No cultivado	0.20 ± 0.67	0	0 – 3.83	91.89
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 7	0.18 ± 0.64	0	0 – 3.80	92.07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	0.17 ± 0.28	0.06	0 – 1.25	92.24
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UBA1819	0.16 ± 0.34	0.04	0 – 2.21	92.40
Bacteria	Desulfobacterota	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	0.15 ± 0.35	0	0 – 1.66	92.55

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Eubacterium xylanophilum	0.15 ± 0.20	0.05	0 – 0.82	92.70
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-001	0.14 ± 0.29	0	0 – 2.09	92.84
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Bacteroides pectinophilus	0.13 ± 0.40	0	0 – 2.80	92.97
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Oscillibacter	0.13 ± 0.19	0.08	0 – 1.06	93.10
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Butyricoccaceae	Butyricoccus	0.13 ± 0.17	0.07	0 – 0.85	93.23
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	CAG-56	0.12 ± 0.19	0.04	0 – 1.33	93.35
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Eubacterium hallii	0.12 ± 0.17	0.09	0 – 1.01	93.47
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo Ruminococcus gauvreauii	0.10 ± 0.17	0.02	0 – 0.85	93.57
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	No cultivado	0.09 ± 0.38	0	0 – 2.52	93.66
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelatoclostridiaceae	Catenibacterium	0.09 ± 0.28	0	0 – 1.68	93.75
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Fournierella	0.09 ± 0.19	0	0 – 1.04	93.84
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	RF39	RF39	RF39	0.09 ± 0.35	0	0 – 3.00	93.93
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Flavonifractor	0.08 ± 0.21	0	0 – 1.07	94.01
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Colidextribacter	0.08 ± 0.13	0	0 – 0.69	94.09
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	Butyricimonas	0.08 ± 0.12	0.03	0 – 0.62	94.17
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococaceae	Romboutsia	0.07 ± 0.16	0	0 – 1.07	94.24

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Weissella	0.07 ± 0.50	0	0 – 4.51	94.31
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoracaceae	Grupo Familia XIII AD3011	0.07 ± 0.07	0.05	0 – 0.32	94.38
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas	0.06 ± 0.43	0	0 – 3.86	94.44
Bacteria	Cyanobacteria	Vampirivibrionia	Gastranaerophilales	Gastranaerophilales	Gastranaerophilales	0.06 ± 0.35	0	0 – 3.13	94.50
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	0.06 ± 0.26	0	0 – 1.89	94.56
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus	0.06 ± 0.23	0	0 – 1.95	94.62
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	No cultivado	0.06 ± 0.09	0	0 – 0.46	94.68
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-003	0.06 ± 0.19	0	0 – 1.10	94.74
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Grupo Clostridia vadinBB60	Grupo Clostridia vadinBB60	Grupo Clostridia vadinBB60	0.06 ± 0.16	0	0 – 1.17	94.80
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococcaceae	Intestinibacter	0.04 ± 0.24	0	0 – 2.15	94.84
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	No cultivado	No cultivado	0.04 ± 0.16	0	0 – 1.18	94.88
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales-Selenomonadales	Veillonellaceae	Megasphaera	0.04 ± 0.29	0	0 – 2.54	94.92
Bacteria	Desulfobacterota	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Bilophila	0.04 ± 0.07	0	0 – 0.29	94.96
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Negativibacillus	0.04 ± 0.12	0	0 – 0.77	95.00
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-004	0.04 ± 0.11	0	0 – 0.68	95.04
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Tyzzereella	0.04 ± 0.12	0	0 – 0.79	95.08

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo	0.04 ± 0.08	0	0 – 0.49	95.12
					Lachnospiraceae				
					NK4B4				
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoracaceae	Family XIII UCG-001	0.04 ± 0.05	0	0 – 0.22	95.16
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelatoclostridiaceae	Coprobacillus	0.03 ± 0.19	0	0 – 1.71	95.19
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	GCA-900066575	0.03 ± 0.06	0	0 – 0.33	95.22
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Grupo	0.03 ± 0.05	0	0 – 0.20	95.25
					Lachnospiraceae				
					FCS020				
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	No cultivado	0.03 ± 0.06	0	0 – 0.42	95.28
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Hungatella	0.03 ± 0.16	0	0 – 1.44	95.31
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae	Coprobacter	0.03 ± 0.09	0	0 – 0.53	95.34
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Howardella	0.02 ± 0.07	0	0 – 0.56	95.36
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	0.02 ± 0.05	0	0 – 0.23	95.38
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Solobacterium	0.02 ± 0.09	0	0 – 0.76	95.40
Bacteria	Actinobacteriota	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	No cultivado	0.02 ± 0.05	0	0 – 0.21	95.42
Bacteria	Desulfobacterota	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	No cultivado	0.02 ± 0.05	0	0 – 0.26	95.44
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	0.01 ± 0.07	0	0 – 0.62	95.45
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	DTU089	0.01 ± 0.04	0	0 – 0.23	95.46

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media ± DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Candidatus Soleaferrea	0.01 ± 0.07	0	0 – 0.57	95.47
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Eisenbergiella	0.01 ± 0.04	0	0 – 0.20	95.48
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Butyricoccaceae	UCG-009	0.01 ± 0.04	0	0 – 0.30	95.49
Bacteria	Actinobacteriota	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Slackia	0.01 ± 0.03	0	0 – 0.27	95.50
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae	No cultivado	0.01 ± 0.04	0	0 – 0.23	95.51
Bacteria	Actinobacteriota	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Eggerthella	0.01 ± 0.04	0	0 – 0.26	95.52
Bacteria	Actinobacteriota	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriales Incertae Sedis	No cultivado	0.01 ± 0.03	0	0 – 0.28	95.53
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Marvinbryantia	0.01 ± 0.03	0	0 – 0.13	95.54
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Izemoplasmatales	Izemoplasmatales	Izemoplasmatales	0.01 ± 0.02	0	0 – 0.17	95.55
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Turicibacter	0.01 ± 0.04	0	0 – 0.30	95.56
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	Anaeroplasma	0.01 ± 0.02	0	0 – 0.15	95.57
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales- Selenomonadales	Veillonellaceae	Allisonella	0.01 ± 0.03	0	0 – 0.20	95.58
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Frisingicoccus	0.01 ± 0.02	0	0 – 0.18	95.59
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Holdemania	0.01 ± 0.02	0	0 – 0.16	95.60
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.00 ± 0.02	0	0 – 0.09	95.60
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptococcales	Peptococcaceae	Peptococcus	0.00 ± 0.02	0	0 – 0.11	95.60
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Anaerofilum	0.00 ± 0.02	0	0 – 0.12	95.60
Bacteria	Actinobacteriota	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Enterorhabdus	0.00 ± 0.01	0	0 – 0.07	95.60

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

Continúa en la página siguiente

Tabla D2: Continuación

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)			Abundancia relativa acumulada (%)
						Media \pm DE	Mediana	Mínimo – Máximo	
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Defluviitaleaceae	Defluviitaleaceae UCG-011	0.00 \pm 0.02	0	0 – 0.10	95.60
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelatoclostridiaceae	UCG-004	0.00 \pm 0.01	0	0 – 0.06	95.60
Bacteria	Actinobacteriota	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Eggerthellaceae	Gordonibacter	0.00 \pm 0.01	0	0 – 0.07	95.60
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Epulopiscium	0.00 \pm 0.01	0	0 – 0.10	95.60
Bacteria	Verrucomicrobiota	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	Victivallis	0.00 \pm 0.01	0	0 – 0.04	95.60
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-008	0.00 \pm 0.01	0	0 – 0.10	95.60
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Familia XI	Fenollaria	0.00 \pm 0.01	0	0 – 0.09	95.60
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Christensenellales	Christensenellaceae	No cultivado	0.00 \pm 0.01	0	0 – 0.05	95.60
Bacteria	No asignado	No asignado	No asignado	No asignado	No asignado	4.39 \pm 2.69	3.84	0.18 – 12.78	100.00

Abundancia relativa acumulada calculada a partir de la media de los datos. DE: Desviación estándar

E. Evaluación de las diferencias de la microbiota intestinal de adultos mayores clasificados por grupo de edad y control de los niveles de presión arterial

Se llevó a cabo un análisis complementario con el fin de evaluar si la edad tenía un efecto distinto en la microbiota intestinal dependiendo del grupo etario al que pertenecieran los adultos mayores.

Por consiguiente, se evaluaron las diferencias en la diversidad y composición de la microbiota intestinal de los pacientes clasificados según el control de sus niveles de PA y su grupo de edad. Los grupos resultantes fueron los siguientes:

- Adultos mayores de 60 a 69 años con PA controlada (n=31)
- Adultos mayores de 60 a 69 años con PA no controlada (n=12)
- Adultos mayores de 70 a 79 años con PA controlada (n=21)
- Adultos mayores de 70 a 79 años con PA no controlada (n=6)
- Adultos mayores de 80 años o más con PA controlada (n=9)
- Adultos mayores de 80 años o más con PA no controlada (n=2)

Para evaluar la diversidad alfa de la microbiota intestinal se midió el número de ASVs observados, el índice de Shannon, el índice de homogeneidad de Simpson y el índice de diversidad filogenética de Faith. Como se muestra en la **Figura E5** no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de estas métricas al comparar los grupos entre sí.

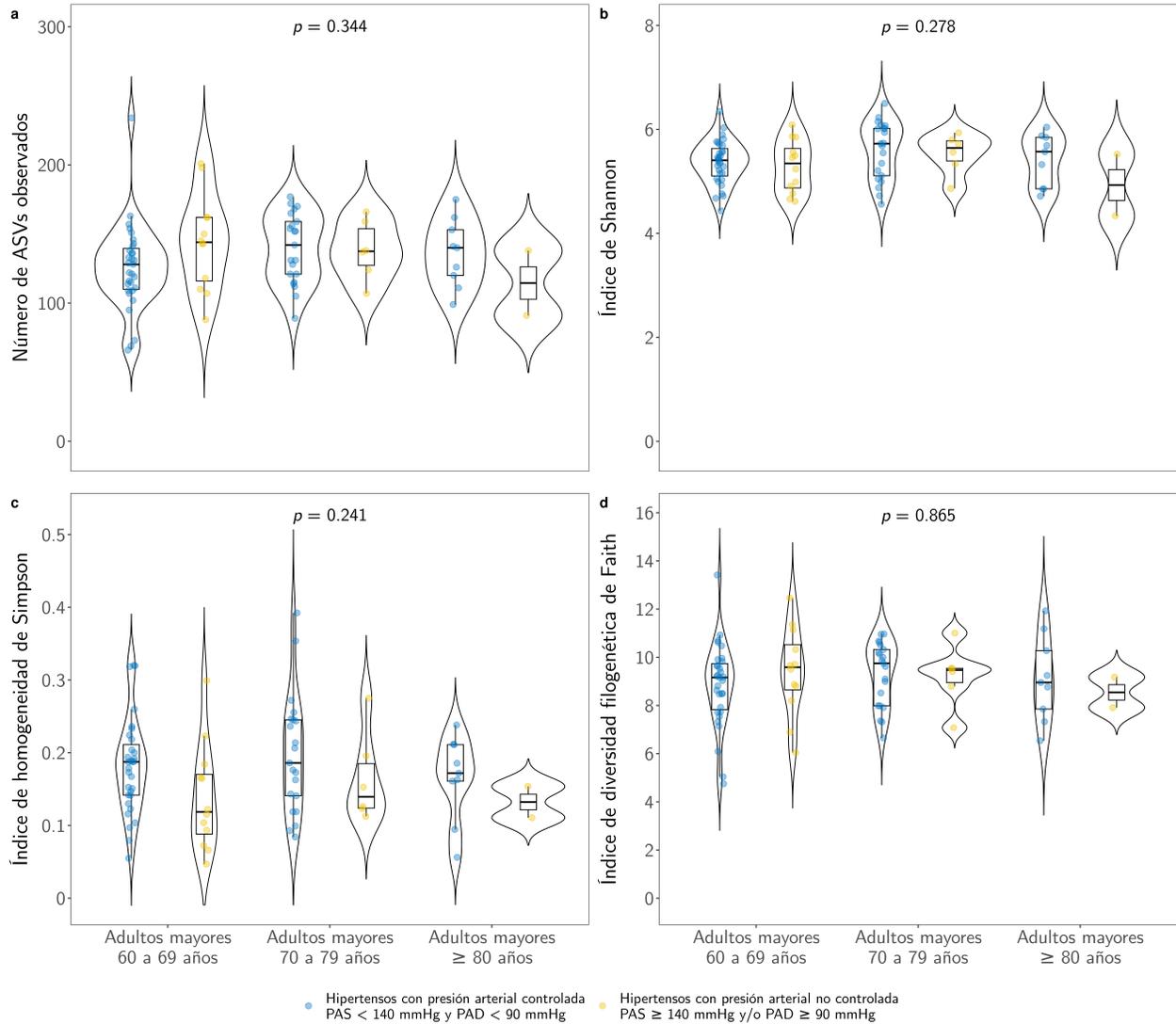


Figura E5: Gráficos de violín comparando diversidad alfa de pacientes clasificados por niveles de presión arterial y edad. (a) Número de ASVs observados; (b) Índice de Shannon; (c) Índice de homogeneidad de Simpson; (d) Índice de diversidad filogenética de Faith. Todas las métricas de diversidad alfa fueron calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. Los valores de p se calcularon con la prueba ANOVA. ANOVA: Análisis de varianza; ASV: *Amplicon Sequence Variant*; PAD: Presión arterial diastólica; PAS: Presión arterial sistólica.

En cuanto a la diversidad beta, se llevó a cabo la representación gráfica utilizando un PCoA generado a partir de las distancias calculadas con las siguientes métricas: índice de disimilitud de Jaccard, índice de disimilitud de Bray-Curtis, UniFrac y UniFrac ponderado. Como se observa en la **Figura E6**, no se presenta un patrón definido de separación entre los grupos

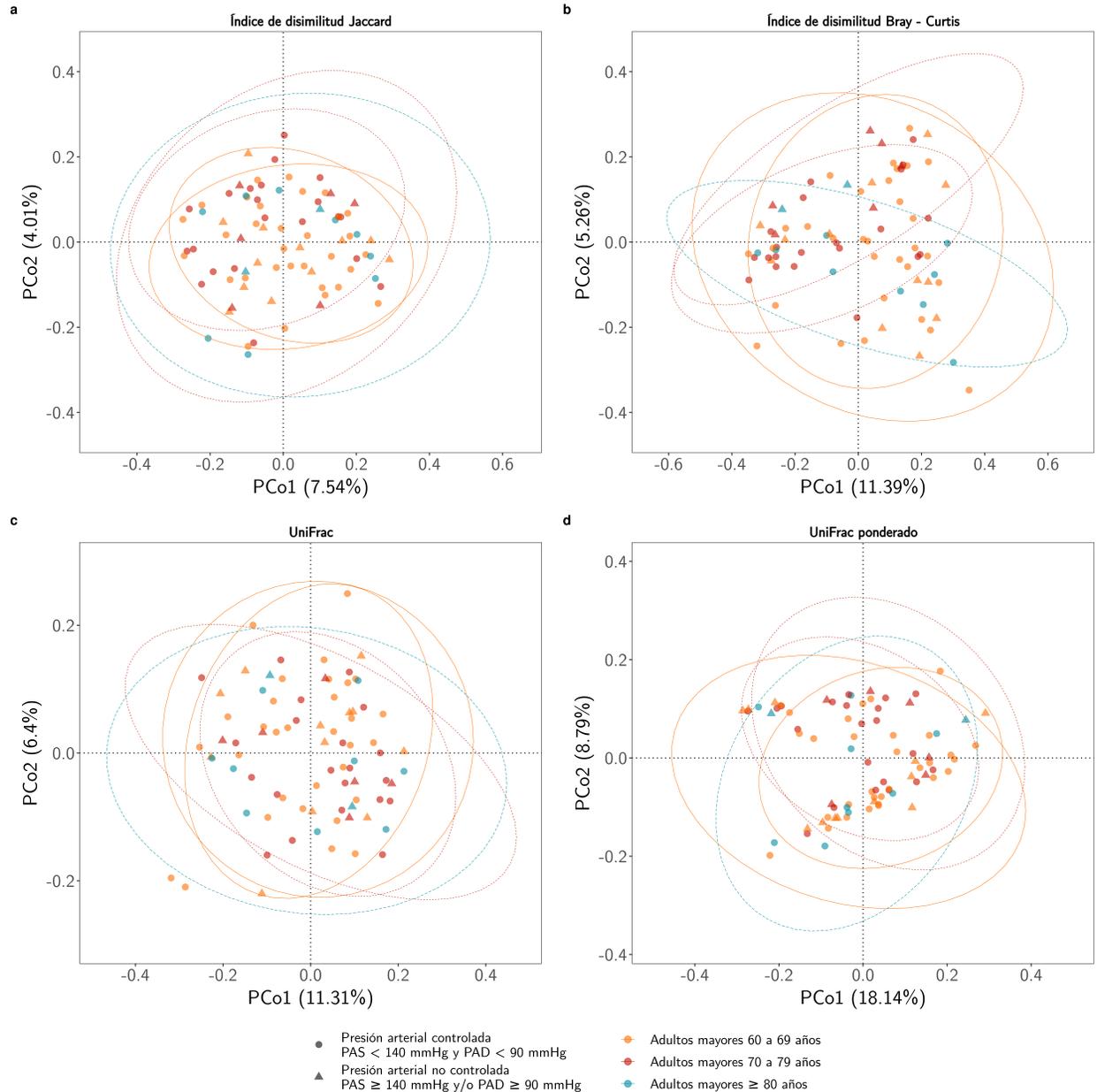


Figura E6: Diversidad beta de adultos mayores mexicanos clasificados por grupo de edad. (a) Índice de disimilitud Jaccard; (b) Índice de disimilitud Bray-Curtis; (c) UniFrac; (d) UniFrac ponderado. PCoA representados con PCo1 y PCo2. Todas las matrices de distancia para los análisis de beta diversidad fueron calculadas a nivel de ASVs a partir de datos normalizados por rarefacción a 14,645 secuencias por muestra. ASV: *Amplicon Sequence Variant*; PCo: Coordenada principal; PCoA; Análisis de coordenadas principales.

Se calculó y comparó el índice Firmicutes/Bacteroidota, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos generados (**Figura E7**)

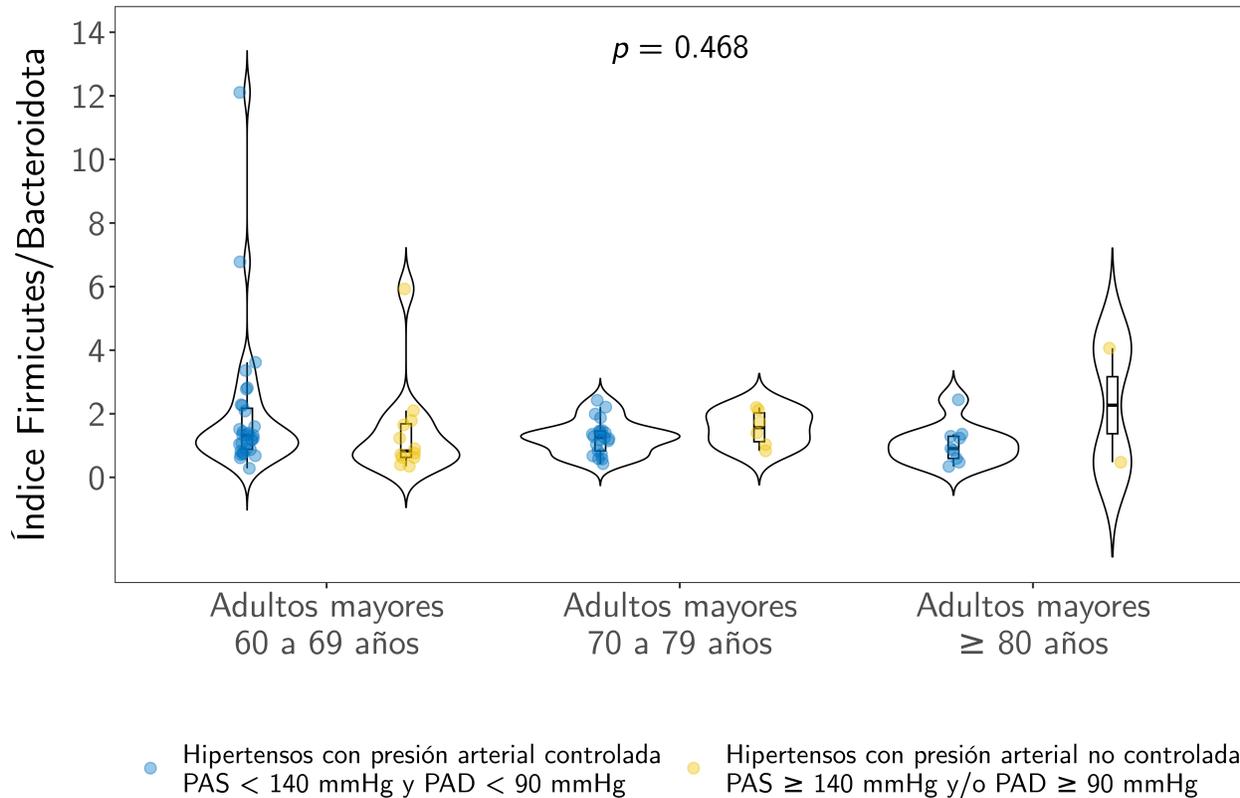


Figura E7: Gráficos de violín de índice *Firmicutes/Bacteroidota*. (a) Comparación de adultos mayores mexicanos clasificados por grupo de edad. El valor de p se calculó con la prueba Kruskal-Wallis; (b) Comparación de hipertensos con presión arterial controlada *versus* hipertensos con presión arterial no controlada. El valor de p se calculó con la prueba U de Mann - Whitney. ANOVA: Análisis de varianza; PAD: Presión arterial diastólica; PAS: Presión arterial sistólica

También se realizó el análisis de abundancia diferencial utilizando los 3 métodos propuestos en la metodología: LEfSe, GLM-CLR y GLM-NB. Únicamente se encontraron taxones con abundancia diferencial con los métodos GLM-CLR y GLM-NB (**Figura E8**), sin embargo, ninguno de estos taxones coincidió entre los distintos métodos empleados. Además, en todos los casos no se conservó la significancia estadística tras el ajuste por FDR ($p_{ajustado} > 0.05$).

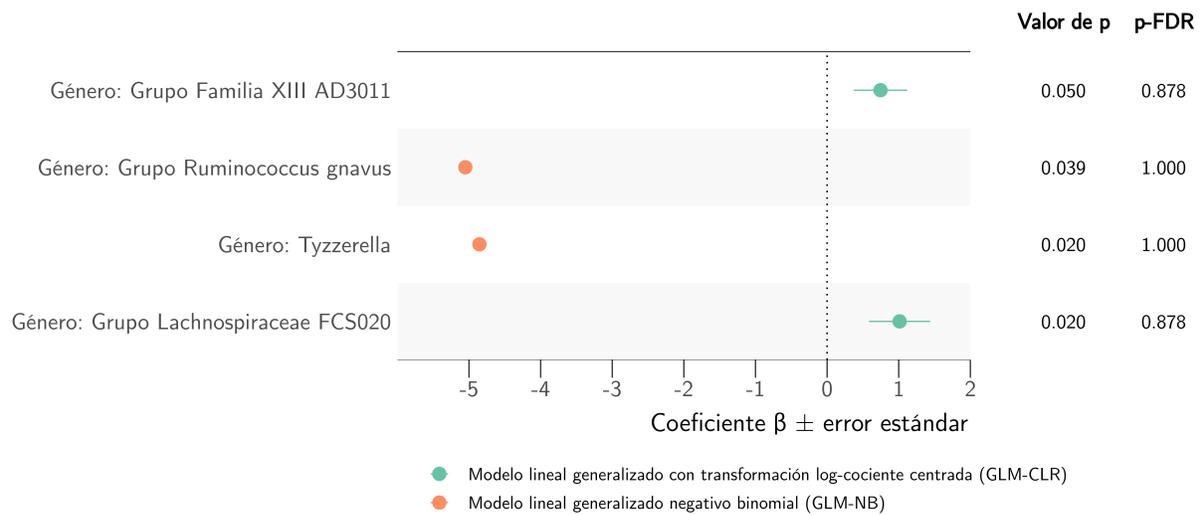


Figura E8: Abundancia diferencial de taxones para adultos mayores clasificados según el control de su presión arterial y según su edad. (a) GLM-CLR y GLM-NB. Taxones con valor β negativo enriquecidos en hipertensos con PA controlada, taxones con valor β positivo enriquecidos en hipertensos con PA no controlada. p-FDR: Valor de p ajustado por el método FDR. GLM-CLR: Modelo lineal generalizado con transformación log-cociente centrada; GLM-NB: Modelo lineal generalizado negativo binomial; FDR: *False discovery rate*/Tasa de descubrimientos falsos

En resumen, no se encontraron diferencias significativas en la diversidad y composición bacteriana de la microbiota intestinal bacteriana al estratificar a los pacientes por grupo de edad y control de la presión arterial.