



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**COMPARACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO
Y QUIMIOPREVENTIVO DE FRUCTANOS EN
UN MODELO ANIMAL CON INDUCCIÓN DE
CÁNCER DE COLON**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

M.C. EVELYN REGALADO RENTERIA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MIGUEL ANGEL RUIZ CABRERA

CODIRECTORA DE TESIS:

DRA. BERTHA IRENE JÚAREZ FLORES

COMITÉ TUTORIAL:

DR. JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA

DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Fitoquímica y de Agroprocesos del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) Unidad Zapopan.

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio de Patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, S.L.P.

Instituto de Microbiología Aplicada de la Universidad de Justus-Liebig, Giessen, Alemania.

Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Dr. Manuel Núñez Muñoz (Nutrición y Genética Saludable, S.A. de C.V.) por su apoyo financiero mediante el apoyo del Programa de Estímulos a la Innovación PEI-CONACYT, No. 251911.

El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000590, en el Nivel Doctorado (En Desarrollo). Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 559072.

Agradecimientos académicos

Con especial gratitud a la Dra. Bertha Irene Juárez Flores, por su ejemplo, consejos y apoyo durante mis estudios de licenciatura y posgrado.

Y al Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera por sus contribuciones, apoyo y orientación, además por su ejemplo de tesón, disciplina y vocación en la formación académica de los alumnos.

Ambos pilares fundamentales en mi crecimiento personal y académico durante mi estadía en el Instituto de Investigación de Zonas Desérticas. Grandes investigadores y además excelentes personas, cultas, honorables, íntegras y extraordinarias.

Al Dr. Fidel Martínez Gutiérrez por acompañarme en mi formación académica con su apoyo y consejos. Por impulsarme a interactuar con personas de otras áreas de investigación para enriquecer mi formación y por su gran ejemplo de calidad humana.

Al Dr. Miguel Ángel Ruiz Cabrera por su apoyo, orientación y por aceptarme como su alumna.

A la Dra. Rosa María Camacho Ruiz por aceptarme para la estancia en CIATEJ y por el apoyo brindado y conocimiento compartido.

Al Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle por su interpretación y apoyo en el análisis histológico.

Al Dr. Juan Carlos García por su apoyo económico al proyecto y por sus asesorías sobre temas de estadística.

Al Dr. Stefan Ratering y la Dra. Sylvia Schnell del Instituto de Microbiología Aplicada de la Universidad de Justus-Liebig en Alemania por su apoyo y orientación en el análisis de secuenciación.

A la Dra. María Elena García Arreola del Instituto de Geología de la Facultad de Ingeniería por su apoyo en el análisis de minerales.

Al MC. Marco Martínez Martínez por su apoyo en una parte del análisis estadístico con el heat map y el análisis de componentes principales de la parte de secuenciación.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por las facilidades otorgadas en su laboratorio para realizar la extracción del ADN bacteriano.

A la Q.F.B Josefina Acosta por sus sinceros consejos y apoyo constante desde que llegué al IIZD hasta ahora.

Al Dr. Gregorio Álvarez Fuentes por su orientación, consejos y palabras de ánimo y por sus clases de estadística.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por sus sugerencias y aportaciones sobre el escrito.

A la Red Temática Mexicana para el Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves (AGARED) por su apoyo económico para realizar la estancia nacional en CIATEJ.

Al personal académico y administrativo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Al personal académico y administrativo del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas que contribuyó con su apoyo, sugerencias y opiniones a enriquecer las diversas etapas de los experimentos tanto en el laboratorio como en los seminarios internos semestrales.

Y por último, a la población mexicana que contribuyó económicamente con sus impuestos a apoyar y remunerar mis estudios de posgrado mediante mi beca CONACyT.

Agradecimientos personales

La realidad es que el estudiante de posgrado presenta fluctuaciones emocionales durante su finita estancia académica, pero el acompañamiento y apoyo de buenas personas es importante para concluir a bien, con prudencia, sensatez, ánimo y sano juicio el ciclo académico; y tuve la fortuna de encontrarlas en mi camino. Aunque es una mezcla de sentimientos llegar a una etapa en la que se tiene que cerrar un ciclo, siempre imperarán aquellos sentimientos que inclinan la balanza hacia un lado positivo cuando se ha tenido una grata experiencia. Con cada uno de ustedes permaneceré agradecida y con sentimientos de reciprocidad a su estimación y buenos deseos.

A Dalia Abigaíl García Flores y Eder Oswaldo Portillo Gerónimo, por animarme en cada momento y contar siempre con ustedes de manera incondicional; mi querido par de amigos, me llenaron de tantas risas, buenas pláticas y grandes enseñanzas.

A César Iván Godínez Hernández por apoyarme y compartirme pacientemente su conocimiento durante mi estancia en el instituto, por ayudarme a encontrar resoluciones y/o agrandar mis dudas sobre diversos temas y por las vivencias que contribuyeron a fortalecer y perpetuar una gran amistad.

A Jaime Becerra Jiménez por apoyarme en todo momento, y por orientarme y animarme cuando más lo necesité y porque la distancia territorial no ha sido impedimento para conservar una amistad auténtica, fresca y presente.

A los alumnos que realizaron experimentos en los laboratorios de Fitoquímica y/o Agroprocesos o que compartí cubículo en el IIZD y que me permitieron aprender de ellos y enriquecer mi formación académica y contribuyeron a mi crecimiento personal: Neftalí Méndez, Mónica Morales, Norma Jalomo, Julio César Zavala, Carmen Mejía, Edgar Gavia, Ángel Hernández, Andrea Murillo, Lizeth Zumaya, Raúl Loredó, Miguel Ramírez, Claudia Cervantes, Rosa Elena Herrera, Miriam Andrade, Carolina Chinome, Oswaldo Cárdenas y Carely Arjona; todos buenos profesionistas y excelentes personas.

El agradecimiento más especial a mí querida familia

A mi papá, José Trinidad Regalado Cepeda por apoyarme en cada momento, por sus consejos y ser mi mayor ejemplo de fortaleza y el pilar de mi familia.

A mi querida tia Norma Rentería Padrón, por animarme y estar presente diariamente, por su amor familiar, bondad, disciplina y perseverancia ante cualquier situación.

A mis hermanos Diego Eduardo y Eder Andrés y mi cuñada Katherine Martínez por su confianza, apoyo, enseñanzas y risas; son extraordinarios.

A **Saeli Esmeralda** y **Elías Sebastián**, por su acompañamiento alegre y paciente durante esta etapa, por regalarme cada día mi motivo y fortaleza para seguir adelante con sus hermosas sonrisas y sus reconfortantes y cálidos abrazos, y por que en su mirada tranquila y sus pequeñas manos junto a las mías permanece el sentimiento más bello que puede existir. Los amo tanto mis niños.

A mi amado esposo, mejor amigo y mayor apoyo, **Pedro Prado Hernández**, gracias por animarme y acompañarme cada día, por ser mi ejemplo de tenacidad, paciencia y responsabilidad y por tener una confianza desmedida en mí. Y ahora vamos por más metas, objetivos y vivencias en otros rumbos, pero siempre juntos. Te amo.

Gracias a todos, lo logramos!

Índice general

Índice general	I
Índice de cuadros	V
Índice de figuras	VI
I Caracterización comparativa de fructanos comerciales y de los extraídos de tallos de <i>Agave salmiana</i> y <i>A. tequilana</i>	1
Abstract	2
Resumen	3
1 Introducción	4
2 Materiales y métodos	7
2.1. Reactivos	7
2.2. Fructanos comerciales	7
2.3. Extracción de fructanos de tallos de <i>A. salmiana</i> y <i>A. tequilana</i>	7
2.4. Contenido de cenizas totales de los fructanos	8
2.5. Identificación cualitativa de azúcares por HPTLC	8
2.6. Cuantificación de carbohidratos por HPLC	9
2.7. Estimación del grado de polimerización por HPLC-SEC	9
3 Resultados y discusión	10
3.1. Rendimiento de fructanos	10
3.2. Identificación cualitativa de carbohidratos por HPTLC	11
3.3. Cuantificación de carbohidratos por HPLC y cenizas	12

3.4. Estimación del grado de polimerización por HPLC-SEC	14
4 Conclusión	20
Referencias citadas	21
II Efectos de fructanos de maguey, inulina y almidón sobre componentes del síndrome metabólico en ratas Wistar sanas	25
Abstract	26
Resumen	27
5 Introducción	28
6 Materiales y métodos	30
6.1. Polisacáridos probados	30
6.2. Modelo animal	30
6.3. Bioquímica de muestras séricas	31
6.4. Variación del pH y microbiología de las heces	31
6.5. Extracción del ADN genómico	32
6.6. Amplificación por PCR y secuenciación del fragmento del gen bacteriano ARNr 16S	33
6.7. Análisis histológico	33
6.8. Diseño experimental y análisis estadístico	34
7 Resultados y discusión	35
7.1. Consumo de alimento	35
7.2. Cambios del peso corporal	35
7.3. Peso del tejido adiposo abdominal	36
7.4. Efectos en las variables séricas	37
7.5. pH y microbiología de las heces	41
7.6. Longitud intestinal y contenido colónico y cecal	46
7.7. Análisis histológico	49
8 Conclusiones	52

Referencias citadas	54
Artículo publicado	64
III Microbiota, histología colónica y parámetros metabólicos en ratas Wistar con cáncer de colon suplementadas con fructanos de Agaves y achicoria	65
Abstract	66
Resumen	67
9 Introducción	68
10 Materiales y métodos	70
10.1. Fructanos	70
10.2. Animales y dietas	70
10.3. Inducción de inicios de carcinogénesis colónica	71
10.4. Análisis bioquímico de muestras séricas	71
10.5. Análisis histológico	72
10.6. Extracción del ADN genómico	72
10.7. Amplificación por PCR y secuenciación del fragmento del gen bacteriano ARNr 16S	72
10.8. Diseño experimental y análisis estadístico	74
11 Resultados y discusión	75
11.1. Cambios del peso corporal	75
11.2. Tejido adiposo abdominal	76
11.3. Contenido colónico y cecal	77
11.4. Efectos en las variables séricas	78
11.5. Análisis histológico	80
11.6. Identificación de la diversidad bacteriana en la microbiota intestinal	83
12 Conclusiones	87
Referencias citadas	89

IV Cuantificación de nitrógeno en las heces y de minerales en el hueso de ratas Wistar sanas y con cáncer de colon suplementadas con fructanos de Agave y achicoria	96
Abstract	97
Resumen	98
13 Introducción	99
14 Materiales y métodos	101
14.1. Polisacáridos probados	101
14.2. Animales y dietas	101
14.3. Inducción de inicios de carcinogénesis colónica	102
14.4. Caracterización y contenido de minerales en fémur	102
14.5. Contenido de nitrógeno en heces	103
14.6. Diseño experimental y análisis estadístico	103
15 Resultados y discusión	104
15.1. Caracterización y contenido de minerales en fémur	104
15.2. Contenido de nitrógeno en las heces	108
15.3. Contraste entre experimentos	110
16 Conclusiones	111
Referencias citadas	112
Anexos	117

Índice de cuadros

3.1. Rendimiento de concentrado de fructanos de tallos de agave en madurez fisiológica óptima	11
3.2. Composición (mg/g base seca) de los fructanos evaluados	13
3.3. Distribución de peso molecular de diferentes fuentes de fructanos.	16
7.1. Ingesta neta semanal de alimento y cambio de peso corporal (g)	36
7.2. Cuantificación de variables séricas evaluadas al inicio y final del periodo experimental de ratas sanas	40
7.3. Concentración de familias bacterianas (UFC) al final del periodo experimental	42
7.4. Longitud intestinal (cm) de ratas sanas	47
7.5. Diámetro nuclear (μm) de hepatocitos y criptas de Lieberkühn	50
11.1. Peso corporal basal y final de las unidades experimentales con carcinogénesis colónica	75
11.2. Peso fresco del contenido colónico y cecal de ratas con carcinogénesis colónica	78
11.3. Cuantificación de variables séricas evaluadas al inicio y final del periodo experimental de ratas con carcinogénesis colónica	79
11.4. Diámetro y cantidad de fosas cólicas aberrantes en las criptas de Lieberkühn de ratas con carcinogénesis colónica	80
15.1. Variables de respuesta en fémur de unidades experimentales con dos estadios de salud.	105
15.2. Contenido mineral en fémur de ratas sanas	106
15.3. Contenido mineral en fémur de ratas con carcinogénesis colónica	107
15.4. Contenido de nitrógeno fecal de ratas sanas y con cáncer de colon	109
15.5. Contraste de variables en ratas sanas y con cáncer de colon	110

Índice de figuras

3.1. Cromatoplaqa de muestras de estándares de referencia y de fructanos	12
3.2. Distribución del grado de polimerización de la inulina comercial obtenida con HPLC-SEC.	14
3.3. Distribución del grado de polimerización de fructanos de <i>A. tequilana</i> comerciales y extraídos en laboratorio por HPLC-SEC	17
3.4. Distribución del grado de polimerización de fructanos de <i>A. salmiana</i> y <i>A. tequilana</i> extraídos en laboratorio obtenida con HPLC-SEC.	18
7.1. Ingesta neta semanal de alimento (g)	37
7.2. Cambios en el peso corporal de ratas sanas durante el periodo experimental . .	38
7.3. Peso del tejido adiposo abdominal de ratas sanas	39
7.4. Variación de pH fecal de ratas sanas	43
7.5. Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en heces de ratas sanas	44
7.6. Mapa de calor de diferentes géneros bacterianos en heces de ratas sanas	45
7.7. Análisis de componentes principales de comunidades bacterianas colónicas de ratas sanas	46
7.8. Peso del contenido cecal de ratas sanas	48
7.9. Peso del contenido colónico de ratas sanas	49
7.10. Microfotografías del tejido colónico (40X) de ratas sanas.	51
11.1. Cambios en el peso corporal de ratas con carcinogénesis colónica	76
11.2. Peso del tejido adiposo abdominal de ratas con carcinogénesis colónica	77
11.3. Microfotografías del tejido colónico (40X) de ratas con carcinogénesis colónica .	82
11.4. Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en heces de ratas con carcinogénesis colónica	83
11.5. Mapa de calor de diferentes géneros bacterianos en heces de ratas con carcinogénesis colónica	84

11.6. Análisis de componentes principales de comunidades bacterianas colónicas de ratas con carcinogénesis colónica 85

Abreviaturas

A	Almidón de arroz
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AOM	Azoximetano
AS	Suplementación con fructanos de <i>Agave salmiana</i>
ATC	Suplementación con fructanos comerciales de <i>Agave tequilana</i>
ATE	Suplementación con fructanos experimentales de <i>Agave tequilana</i>
AVS	Variantes de secuencia de amplicón
C	Suplementación control o testigo
CCR	Cancer colorectal
CF	Concentrado de fructanos
D	Índice de dispersidad
FCA	Fosas crípticas aberrantes
FOS	Fructooligosacáridos
GP	Grado de polimerización
GP _n	Peso promedio del grado de polimerización
GPP	Grado de polimerización promedio
GP _w	Peso promedio del grado de polimerización
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-SEC	Cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño

HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
I	Suplementación con inulina de achicoria comercial
JP	Jugo primario
JS	Jugo secundario
MFO	Madurez fisiológica óptima
Mn	Peso molecular promedio en número
Mw	Peso molecular promedio en peso

Capítulo I

Caracterización comparativa de fructanos comerciales y de los
extraídos de tallos de *Agave salmiana* y *A. tequilana*

Abstract

In the fructan industry, currently only the complete heads (stem and leaf bases) of heterogeneous magueyes in maturity are used. This variable physiological maturity and the compounds present in the foliar bases (waxes, saponins, chlorophyll and monosaccharides) affect the composition, quality and homogeneity of the product. Through HPTLC, HPLC and HPLC-SEC, were characterized and estimated the distribution of the carbohydrate profile and the degree of polymerization (DP) of the fructans from stems of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (ASE) and *A. tequilana* F.A.C. Weber (ATE) with optimal physiological maturity (OPM) and were contrasted with commercial fructans of *A. tequilana* (ATC) and chicory (IC). The average DP was 14.46, 16.20, 18.25 and 21.11 for IC, ASE, ATC and ATE, respectively. A proportion of fructans with DP > 10 of 73.20 and 83.74 % was recorded in ASE and ATE, respectively. Regarding the proportion of fructooligosaccharides (DP 3-10), 26.10 and 14.20 % were obtained in ASE and ATE, respectively, lower than those of IC. ASE and ATE had a lower proportion of monosaccharides than ATC and IC. The choice of magueyes in OPM, the exclusive use of its stems and organic extraction, allow the harvest (cultivated) or collection (wild) of standardized raw material, for the production of fructans with the highest concentration and quality, and with homogeneous DP, reproducible and characteristic of each species. The DP for *Agave salmiana* was confirmed to be 16 and a DP of 21 is presented for the first time for *A. tequilana*. The choice of magueys in OPM and the exclusive use of their stems, allow the harvest (cultivated) or collection (wild) of standardized raw material, for the extraction of fructans with the highest concentration and quality, and a homogeneous, reproducible and own DP of each species. The DP for *Agave salmiana* was confirmed to be 16 and a DP of 21 is presented for the first time for *A. tequilana*.

Key words: *Agave salmiana*, *Agave tequilana*, heads and stems of maguey, fructans, degree of polymerization, inulin

Resumen

En la industria de los fructanos actualmente sólo se utilizan las cabezas completas (tallos y bases foliares) de magueyes heterogéneos en madurez. Esta madurez fisiológica variable y los compuestos presentes en las bases foliares (ceras, saponinas, clorofila y monosacáridos) repercuten sobre la composición, calidad y homogeneidad del producto. Por medio de HPTLC, HPLC y HPLC-SEC, se caracterizó y estimó la distribución del perfil de carbohidratos y el grado de polimerización (GP) de los fructanos de tallos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (ASE) y *A. tequilana* F.A.C. Weber (ATE) con madurez fisiológica óptima (MFO) y se contrastaron con fructanos comerciales de *A. tequilana* (ATC) y de achicoria (IC). El GP promedio fue de 14.46, 16.20, 18.25 y 21.11 para IC, ASE, ATC y ATE, respectivamente. Se registró una proporción de fructanos con GP>10 de 73.20 y 83.74% en ASE y ATE, respectivamente. Respecto a la proporción de fructooligosacáridos (GP 3-10), se obtuvieron 26.10 y 14.20% en ASE y ATE, respectivamente, menores que los de IC. ASE y ATE presentaron una menor proporción de monosacáridos que ATC y que IC. La elección de magueyes en MFO, el uso exclusivo de sus tallos y la extracción orgánica, permiten la cosecha (cultivada) o recolección (silvestre) de materia prima estandarizada, para la producción de fructanos con la mayor concentración y calidad, y con GP homogéneo, reproducible y propio de cada especie. Se confirmó que el GP para *Agave salmiana* es 16 y se presenta por primera vez un GP de 21 para *A. tequilana*.

Palabras clave: *Agave salmiana*, *Agave tequilana*, cabezas y tallos de maguey, fructanos, grado de polimerización, inulina

1

Introducción

Los fructanos son polímeros de fructosa que desempeñan diversas funciones relevantes en la fisiología de las plantas, sirven como carbohidratos de reserva, aportan resistencia a condiciones adversas de temperatura, estrés hídrico y patógenos, y les permite sobrevivir a periodos desfavorables para su crecimiento (Van Arkel *et al.*, 2014). Son utilizados en la industria alimentaria como ingrediente debido a sus propiedades físicas, químicas, tecnológicas y funcionales. Las aplicaciones de estos polisacáridos dependen de sus cualidades como polímero. Estas cualidades se analizan por medio de métodos analíticos directos e indirectos para conocer su composición y perfil de distribución del grado de polimerización (GP), lo que permite comprobar la autenticidad de la materia prima, los métodos utilizados para su extracción y la adición de carbohidratos a los fructanos (Moreno-Vilet *et al.*, 2017).

Aunque los fructanos tienen sólo tres tipos de enlaces que unen a sus monómeros: fru- β (2-1), fru- β (2-6) y glu- β (2-6), su eficiencia metabólica enzimática y capacidad de elongarse y ramificarse con la adición de residuos fructosil, genera diferentes estructuras en las especies vegetales (Pollock y Cairns, 1991; Livingston *et al.*, 1993; Kaur y Gupta, 2002; Olvera *et al.*, 2007; Madrigal y Sangronis, 2007). Incluso plantas de la misma especie, pero en diferentes estadios de desarrollo pueden presentar importantes variaciones en la concentración y grado de polimerización de sus fructanos (Pollock y Jones, 1979). Tanto, que es común procesar materia prima en estadios contrastantes de madurez, en la investigación como en la industria, lo que imposibilita llegar a una composición homogénea entre lotes (Camacho Ruíz, 2016). Además de la especie vegetal utilizada, los procesos de su extracción y refinado repercuten en su polidispersión y GP de sus estructuras, por lo tanto, la reproducibilidad del producto final se ve afectada (Pollock, 1986; Ronkart *et al.*, 2007). Además, es irrelevante el avance tecnológico que se aplique a los procesos de extracción de fructanos si no se toma en cuenta la fisiología de la planta utilizada como materia prima, de otra forma solo se encarece su extracción (Aires-Barros y Azevedo, 2017).

En el género *Agave* los fructanos son almacenados en el tallo de la planta durante su periodo vegetativo y la concentración máxima de fructanos almacenados se alcanza al iniciarse la fase reproductora, etapa considerada como el estado de madurez fisiológica óptima (MFO) e ideal para la extracción de sus fructanos (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; Babb y Haigler, 2001). Después de dicho estadio los fructanos acumulados son hidrolizados a monosacáridos (glucosa y fructosa) y removidos del tallo para cubrir las demandas energéticas de la reproducción, tanto asexual (producción de hijuelos) como sexual (inflorescencia o escapeo floral, frutos y semillas)(Wang y Nobel, 1998); así, la cantidad de mono y disacáridos en la planta dependerá del intercambio dinámico entre sus órganos, según la etapa fisiológica en que se encuentre el maguey (Claassen *et al.*, 1991). La mayor cantidad de estos azúcares libres en la planta de maguey se registra en sus etapas de crecimiento y durante la reproducción (Godínez-Hernández, 2017); por lo tanto, el estado fisiológico y el órgano vegetal determinarán la concentración y la composición de los fructanos extraídos.

En los agaves la MFO e idónea para la extracción de fructanos se identifica en el campo por el adelgazamiento del cogollo y porque las puntas de sus últimas pencas por desplegar se encuentran por debajo del ápice de las ya desplegadas (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001). Este estado fisiológico en el campo es reconocido como maguey “quiotillo” para el caso de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y como maguey “novillo” para *A. tequilana* F.A.C. Weber (Godínez-Hernández *et al.*, 2016b).

Actualmente la industria de los fructanos de *Agave* utiliza cabezas (conjunto del tallo y bases foliares) completas de la especie *A. tequilana* para su extracción, para lo cual se considera principalmente su edad cronológica (años de plantada en campo) como indicador de madurez (Arrizon *et al.*, 2010). Esta madurez fisiológica variable de la materia prima y los compuestos de las bases de penca (ceras, saponinas, clorofila y gran cantidad de monosacáridos) influyen negativamente en la calidad del producto final.

Por ello, se han desarrollado e implementado diversas etapas de purificación en el proceso extracción para purificar los fructanos: solventes, membranas de nailon de 0.2 μm para retirar proteínas, carbón activado y membranas de intercambio aniónico y catiónico y técnicas de ultra y nanofiltración con membranas de celulosa hidrofílica para separar mono y disacáridos (fructosa y sacarosa) principalmente, para cumplir la normativa NOM-002-SAGARPA-2016, que en suma no deben superar el 20%, el doble de lo permitido para los fructanos de achicoria (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; Camacho Ruíz, 2016; Godínez-

Hernández *et al.*, 2016a; SAGARPA, 2016), ya que se consideran indeseables para los fructanos y con el propósito de incrementar su calidad y pureza (Alvarado *et al.*, 2014; Moreno-Vilet *et al.*, 2017; Reynoso Ponce *et al.*, 2017).

Además con la finalidad de justificar dichos procesos de refinación, se ha propuesto la separación de los fructanos íntegros en fracciones de alto o bajo GP para aportar valor económico y utilidad industrial, y para destacar las características físicas, químicas, tecnológicas y funcionales que aporta cada fracción para diversos propósitos en la industria alimentaria; así, la fracción de los fructanos con $GP > 10$ son incorporados principalmente a diversos productos alimentarios como emulsificantes y sustitutos de grasa y los fructooligosacáridos (FOS) con GP entre 3 y 10 se añaden como endulzante bajo en calorías (Olvera *et al.*, 2007; García Gamboa *et al.*, 2018).

Sin embargo, Godínez-Hernández *et al.* (2016c) desarrollaron una metodología simple para extraer de los tallos de magueyes en MFO, fructanos íntegros (sin separaciones por grado de polimerización) con alto rendimiento, buena calidad y escasa variación en su composición, sin que se mezclen con otros compuestos presentes en las bases foliares, que tengan que ser eliminados posteriormente a la extracción con un costo adicional significativo .

Así, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar y estimar el grado medio de polimerización de los fructanos extraídos de tallos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (ASE) y *A. tequilana* F.A.C. Weber (ATE) con similar estado de MFO y proceso de extracción simplificado, y de fructanos comerciales de *A. tequilana* (ATC) y de achicoria (*Cichorium intybus* L.) (IC).

2

Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Para la identificación cualitativa de carbohidratos por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés), la cuantificación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y para la estimación del GP por cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HPLC-SEC, por sus siglas en inglés) se utilizaron estándares de fructosa, glucosa, sacarosa, nistosa, 1-kestosa y FOS de achicoria e inulina (fructanos mayores a 5 GP) y dextranos (Sigma-Aldrich ®, San Luis Misuri, EE.UU.), maltopentosa, maltohexosa y maltoheptosa (Supelco, EE.UU.).

2.2. Fructanos comerciales

Se utilizaron fructanos de achicoria (*Cichorium intybus* L.) (Orafti ® Synergy 1, Tienen, Bélgica) declarados como una mezcla de FOS e inulina (~92 %) y fructanos de *A. tequilana* F.A.C. Weber (Inufib TM, Jalisco, México).

2.3. Extracción de fructanos de tallos de *A. salmiana* y *A. tequilana*

Se procesaron seis cabezas de cada especie de maguey, todas con MFO, esto es, con la máxima concentración de fructanos (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001). Las cabezas de maguey mezcalero potosino (*A. salmiana*, ASE) en estadio quiotillo fueron recolectadas en agostaderos ejidales del municipio de Charcas, San Luis Potosí; las cabezas de maguey tequilero (*A. tequilana*, ATE) se cosecharon en una plantación en Arandas, Jalisco.

A todas las cabezas les fueron retiradas las bases foliares y solamente el tallo fue utilizado para la extracción del concentrado de fructanos (CF).

El CF de los tallos de ambas especies se obtuvo de acuerdo con el método desarrollado por Godínez-Hernández *et al.* (2016c): con un extractor centrífugo comercial (International EXS, CD. México, México) se obtuvo un jugo primario (JP) de trozos del tallo y un jugo secundario (JS) por compresión de su bagazo con una prensa hidráulica de 20t (Urrea 2471, España); ambos jugos se estabilizaron independientemente en baño María (53° C/1 h), posteriormente se eliminaron los minerales insolubles (rafídios de oxalatos de calcio) mediante centrifugación a 2000 rpm/15 min/0°C (DAMON PR-6000, California, EE. UU.) y el sobrenadante se evaporó parcialmente a 42°C a baja presión (152 mm Hg) hasta alcanzar 50 ° Brix (J. P. Selecta Gastrovac, Barcelona, España). Finalmente, los jugos concentrados se secaron en un horno de aire forzado (36 h/ 55°C) (Shel-Lab FX-14, Oregon, EE. UU.) y el CF en escamas obtenido fue mezclado, pulverizado y almacenado a temperatura ambiente en recipientes herméticos.

2.4. Contenido de cenizas totales de los fructanos

Las cenizas totales se obtuvieron mediante la calcinación de las muestras. Para ello se pesaron 5 g de cada muestra y se calcinaron en una mufla (LINDBERG SB, 51844, Wisconsin, EE. UU.) a 550 °C por 2 h. Las muestras calcinadas se colocaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y posteriormente fueron pesadas para obtener el porcentaje de cenizas totales mediante la diferencia de peso inicial y final.

2.5. Identificación cualitativa de azúcares por HPTLC

Se prepararon soluciones de las muestras de fructanos (ASE, ATE, ATC e IC) y estándares a 20 mg/mL en agua destilada y se atomizaron 2 µL de forma semiautomatizada por el equipo CAMAG LINOMAT 5 (Muttentz, Suiza). Como fase estacionaria se utilizaron placas de sílica Nano-SIL NH₂/UV254 de 20 x 10 cm (Macherey-Nagel, Alemania) y como fase móvil una mezcla de n-butanol: metanol: agua: ácido acético 50:25:20:1 (v/v/v/v) con tiempo de corrida de 2 h. Posteriormente la placa fue calentada a 180°C /10 min (Corning™ PC-420 Stirrer Hot Plate, EE.UU.) y atomizada con etanol: ácido sulfúrico: anisaldehído, 18: 1: 1 (v/v/v); posteriormente nuevamente se calentó a 180°C /10 min y se revelaron sus componentes a luz visible (400-700 nm).

2.6. Cuantificación de carbohidratos por HPLC

La cuantificación de carbohidratos se hizo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un equipo (Agilent Technologies serie 1100, California, EE. UU.) con detector de índice de refracción a temperatura de 50°C. Como fase estacionaria se utilizó una columna de intercambio iónico (HP-Aminex 87-C [7.8 mm x 300 mm] Bio Rad, Philadelphia, EE. UU.) a 75°C y como fase móvil se utilizó agua grado HPLC (Fermont®), México) con flujo de 0.5 mL/min y tiempo de corrida por muestra de 20 min. Los carbohidratos se identificaron por comparación con tiempos de retención con los estándares de referencia (Godínez-Hernández *et al.*, 2016c).

2.7. Estimación del grado de polimerización por HPLC-SEC

El perfil de distribución del peso molecular y grado de polimerización promedio (GPP) basado en su longitud de cadena fue estimado mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño (HPLC-SEC) y por medio de un equipo HPLC Waters-E2695 (Massachusetts, EE.UU.) acoplado a un detector con índice de refracción (RI-2414). Como fase estacionaria se utilizó una precolumna y columna Ultrahydrogel™ DP 120 A (7.8 mm x 300 mm) a 61.7 °C y con una amplitud de exclusión de tamaño de 100 a 5000 KDa (Waters, Massachusetts, EE.UU.). La fase móvil fue agua HPLC tridestilada, filtrada (con membranas de polisulfona de 0.45 µm) y acidificada con ácido fosfórico a pH=4.5-5, con un flujo de 0.36 mL/min (Moreno-Vilet *et al.*, 2017). Para el control del funcionamiento del sistema y el análisis de datos se utilizó la ChemStation con el software Agilent OpenLAB. El cálculo del peso molecular promedio en número (Mn), peso molecular promedio en peso (Mw), índice de dispersidad (D), número promedio del grado de polimerización de fructanos (GPn) y peso promedio del grado de polimerización de fructanos (GPw) se realizó con las fórmulas detalladas por Moreno-Vilet *et al.* (2017). Todos los análisis fueron llevados a cabo por triplicado y los resultados se presentan en promedios con su desviación estándar ($X \pm DE$).

3

Resultados y discusión

3.1. Rendimiento de fructanos

Respecto a la morfología de las cabezas de ASE y ATE en MFP se obtuvieron aspectos totalmente opuestos, ASE fue de mayor tamaño (79.90 kg), con menor número de pencas y más succulentas, y ATE fue de menor tamaño (44.20 kg) y con mayor número de pencas y menos succulentas.

La proporción de tallo respecto de su cabeza fue 8.30 y 22% para ASE y ATE respectivamente, de los cuales se obtuvo un volumen de jugo (JP + JS) de 4.01 para ASE y de 5.5 L para ATE, del cual se generaron por secado en promedio por tallo 976.50 g y 1611.60 g respectivamente de concentrado de fructanos con el proceso completo de extracción (**Cuadro 3.1**).

Los resultados mostrados en el presente trabajo confirman los obtenidos por Godínez-Hernández *et al.*,(2016b; 2016c) sobre el rendimiento de fructanos obtenidos de tallos de ASE y ATE en MFO y proceso de extracción similar, y la estimación indirecta de que ASE contiene en base seca aproximadamente sólo la mitad de azúcares fermentables que ATE (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001). La mayor proporción del tallo y al ser una especie conocida por su riqueza en carbohidratos ATE es superior en el rendimiento de fructanos que ASE.

Cuadro 3.1: Rendimiento de concentrado de fructanos de tallos de agave en madurez fisiológica óptima

Variable	ASE	ATE
Peso de la cabeza fresca (kg)	79.90 ± 21.30	44.20 ± 14.00
Peso del tallo fresco (kg)	6.70 ± 2.10	9.80 ± 3.30
Concentrado de fructanos (g)	976.50 ± 235.90	1611.60 ± 630.50

ASE: Fructanos de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck , **ATE:** Fructanos de *A. tequilana* F.A.C. Weber. Media ± DE (n= 6).

3.2. Identificación cualitativa de carbohidratos por HPTLC

El perfil de bandas generado por el análisis cromatográfico de las muestras de fructanos y FOS (**Figura 3.1**) evidencia que todas tienen nistosa, 1-kestosa y sacarosa. En la parte inferior de la cromatoplaça se observan los fructanos con GP>10 como una banda oscura.

Se confirmó que la muestra de inulina comercial (carril 8) es una mezcla de FOS y fructanos. En las muestras de fructanos de tallos independientes de ATE (carriles 10-13) y de ASE (carriles 15-18) se observan componentes similares, como se esperaba al ser especies del mismo género y extraídos de la misma forma.

En los fructanos obtenidos a partir del JS de cada especie de maguey (carriles 14 para ATE y 19 para ASE) se presentó en la parte superior de la cromatoplaça una banda intensa color marrón (fructosa), en contraste con la muestra de fructanos extraídos del JP. Esto sugiere que en el proceso de extracción establecido por Godínez-Hernández *et al.* (2016c), la manipulación del bagazo podría hidrolizar una parte de los fructanos; sin embargo, la cantidad de fructosa que se registra en el JS es mucho menor que en los fructanos industriales de ATC (carril 9), extraídos normalmente de cabezas, con las bases foliares enriquecidas en sacáridos. Esta técnica es una prueba básica y rápida de barrido para discriminar entre fructanos de agave y achicoria, así también para evaluar su calidad comercial (Alvarado *et al.*, 2014).

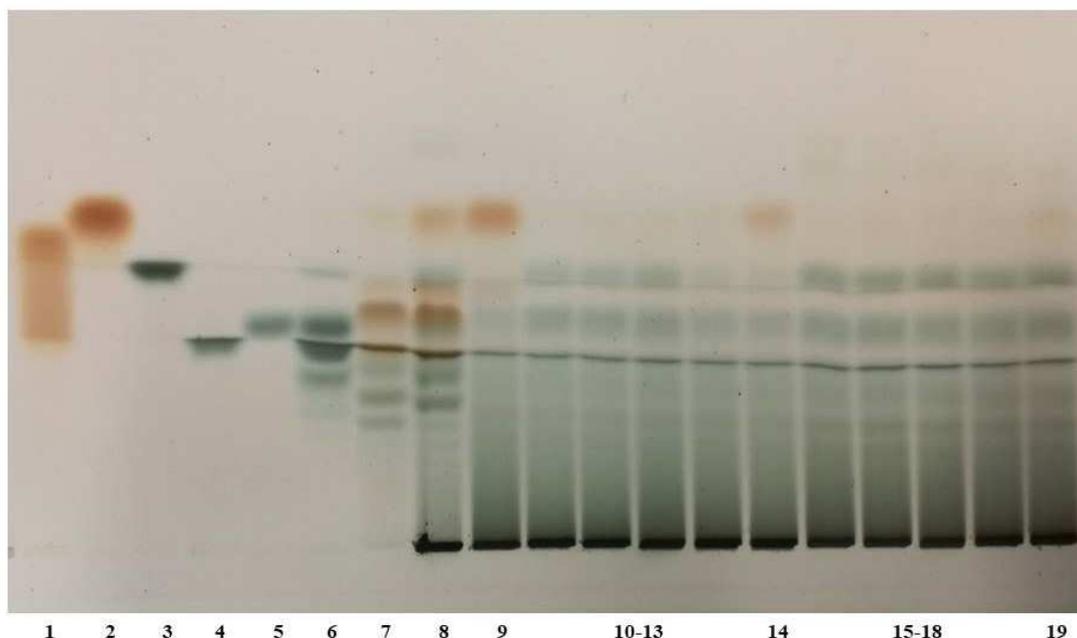


Figura 3.1: Cromatoplaqa de muestras de estándares de referencia y de fructanos **1:** glucosa, **2:** fructosa, **3:** sacarosa, **4:** nistosa (GP=4), **5:** 1-kestosa (GP=3), **6:** FOS de *A. tequilana*, **7:** FOS de achicoria, **8:** inulina comercial, **9:** fructanos comerciales de *A. tequilana*, **10-13:** fructanos de tallos de *A. tequilana*, **14:** fructanos de jugo secundario de *A. tequilana*, **15-18:** fructanos de tallos de *A. salmiana*, **19:** fructanos de jugo secundario de *A. salmiana*

3.3. Cuantificación de carbohidratos por HPLC y cenizas

En el **Cuadro 3.2** se resumen los resultados de la cuantificación de carbohidratos por HPLC y cenizas totales. El porcentaje de fructanos con GP>4 fue de 94.3, 92.3, 88.9 y 81.5 para ATC, ATE, ASE e IC; y el porcentaje de FOS (GP 3 a 10) fue 20.56, 6.52, 4.02 y 3.17 para IC, ASE, ATC, ATE, respectivamente. En el caso de la inulina comercial se comprobó que es una mezcla de compuestos con alto y con bajo grado de polimerización. En cuanto a los fructanos de agaves, destacó su mayor contenido de fructanos con GP>4, y su menor porcentaje 1-kestosa que los fructanos de achicoria. En estudios previos con la misma metodología se obtuvieron resultados para ASE (Godínez-Hernández *et al.*, 2016c; Godínez-Hernández, 2017) y para ATE (Godínez-Hernández *et al.*, 2016b) concordantes con los obtenidos en el presente estudio, con lo cual se confirman estos resultados.

Cuadro 3.2: Composición química (mg/g de CF base seca) de los fructanos de diferentes fuentes

Compuestos	TR (min)	IC	ATC	ATE	ASE
("Inulina") GP>4	7.74	815.65 ± 72.89	943.31 ± 26.82	923.29 ± 37.01	889.92 ± 44.79
1-Kestosa	8.62	118.64 ± 25.56	12.51 ± 5.79	14.08 ± 5.26	23.56 ± 4.72
Sacarosa	9.62	39.49 ± 3.10	6.39 ± 0.48	10.99 ± 5.28	32.63 ± 8.82
Glucosa	11.65	29.89 ± 7.21	2.34 ± 1.55	2.91 ± 1.33	3.58 ± 0.72
Fructosa	15.85	18.45 ± 9.43	19.53 ± 9.44	3.93 ± 0.86	5.50 ± 1.98
CH solubles (%)	-	98.45	98.09	95.52	95.77
Cenizas (%)	-	0.20	1.03	1.94	2.47

CF:Concentrado de fructanos, TR:Tiempo de retención,IC: Inulina comercial, ATC: Fructanos comerciales de *A. tequilana*, ATE: Fructanos de *A. tequilana* F.A.C. Weber, ASE: Fructanos de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, CH:carbohidratos. Media ± DE; n=6

El CF de tallos de plantas en MFP y con un método simple de extracción los fructanos >4GP en ASE y ATE fueron superiores a 800 mg/g de materia seca de los fructanos y a los reportados por Mancilla Margalli y López (2006) para distintas especies de maguey (360-740 mg/g MS) extraídos con etanol; y similares a los fructanos comerciales de IC y de ATC que se extraen de manera industrial. En cuanto al contenido de fructosa ASE y ATE fue inferior al rango al reportado por Mancilla Margalli y López (2006), 40-130 mg/g MS, para varias especies de maguey, probablemente se deba a la imprecisión de la madurez cronológica utilizada.

El proceso industrial actual para la producción de fructanos de Agave implica la incorporación de origen de sustancias indeseables presentes en las bases foliares; por ello, se incluyen etapas de purificación y desmineralización. Es posible que a esto se deba su mayor contenido de carbohidratos solubles (98.45% en IC y 98.09% en ATC) que el registrado para los fructanos experimentales (95.77% en ASE y 95.52% en ATE). La misma explicación valdría para el porcentaje de cenizas mayor en los fructanos obtenidos en el laboratorio (2.47 en ASE y 1.94 en ATE) que en los comerciales (1.03 en ATC y 0.20 en IC).

3.4. Estimación del grado de polimerización por HPLC-SEC

La estimación del grado de polimerización por HPLC-SEC (**Cuadro 3.3**) y la caracterización del perfil de distribución (**Figura 3.2**) evidencian que la inulina comercial es una mezcla de fructanos con $GP > 10$ (51.75 %) y de FOS con GP entre 3 y 10 (43 %), grado de polimerización promedio (GPP) de 14.46 e índice de polidispersión (D) de 1.63. En cuanto a peso molecular no se encontró tendencia alguna entre los diferentes fructanos evaluados.

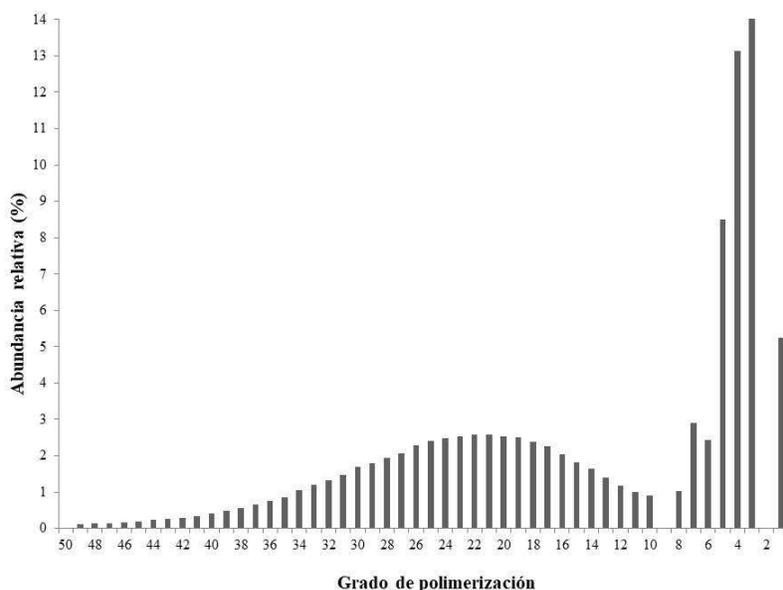


Figura 3.2: Distribución del grado de polimerización de Inulina comercial (Sinergy 1®) obtenida con HPLC-SEC

Moreno-Vilet *et al.* (2017) encontraron un GPP de 18.19 en los fructanos de cabezas de *A. tequilana* con 6 años de plantado, una distribución de 76.48 % de $GP > 10$, 17.9 % de FOS y 5.63 % de monosacáridos; y en cabezas con 4 años de plantado el GPP fue de sólo 14.48, $GP > 10$ 58.95 %, con 33.58 % de FOS y 7.48 % de monosacáridos. Dichos autores (Moreno-Vilet *et al.*, 2017) también evaluaron los fructanos de dos productos diferentes y encontraron las siguientes diferencias entre ellos: GPP de 14.98 y 19.49, $GP > 10$ de 64.94 y 76.62 %, y FOS de 26.36 y 17.52 %, y contenido de monosacáridos de 8.71 y 5.86 %.

Estos resultados evidencian la heterogeneidad del GPP que se encuentra en los lotes de fructanos comerciales de *A. tequilana*, debido a la notable variación en madurez fisiológica de la materia prima elegida por su madurez cronológica.

En los fructanos de tallos con similar MFO (quiotillos) de ASE (**Cuadro 3.3**) se registró el menor porcentaje (0.7%) de sacáridos libres (sacarosa, glucosa y fructosa) de todos los fructanos evaluados, un GPP de 16.2 y la proporción de fructanos con GP > 10 fue 73.2% y el de FOS 26.1%. Estas estimaciones confirman los resultados de Godínez-Hernández (2017) para la misma especie y procesada con igual enfoque metodológico pero discrepa de los resultados de Michel-Cuello *et al.* (2008) para esta misma especie (GPP de 8); esta discrepancia es atribuible a las diferencias en el método de extracción y en el órgano utilizado para su extracción (cabeza completa).

Según López *et al.* (2003), el GP de los fructanos de *A. tequilana* oscila entre 3 y 29 unidades. Por su parte Mancilla Margalli y López (2006) estimaron el GPP de diversas especies del género *Agave* distribuidas en México con edad cronológica similar (años de la plantación) y presentan valores para *A. tequilana* de Jalisco (18.12) y de Guanajuato (7.13), para *A. angustifolia* de Oaxaca (31.75) y de Sonora (13.07), *A. potatorum* (15.34) y *A. cantala* (11.17) de Oaxaca y *A. fourcroydes* (6.66) de Yucatán.

De acuerdo con Montañez-Soto *et al.* (2011), el tamaño promedio de las moléculas de fructanos es menor en las puntas de las hojas de *A. tequilana* y se incrementa hacia sus bases, donde alcanzan su tamaño máximo (GPP 25.75), sin embargo las pencas son órganos con funciones metabólicas totalmente distintas a las del tallo, por lo cual, el contenido de fructanos y el GP que pudiera existir en las bases de las pencas es mucho menor que el que existe en el tallo; según estos autores dichas diferencias en GPP pueden deberse también a la edad de la planta, las condiciones de cultivo, así como a la metodología empleada para su identificación y cuantificación. Este último punto lo evidenciaron Moreno-Vilet *et al.* (2019) al encontrar diferencias en la distribución del peso molecular de diversos fructanos de agave con HPLC-SEC o con MALDI-ToF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry).

Cuadro 3.3: Distribución de peso molecular (g/mol), polimerización y contenido de azúcares de diferentes tipos de fructanos

Fructano	Mn	Mw	GPn	GPw	D	GP >10 (%)	GP 3-10 (%)	Mono y disacáridos (%)
IC	2362.13 ± 16.78	3866.34 ± 17.99	14.46 ± 0.10	23.74 ± 0.11	1.63 ± 0.00	51.75 ± 0.34	43.00 ± 0.37	5.26 ± 0.04
ATC	2976.58 ± 29.93	3992.79 ± 14.71	18.25 ± 0.18	24.52 ± 0.08	1.35 ± 0.01	75.25 ± 0.76	16.19 ± 0.47	8.56 ± 0.30
ATE	3439.32 ± 26.73	4258.69 ± 22.99	21.11 ± 0.16	26.16 ± 0.14	1.24 ± 0.01	83.74 ± 0.92	14.12 ± 0.26	2.14 ± 0.77
ASE	2651.10 ± 49.77	3459.50 ± 135.91	16.20 ± 0.31	21.20 ± 0.84	1.30 ± 0.03	73.20 ± 0.47	26.10 ± 0.87	0.70 ± 0.41

IC: Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos de *A. tequilana*, **ASE:** Fructanos de *A. salmiana*. **Mn:** Peso molecular medio en número; **Mw:** Peso molecular medio en peso; **GPn:** Grado de polimerización promedio en número; **GPw:** Grado de polimerización promedio en peso; **D:**Dispersidad. Media ± DE, n= 6.

Los fructanos ATC presentaron mayor proporción de mono y disacáridos (8.56 %) . En efecto, Alvarado *et al.* (2014), en tres marcas de fructanos comerciales de la misma especie, registraron entre 3.1 y 7.5 % de mono y disacáridos, lo cual evidencia la heterogeneidad al respecto en los fructanos del mercado. Cabe resaltar que al utilizar exclusivamente el tallo del maguey de ATE como materia prima para la extracción de sus fructanos, se reduce el porcentaje de azúcares libres (2.14 %), sin necesidad de añadir etapas de purificación al proceso, como sucede con las marcas comerciales.

En el presente estudio se documenta por primera vez que los fructanos extraídos sin refinamientos de los tallos de *A. tequilana* y con MFO (ATE) tienen un GPP de 21.11, y una proporción de fructanos con GP>10 de 84 % y de FOS 14.12 % ; en contraste, los fructanos comerciales de *A. tequilana* (ATC) presentaron GPP de 18.25, proporción de fructanos con GP>10 de 75 % y de FOS 16.19 % (**Figura 3.3**).

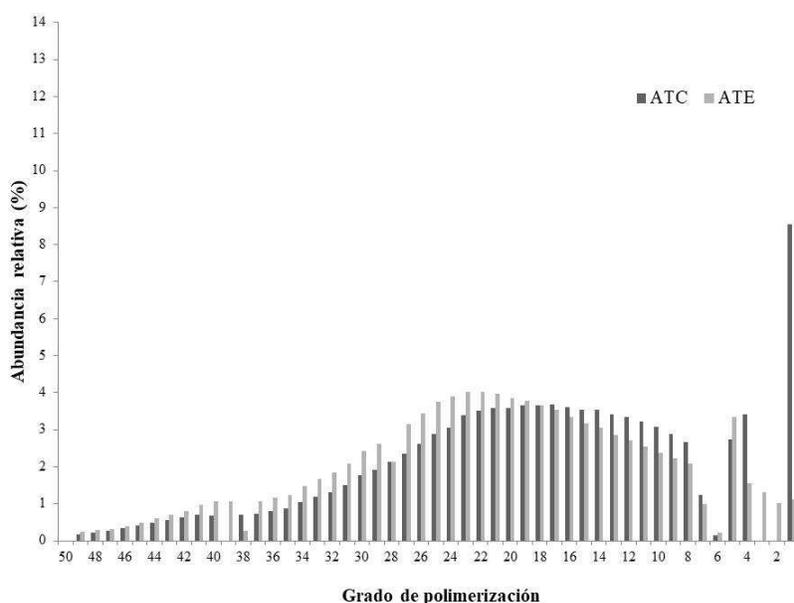


Figura 3.3: Distribución del grado de polimerización de fructanos de *A. tequilana* comerciales (ATC) y extraídos en laboratorio (ATE) obtenida con HPLC-SEC.

Al comparar los fructanos derivados de tallos de *A. salmiana* y *A. tequilana* en similar MFO e igual proceso de extracción (**Figura 3.4**), la proporción de fructanos con GP>10 fue de 83.74 % y de 73.2 % para ATE y ASE respectivamente, y de FOS fue 26.1 % y 14.2 % para ASE y ATE, respectivamente. Ambos tipos de fructanos extraídos en el laboratorio

presentaron menor proporción de monosacáridos que los fructanos comerciales de ATC, lo cual podría deberse a una menor hidrólisis con la extracción en el laboratorio, pero es más claro que fue debido al uso exclusivo del tallo del maguey como materia prima para su extracción, pues con ello se evita la contribución de sacáridos de las bases de penca al extracto.

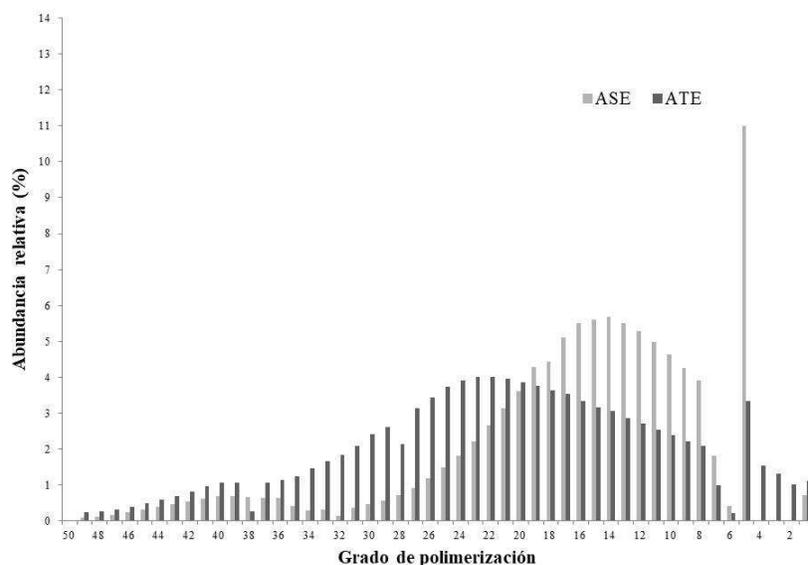


Figura 3.4: Distribución del grado de polimerización de fructanos de *A. salmiana* (ASE) y *A. tequilana* (ATE) extraídos en laboratorio (en MFO y con extracción sin refinamiento) obtenida con HPLC-SEC.

La NOM-002-SAGARPA-2016 (SAGARPA, 2016) establece un límite máximo de 5 % de sacarosa, 6 % de glucosa y 9 % de fructosa en los fructanos comerciales; así se permite 20 % como valor máximo de azúcares de bajo peso molecular en los fructanos comerciales, por lo que todas las muestras evaluadas cumplen con dicha normativa bastante laxa.

El GP de los fructanos de tallos con MFO de ATE fue superior (21) al de ASE (16) incluso que ATC, bajo las mismas condiciones de extracción y análisis, además de ser superior en el rendimiento presenta ventajas sustanciales en cuanto al contenido de fructanos por kg de materia prima. Estas dos especies son importantes a nivel nacional, ATE es la especie que mayormente se cultiva en México para la producción de tequila y ASE es la especie silvestre de mayor distribución en el territorio mexicano y ambas se

han estudiado para múltiples propósitos como aguardientes, jarabe de maguey, fructanos, entre otros.

Si bien la metodología HPLC-SEC había resultado adecuada para la obtención del GPP y del perfil de distribución de peso molecular de diversas fuentes de fructanos (Moreno-Vilet *et al.*, 2017), también resultó ser una herramienta robusta para distinguir los fructanos estandarizados de *A. salmiana* de los de *A. tequilana*, por lo que podría ser utilizada para caracterizar los fructanos de diversas especies de maguey, aunque su reproducibilidad analítica dependerá de que los magueyes sean elegidos con similar MFO, como lo realizado en este estudio.

En la actualidad hay gran interés por fraccionar los fructanos de acuerdo con su GP, para añadir las fracciones a diversos productos alimentarios y para realizar evaluaciones biológicas por sus diferencias fisicoquímicas y tecnofuncionales (García Gamboa *et al.*, 2018). Sin embargo, utilizar el concentrado de fructanos íntegro para evaluaciones analíticas y biológicas, es decir, sin separaciones ni purificaciones, puede ser un método práctico y escalable también válido para la industria alimentaria. A la vez, en las evaluaciones biológicas experimentales con los fructanos íntegros o naturales se tendría una mezcla compleja de diferentes longitudes de cadena, propias de la síntesis metabólica de la planta, las cuales podrían ejercer beneficios en el organismo complementarios entre sí, con la ventaja de ofrecer una mayor diversidad de sustratos fermentables para el amplio consorcio de bacterias colónicas, y posiblemente una mayor diversidad de respuestas fisiológicas en el organismo.

Las diferencias muy marcadas en el GP registrado en los fructanos de Agave han sido atribuidas a factores abióticos que repercuten en el crecimiento del maguey en las regiones propias de cada especie (Mancilla Margalli y López, 2006). Es razonable que existan diferencias entre especies, aunque compartan el mismo ambiente; sin embargo, los cambios en composición que sufre una planta de maguey durante un ciclo de vida son de mucha mayor magnitud que los que pueden deberse a factores climáticos estacionales o de más corto plazo. Por ello se debe recurrir al concepto de MFO para estandarizar la composición de la materia prima y considerar sólo a los tallos para su extracción y con ello evitar la contaminación de los extractos con mono y disacáridos y otras sustancias indeseables. Así, la supuesta edad de la planta, que en realidad se refiere al tiempo que ha estado plantada, debe descartarse como criterio de madurez, pues además es inaplicable a poblaciones silvestres (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; Godínez-Hernández, 2017).

4

Conclusión

La elección de magueyes en MFO, el uso exclusivo de sus tallos y la extracción orgánica, permiten la cosecha (cultivada) o recolección (silvestre) de materia prima estandarizada, para la producción de fructanos con la mayor concentración y calidad, y con GP homogéneo, reproducible y propio de cada especie. Se confirmó que el GP para *Agave salmiana* es 16 y se presenta por primera vez un GP de 21 para *A. tequilana*.

Conflicto de intereses

No hay conflicto de intereses que declarar.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca doctoral otorgada. A la Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves (AGARED) por el apoyo del plan de movilidad 2017. Megafarma S.A. de C.V. proporcionó amablemente la inulina para el estudio. Al Ing. Manuel Pérez y a Don Fernando Rodríguez y David Rodríguez trabajadores de la fábrica de mezcal Laguna Seca.

Referencias citadas

- Aguirre-Rivera, J. R., Charcas-Salazar, H. F., Flores-Flores, J. L., 2001. El Maguey Mezcalero Potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, San Luis Potosí S. L. P., México, p. 78.
- Aires-Barros, M., Azevedo, A., 2017. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Foundations of Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, Cap. Fundamentals of biological separation processes, pp. 187–237.
- Alvarado, C., Camacho, R., Cejas, J., Rodríguez, J., 2014. Profiling of commercial agave fructooligosaccharides using ultrafiltration and high performance thin layer chromatography. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13 (2), 417–427.
URL <https://www.researchgate.net/publication/275889622>
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., Monsan, P., 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry* 122 (1), 123–130.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.028>
- Babb, V. M., Haigler, C. H., 2001. Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high-rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems. *Plant Physiology* 127, 1234–1242.
URL <https://doi.org/10.1104/pp.010424>
- Camacho Ruíz, R. M., 2016. Fructanos de Agave. Retos en la estandarización. *Tecnoagave* (41), 62–63.
- Claassen, P. A. M., Budde, M. A. W., de Ruyter, H. J., Van Calker, M. H., Van Es, A., 1991. Potential role of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase in carbohydrate metabolism of cold stored tubers of *Solanum tuberosum* cv Bintje. *Plant Physiology* 95 (4), 1243–1249.
URL <https://doi.org/10.1104/pp.95.4.1243>

- García Gamboa, R., Ortíz Basurto, R. I., Calderón Santoyo, M., Bravo Madrigal, J., Ruiz Álvarez, B. E., González Ávila, M., 2018. *In vitro* evaluation of prebiotic activity, pathogen inhibition and enzymatic metabolism of intestinal bacteria in the presence of fructans extracted from agave: A comparison based on polymerization degree. *LWT - Food Science and Technology* 92, 380–387.
URL <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.051>
- Godínez-Hernández, C. I., 2017. Estudios sobre los subproductos de la elaboración del mezcal, y usos alternativos del maguey. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí S. L. P., México, p.116.
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez Flores, B. I., 2016a. Importancia creciente de los fructanos del maguey. Retos y perspectivas. *Tecnoagave* 40 (5), 26–29.
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez Flores, B. I., 2016b. Yield and composition of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *A. tequilana* F.A.C. Weber fructans. CONACyT/CIATEJ/AGARED, Guadalajara, Jalisco, México, Cap. 2. Biological effects of Agave fructans and other by-products, pp. 153–157.
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., Becerra-Jiménez, J., 2016c. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 22 (1), 59–72.
URL <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>
- Kaur, N., Gupta, A. K., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* 27 (7), 703–714.
- Livingston, D. P., Chatterton, N. J., Harrison, P. A., 1993. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytol* 123, 725–734.
URL <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03783.x>
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., Mendoza-Díaz, G., 2003. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (27), 7835–7840.
URL <http://doi.org/10.1021/jf030383v>
- Madrigal, L., Sangronis, E., 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57 (4), 387–394.

- Mancilla Margalli, N. A., López, M. G., 2006. Water soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (20), 7832–7839.
URL <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Michel-Cuello, C., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., Pinos-Rodríguez, J. M., 2008. Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of mezcal agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (14), 5753–5757.
URL <https://doi.org/10.1021/jf800158p>
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., Ramos-Ramírez, E., 2011. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro* 23 (3), 199–206.
- Moreno-Vilet, L., Bostyn, S., Flores-Montaño, J. L., Camacho-Ruiz, R. M., 2017. Size-exclusion chromatography (HPLC-SEC) technique optimization by simplex method to estimate molecular weight distribution of agave fructans. *Food Chemistry* 237, 833–840.
URL <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.020>
- Moreno-Vilet, L., Bostyn, S., Flores-Montaño, J. L., Camacho-Ruiz, R. M., 2019. Comparative data of molecular weight distribution of agave fructans fractions using MALDI-ToF and HPLC-SEC. *Data in Brief* 24, 1–6.
URL <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103984>
- Olvera, C., Castillo, E., López-Munguía, A., 2007. Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Bioteología* 14, 327–346.
- Pollock, C. J., 1986. Tansley Review No. 5 Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytol* 104, 1–24.
URL <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00629.x>
- Pollock, C. J., Cairns, A. J., 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 77–101.
- Pollock, C. J., Jones, T., 1979. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytol* 83, 9–15.
URL <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1979.tb00720.x>

- Reynoso Ponce, H., Grajales Lagunes, A., Castillo Andrade, A., González García, R., Ruiz Cabrera, M. A., 2017. Integration of nanofiltration and spray drying processes for enhancing the purity of powdered fructans from *Agave salmiana* juice. *Powder Technology* 322, 96–105.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2017.09.003>
- Ronkart, S. N., Blecker, C. S., Fourmanoir, H., Fougnes, C., Deroanne, C., Van Herck, J.-C., Paquot, M., 2007. Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta* 604 (1), 81–87.
URL <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.073>
- SAGARPA, 2016. Norma Oficial Mexicana (NOM-002-SAGARPA-2016): Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de Agave. Reporte técnico, Diario Oficial de la Federación, 3ra Sección (2016, 2 de Diciembre). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Van Arkel, J., Sévenier, R., Hakkert, J. C., Bouwmeester, H. J., Koops, A. J., Van Der Meer, I. M., 2014. Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, Cap. 2. Fructan biosynthesis regulation and the production of tailor-made fructan in plants, pp. 5–22.
- Wang, N., Nobel, P. S., 1998. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology* 116 (2), 709–714.
URL <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.709>

Capítulo II

Efectos de fructanos de maguey, inulina y almidón sobre
componentes del síndrome metabólico en ratas Wistar sanas

Abstract

The consumption of prebiotics has been increased due to its benefits on metabolism, body composition and gut microbiota. Therefore, some physiological effects were evaluated for 20 weeks in healthy Wistar rats supplemented (10%) with rice starch (RS), commercial chicory fructans (I) and *Agave tequilana* (ATC) and fructans extracted from stems of *A. salmiana* (AS) and *A. tequilana* (ATE) with optimal physiological maturity (OPM). Food consumption was maintained during the experimental period with no difference between treatments, but with I the body weight and abdominal adipose tissue decreased significantly at the end of the experiment. Serum concentrations of glucose, total cholesterol and triglyceride remained within the reference limits without statistical differences between fructans. Supplementation with maguery and chicory fructans significantly increased the cecal content; at the same time, it favored bowel emptying and improved stool consistency. Also, this supplementation was innocuous for the liver and the intestinal tract and instead an increase of intracellular mucin was observed in the cryptic pits of the colonocytes. The AS treatment kept the genus *Lactobacillus* in abundance similar to treatment I, but greater than ATC and ATE, also caused the greater fecal microbial diversity. In general, the supplementation with intact fructans of *A. salmiana* and *A. tequilana* in healthy animals, produced beneficial effects similar to those generated by inulin.

Key words: *Agave fructans, adipose tissue, serum variables, intestinal microbiota, colon and liver histology*

Resumen

El consumo de prebióticos se ha incrementado por sus beneficios sobre el metabolismo, la composición corporal y la microbiota intestinal. Por ello, se evaluaron durante 20 semanas algunos efectos fisiológicos en ratas Wistar sanas suplementadas (10%) con almidón de arroz (A), fructanos comerciales de achicoria (I) y de *Agave tequilana* (ATC) y fructanos extraídos de tallos de *A. salmiana* (AS) y *A. tequilana* (ATE) con madurez fisiológica óptima (MFO). El consumo de alimento se mantuvo durante el periodo experimental sin diferencia entre tratamientos, pero con I el peso corporal y tejido adiposo abdominal disminuyó significativamente al finalizar el experimento. Las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total y triglicéridos se mantuvieron dentro de los límites de referencia sin diferencias estadísticas entre fructanos. La suplementación con fructanos de maguey y de achicoria incrementó significativamente el contenido cecal; a la vez, favoreció el vaciado intestinal y mejoró la consistencia de las heces. También, esta suplementación resultó inocua para el hígado y para el tracto intestinal y en cambio se observó un incremento de mucina intracelular en las fosas crípticas de los colonocitos. El tratamiento AS mantuvo al género *Lactobacillus* en abundancia similar que el tratamiento I, pero mayor que ATC y ATE, además provocó la mayor diversidad microbiana fecal. En general, la suplementación con fructanos íntegros de *A. salmiana* y *A. tequilana* en animales sanos, produjo efectos benéficos similares a los generados por la inulina.

Palabras clave: *Fructanos de Agave, tejido adiposo, variables séricas, microbiota intestinal, histología del colon y hepática*

5

Introducción

El consumo de alimentos funcionales se ha incrementado recientemente para mejorar el metabolismo, la composición corporal y la microbiota intestinal (Siró *et al.*, 2008; D'Argenio y Salvatore, 2015). Dentro de los alimentos funcionales los prebióticos destacan por ser sustratos selectivamente utilizados por los microorganismos benéficos para la salud (Gibson y Roberfroid, 1995; Gibson *et al.*, 2017). Los prebióticos más utilizados son carbohidratos fermentables, como los fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), almidón resistente, así como fructanos obtenidos de la patata (*Helianthus tuberosus* L.), las dalias (*Dahlia* spp.) y principalmente de la achicoria (*Cichorium intybus* L.) (Van Arkel *et al.*, 2014).

Los fructanos de achicoria (inulina) son ampliamente usados por la industria alimentaria por sus propiedades fisicoquímicas y propiedades funcionales. Estos fructanos rutinariamente incluidos en la dieta, provocan beneficios a la salud (Flamm *et al.*, 2001; Roberfroid *et al.*, 2010), principalmente como prebióticos (Mueller *et al.*, 2016), además disminuyen el tejido adiposo abdominal y la concentración plasmática de glucosa y colesterol, ya que mejoran el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos (Luo *et al.*, 1996; Delzenne y Kok, 1998). Por razones históricas la inulina y los FOS que se obtienen de su hidrólisis parcial son los fructanos actualmente más utilizados, estudiados y demandados en nivel global por la industria alimentaria. La industria alimentaria de México importa toda la inulina que requiere, pues la achicoria no se produce en este país (Godínez-Hernández *et al.*, 2016a). A mediados del siglo pasado se descubrió que los magueyes (*Agave* spp.) contienen fructanos como polisacáridos de reserva (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953). El consumo cotidiano de los fructanos presentes en los magueyes (escapo floral, hojas y tallo) es prehistórico (Fish *et al.*, 1985; Leach, 2007; Leach y Sobolik, 2010) ya que fueron de las principales plantas aprovechadas por los primeros pobladores de Aridoamérica para alimentarse y su uso pervive en México desde hace más que diez mil años (Gentry, 1998; García Mendoza, 2007).

Los fructanos se almacenan en el tallo de los magueyes hasta antes de la aparición del escape floral o "quiate", este estadio se considera como la madurez fisiológica óptima (MFO) para su extracción y se reconoce en el campo por el adelgazamiento de la base del cogollo y porque su espina central está por debajo de las espinas de las hojas ya desplegadas (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001). Los fructanos de los magueyes tienen una estructura química compleja (López *et al.*, 2003) con enlaces principalmente β (2-1) entre los monómeros que lo conforman, por ello resisten la hidrólisis enzimática del tracto gastrointestinal superior de los humanos y llegan intactos al colon donde son fermentados por la microbiota residente, en contraste con la estructura de polisacáridos como el almidón que tiene en su estructura enlaces α y que el sistema gastrointestinal degrada de manera inmediata tras su ingestión (Flamm *et al.*, 2001). Además los fructanos de magueyes han demostrado poseer propiedades tecnológicas favorables para formular alimentos industrializados (Crispín-Isidro *et al.*, 2015; González Herrera *et al.*, 2015; Sosa-Herrera y Delgado-Reyes, 2016) y efectos biológicos benéficos para el organismo (Urías-Silvas *et al.*, 2008; Márquez-Aguirre *et al.*, 2013; Moreno-Vilet *et al.*, 2014; Márquez-Aguirre *et al.*, 2016). Por ello, su uso como ingrediente de diversos productos alimentarios es una alternativa altamente competitiva al de los fructanos de achicoria (Godínez-Hernández *et al.*, 2016a).

Actualmente, los fructanos comerciales de maguey se obtienen de *Agave tequilana* F.A.C. Weber, pero esta especie también es utilizada para la producción de aguardientes; así, cabe explorar otras especies de magueyes abundantes y subutilizados, como *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Gentry, 1998; Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; López *et al.*, 2003).

Con base en lo precedente, el objetivo del presente estudio fue comparar los efectos del almidón de arroz, fructanos comerciales (de achicoria y de *A. tequilana*) y fructanos de tallos de *A. salmiana* y *A. tequilana* en similar MFO y método de extracción, sobre las principales poblaciones bacterianas, metabolismo, histología hepática y del colon y tejido adiposo abdominal de ratas Wistar sanas.

6

Materiales y métodos

6.1. Polisacáridos probados

Los polisacáridos comerciales usados fueron inulina o fructanos de achicoria (*C. intybus*) (Orafti ® Synergy ¹, Tienen, Bélgica), fructanos comerciales de *A. tequilana* (Inufib™, Jalisco, México) y almidón de arroz (Tres Estrellas®), Toluca, México). Además, como polisacáridos obtenidos en el laboratorio, no comerciales, se usaron fructanos de *A. salmiana* y *A. tequilana* extraídos de los tallos de seis individuos en MFO procedentes de la región de Charcas, S.L.P. y Arandas, Jalisco, respectivamente y procesados de acuerdo con el método desarrollado por Godínez-Hernández *et al.* (2016c).

6.2. Modelo animal

Se utilizaron ratas macho Wistar de dos meses de edad, con un peso entre 200-250 g, generadas por el Centro de Biociencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Cada rata se tomó como una unidad experimental y se les mantuvo en cajas de polipropileno individuales, situadas en una habitación acondicionada para ello en el IIZD, donde la temperatura varió entre 20 y 25°C, y la humedad relativa entre 30 y 60 %, y el ciclo circadiano se ajustó a 12 h luz y 12 h oscuridad.

Los animales experimentales se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones éticas locales de cuidado y mantenimiento correspondientes (SAGARPA, 2001; Secretaría de Salud, 1984). El protocolo fue aprobado por el comité de ética (CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20160830) (**Ver en Anexo**).

Los animales se sometieron a un periodo de adaptación de una semana con una ración de 25 g *per cápita* de alimento estándar para roedores (Chow® 5008, Missouri, EE.UU.) y agua *ad libitum*. Posteriormente, se distribuyeron al azar en seis tratamientos

(n=9): alimento comercial (**C**) o 90 % de alimento comercial y 10 % de cada uno de los polisacáridos siguientes: inulina comercial (**I**), fructanos comerciales de *A. tequilana* (**ATC**), fructanos experimentales de *A. tequilana* (**ATE**) o de *A. salmiana* (**AS**) y almidón de arroz comercial (**A**). Los 25 g de alimento al día, con o sin suplementación, se administraron a cada unidad experimental al iniciar el periodo de oscuridad.

El periodo experimental duró 20 semanas; cada semana se registró el consumo neto de alimento y el cambio de peso corporal de los animales. Al finalizar el periodo experimental, los animales se sacrificaron con pentobarbital sódico (0.063 g/mL; SEDALPHARMA[®], Pet's Pharma, México) a una dosis de 40 mg/kg de peso por vía intraperitoneal; luego se disecó y pesó el tejido adiposo abdominal, se disecó el intestino y se tomaron muestras para los análisis histológicos.

6.3. Bioquímica de muestras séricas

Las muestras sanguíneas se obtuvieron mediante punción de la vena caudal de cada unidad experimental, al inicio y al final del experimento. Después de 12 h de ayuno, se extrajeron 600 µL de sangre completa; esta muestra se dejó 10 min en reposo y luego se centrifugó a 2500 rpm por 5 min a 20°C (Centra CL3-R, Thermo IEC, Texas, EE.UU.) para obtener el suero, el cual fue almacenado a -20°C hasta su análisis. Las variables evaluadas en este suero fueron glucosa, colesterol total, HDL y triglicéridos, para lo cual se utilizaron kits enzimáticos comerciales (Bayer, Sées, Francia) y un equipo semiautomatizado para análisis químicos (Excel[™], Stanbio, EE.UU.).

6.4. Variación del pH y microbiología de las heces

La variación mensual del pH (Hanna Instruments[®] pH 211, EE.UU.) de las heces durante el periodo experimental, se estimó en muestras de 1 g de heces frescas de cada unidad experimental, colocadas en tubos estériles y homogenizadas con 9 mL de solución salina estéril (0.85 %).

Para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias ácido lácticas (LAB) y enterobacterias por g de heces, se usó el método de Miles *et al.* (1938) modificado. Así, se realizaron diluciones seriadas de concentración, de 10³ hasta 10¹¹; posteriormente se colocaron 10 µL de cada dilución en medio bacteriológico sólido por triplicado. La identificación de las LAB se hizo con el medio Mann Rogosa Sharpe (Difco, EE.UU.) y se

incubó en jarras de anaerobiosis (Gas Pack™) a 37 °C por 48 h; para las enterobacterias se utilizó el medio Mc Conkey (Difco, EE.UU.) y se incubó a 37 °C por 48 h. Posteriormente se realizó el recuento de UFC/g en cada uno de los medios.

6.5. Extracción del ADN genómico

La extracción total de ADN genómico de las poblaciones de bacterias de las heces de ratas se basó en la metodología de Tannock *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Se colectaron heces al finalizar el periodo experimental en tubos estériles que se almacenaron a -60°C. Posteriormente, se descongeló la muestra a temperatura ambiente y se pesaron 200 mg que se resuspendieron con 1 mL de buffer de fosfatos estéril (0.1 M, pH=7). Se filtró la muestra con una gasa estéril y se colectaron 500 µL del filtrado, se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min (Labnet Spectrafuge™ 16 M, New Jersey, EE.UU.), posteriormente se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió con 200 µL de buffer de lisis (0.01 M). Se separó el pellet del tubo y se agitó en vórtex durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µL de SDS (dodecilsulfato sódico) al 20% (IBI Scientific, Iowa, EE.UU.) y 300 µL de acetato de sodio (0.82 mg/mL, pH=5) (Karal, SA de CV, Guanajuato, México), se agitó por 5 min, se añadieron 400 µL de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, pH=6.5-6.9) (IBI Scientific, Iowa, EE.UU.) y se mezcló por inmersión. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min. Se tomaron 400 µL del sobrenadante y se mezcló con 400 µL de cloroformo. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min. Se tomaron 200 µL del sobrenadante y se añadieron 200 µL de isopropanol frío y 40 µL de acetato de sodio, se mezcló por inmersión. Se incubó a -20°C durante 10 min, y posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min. Se decantó la solución y se secó el pellet obtenido a 50°C por 3 min (Accublock™ Digital Dry Bath, New Jersey, EE.UU.).

Al obtener el ADN, se resuspendió con 50 µL de agua inyectable estéril tibia. Se le agregó 1 µL de ARNasa A (5 mg/ml) (QIAGEN, Cat No.19101) y se incubó 1 hr a 37°C. La concentración del ADN fue determinada por absorbancia a 230 nm y la pureza fue estimada por la determinación del radio A260/A280 con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, EE.UU.) posteriormente todas las muestras fueron secadas a 40°C y se ajustaron a 500 ng para comparar la estructura y diversidad del microbioma bacteriano mediante la amplificación de un fragmento del gen ARNr 16S y secuenciación de alto rendimiento.

6.6. Amplificación por PCR y secuenciación del fragmento del gen bacteriano ARNr 16S

Las secuencias parciales de la región hipervariable del fragmento del gen 16S rRNA (V4 y V5) de la línea de base y el ADN de muestreo de heces final se amplificaron por PCR usando los cebadores 520 F (5'- AYTGGGGYDTAAAGNG-3 ') y 907 R (5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3 ') (Engelbrektson *et al.*, 2010) con dos ejecuciones de PCR según lo recomendado por Kaplan *et al.* (2019). La calidad denoising, la verificación de quimera y la agrupación de variantes de secuencia de amplicón (ASVs), un análogo de mayor resolución de la OTU tradicional, se realizó utilizando QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, por sus siglas en inglés) (Versión 2018.4-2018.8, <https://qiime2.org>) plugin DADA2 (Callahan *et al.*, 2016).

Las secuencias fueron asignadas a la taxonomía por un clasificador pre-entrenado *Naive Bayes* en la base de datos Silva 132 (Quast *et al.*, 2013). Después de la afiliación taxonómica, se filtraron las secuencias mitocondriales y cloroplásticas. La riqueza microbiana, que mide el número de taxones en cada muestra (abundancia de microbios), se determinó calculando el número de ASV observados. A semejanza, las medidas del número relativo de taxones en las muestras (la frecuencia de cada taxón se detectó en una muestra) se midió utilizando los índices de Shannon y Simpson. La preparación de los datos de la secuencia del microbioma se llevó a cabo utilizando el software R studio 1.1.419, los paquetes R Phyloseq 1.22.3 (McMurdie y Holmes, 2013) y Vegan 2.4-6 (Oksanen *et al.*, 2008).

6.7. Análisis histológico

Al finalizar el periodo experimental, el intestino completo se disecó, se midió la longitud del ciego al ano y se separó el colon; posteriormente los contenidos del ciego y del colon se pesaron; luego, el colon se enjuagó con solución salina estéril (0.85%), se le realizó una incisión longitudinal y se fijó en papel filtro con el lumen hacia el exterior. También, se extirpó una fracción cúbica del hígado, de aproximadamente 0.5 cm, y ambos tejidos fueron fijados en paraformaldehído (Sigma-Aldrich ®, Milwaukee, EE.UU.) al 10% en buffer de fosfatos. Después de la fijación, dichas muestras se deshidrataron con gradientes de alcohol-xilol, se incluyeron en parafina, se les hicieron cortes longitudinales de 6 µm, y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Estos tejidos se analizaron por microscopía

de campo claro a 40X (Olympus CellSens Entry, Olympus Corporation, Tokio, Japón), para registrar posibles cambios histológicos debidos a los tratamientos. En el colon se realizaron mediciones del diámetro de las fosas crípticas (FC) de la mucosa; en el tejido hepático se midieron los núcleos, pues la macronucleosis es un cambio reactivo que puede asociarse a toxicidad (Loredo Ramírez *et al.*, 1997).

6.8. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue con asignación completamente al azar de seis tratamientos, consistente en la suplementación alimentaria (10 %) con los cinco polisacáridos (I, ATC, ATE , AS y A) y sin suplementación (C), a nueve repeticiones, donde cada rata macho Wistar fue considerada como repetición o unidad experimental.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS versión 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, EE.UU.); con los datos se realizaron pruebas de normalidad, análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey.

Con las variables estimadas semanal y mensualmente se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo. A las variables con sólo una medición al finalizar el experimento se les hizo un análisis de varianza y comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey. El grado de significación de los datos se basó en una probabilidad $p < 0.05$.

7

Resultados y discusión

7.1. Consumo de alimento

El consumo neto de alimento se presenta en el **Cuadro 7.1** y **Figura 7.1**; no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. A la suplementación con inulina se le han atribuido efectos sacietógenos metabólicos (Delzenne y Kok, 1998; Cani *et al.*, 2004) y mecánicos, al modificar las propiedades reológicas y formar redes gelantes en los alimentos (Franck, 2002). Dichos efectos también han sido atribuidos a la suplementación de ratones sanos con fructanos de *A. tequilana* (Urías-Silvas *et al.*, 2008), de *A. angustifolia* y de *A. potatorum* (Santiago-García y López, 2014), al igual que en ratones obesos suplementados con fructanos de *A. tequilana* (Huazano García y López, 2015). Sin embargo, en los estudios antes mencionados el alimento se proporcionó *ad libitum* a los animales experimentales y en este trabajo el alimento estuvo permanentemente restringido a 25 g diarios para cada rata.

7.2. Cambios del peso corporal

Los resultados de evaluar el cambio de peso vivo por efecto de los tratamientos se resumen en la **Figura 7.2** y en el **Cuadro 7.1**. El incremento del peso solo fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al finalizar el experimento, específicamente entre el suplemento de almidón que generó el mayor peso final (514.50 g) y la inulina que produjo el menor peso final (466.20 g); con el resto de tratamientos y entre ellos mismos, los pesos finales fueron estadísticamente similares. Estos resultados sobre la disminución del peso corporal concuerdan con los obtenidos por Rozan *et al.* (2008) que suplementaron ratas con 10 % de inulina durante 27 semanas. Cabe señalar la ausencia de diferencias estadísticas en ganancia de peso (peso medio final-peso medio inicial) entre tratamientos (**Cuadro 7.1**).

Cuadro 7.1: Ingesta neta semanal de alimento y cambio de peso corporal (g)

Tratamientos	Ingesta basal	Ingesta final	Peso corporal basal	Peso corporal final	Ganancia de peso corporal
C	177.66 ^a	169.34 ^a	247.89 ^a	487.22 ^a	239.33 ^a
I	173.08 ^a	163.05 ^a	250.33 ^a	462.22 ^b	211.89 ^a
ATC	178.16 ^a	168.03 ^a	254.33 ^a	498.89 ^a	244.56 ^a
ATE	175.83 ^a	162.06 ^a	265.78 ^a	493.33 ^a	227.56 ^a
AS	171.22 ^a	169.49 ^a	268.56 ^a	484.44 ^a	215.89 ^a
A	177.52 ^a	163.70 ^a	260.10 ^a	514.50 ^a	254.40 ^a
EEM	1.75	4.53	8.44	11.80	10.74
<i>p valor</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i><0.05</i>	<i>NS</i>

C: Control, **I:** Inulina comercial de achicoria, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos de *A. tequilana* experimental, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:**Almidón de arroz. Media \pm EEM (n=9).

7.3. Peso del tejido adiposo abdominal

En la **Figura 7.3** se resumen los efectos de los tratamientos en el peso del tejido adiposo abdominal. Los pesos medios más altos (10.00 y 9.91 g) y estadísticamente similares correspondieron a los animales suplementados con almidón de arroz (A) y sin suplementación (C), respectivamente. Los pesos de este tejido en los tratamientos con fructanos de maguey fueron intermedios y estadísticamente similares entre sí, pero con los fructanos de achicoria se acumuló la menor cantidad de grasa abdominal, la cual fue estadísticamente diferente a la registrada con almidón y sin suplemento. Así, aunque el consumo de alimento fue constante durante todo el periodo experimental, los tratamientos provocaron diferencias significativas en el peso final y en la acumulación de tejido adiposo abdominal. Huazano García *et al.* (2017) demostraron que en ratones obesos la suplementación con fructanos de maguey puede mejorar los desórdenes metabólicos asociados al sobrepeso. En cuanto a los fructanos de achicoria, Delzenne *et al.* (2005) encontraron que su suplementación al 10% redujo la ingesta de alimento y la cantidad de tejido graso en el epidídimo y aumentó la producción de ácidos grasos de cadena corta .

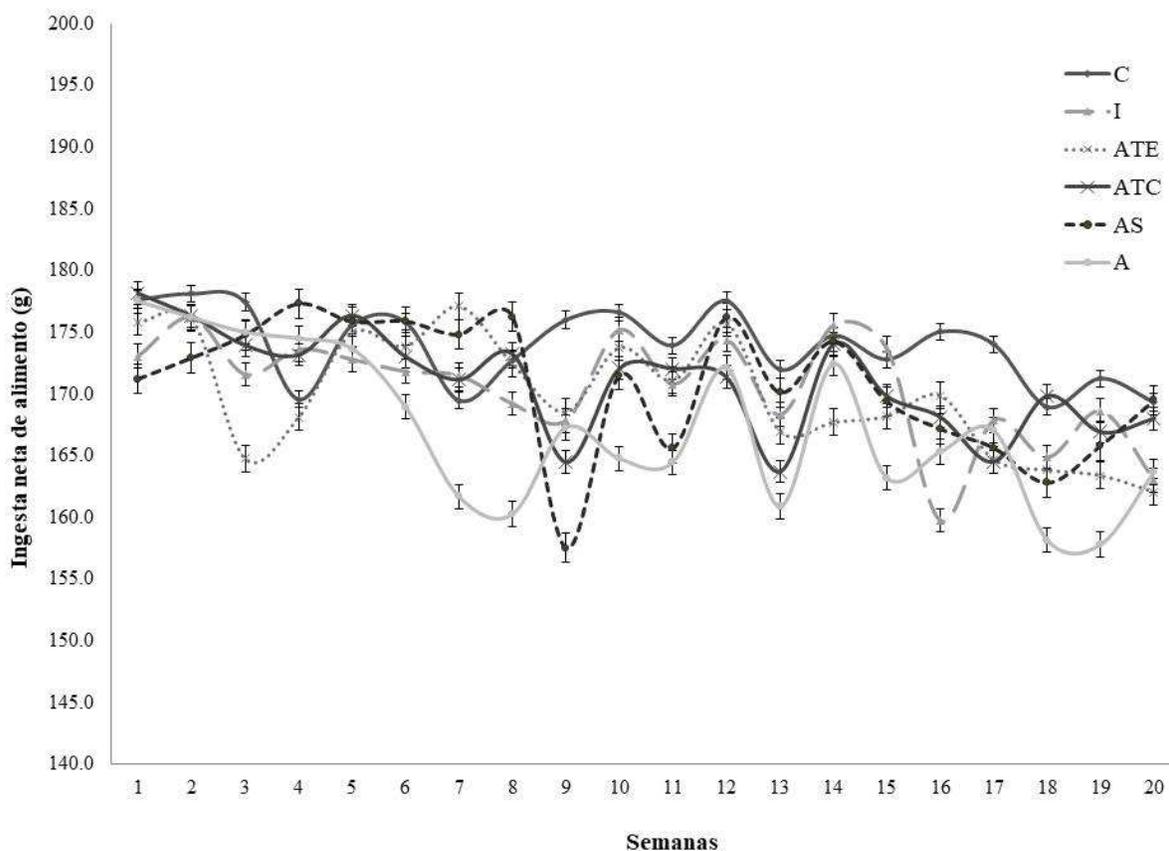


Figura 7.1: Ingesta neta de alimento durante el periodo experimental. **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias \pm DE (n=9).

En general, se ha encontrado que el consumo de fructanos promueve la saciedad al disminuir el apetito y el balance energético general, lo cual reduce el peso corporal final y el tejido adiposo en los animales de experimentación (Cani *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2002b; Meier, 2012; Meier *et al.*, 2002a; Chaudhri *et al.*, 2008).

7.4. Efectos en las variables séricas

Al iniciar el experimento no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada una de las variables séricas cuantificadas, lo cual evidencia la homogeneidad original de las unidades experimentales (**Cuadro 7.2**). Al finalizar el experimento sólo para glucosa se encontró similitud estadística entre tratamientos. En colesterol total el tratamiento testigo superó estadísticamente al resto, seguido sin

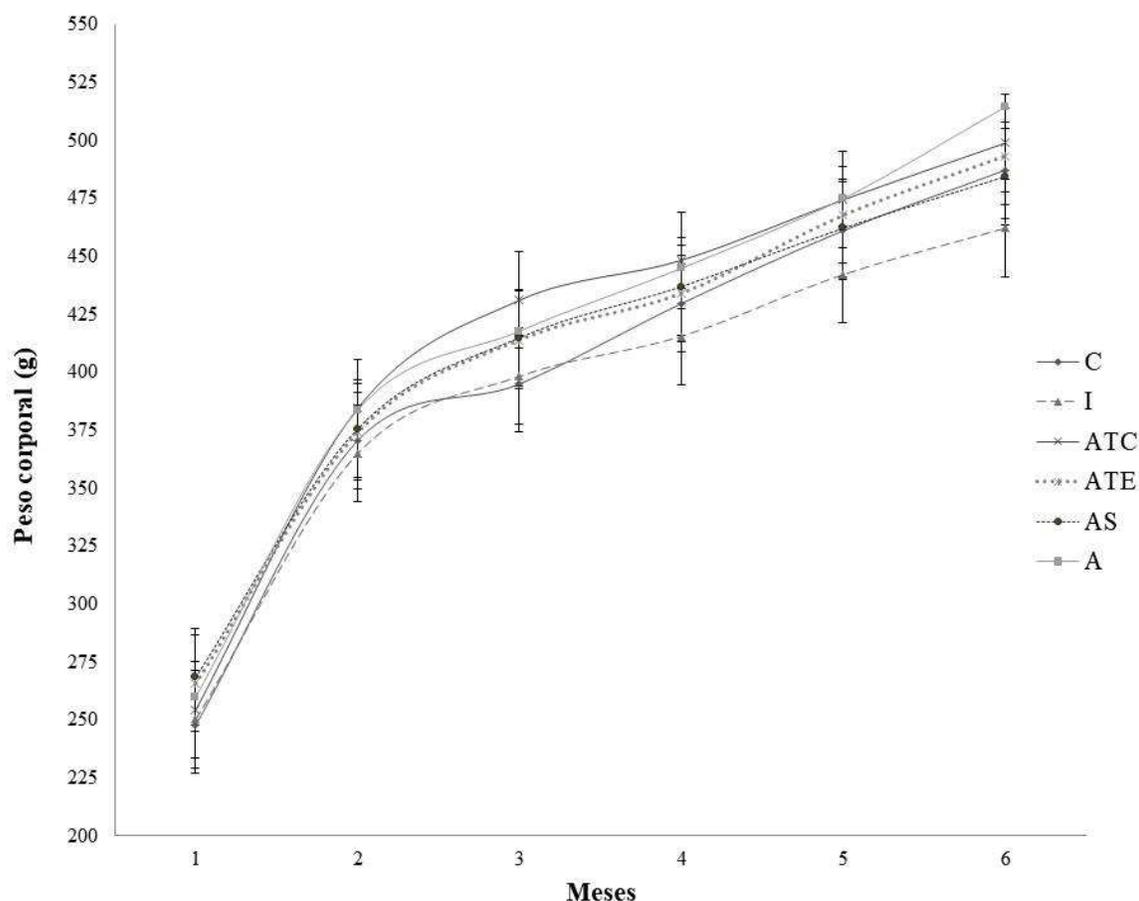


Figura 7.2: Cambios en el peso corporal (g) durante el periodo experimental. **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias \pm DE (n=9).

diferencias significativas por la suplementación con almidón y por los tres tipos de fructanos de maguay; finalmente, el tratamiento con inulina destacó al provocar estadísticamente el menor nivel de colesterol total al terminar el experimento. En cuanto a triglicéridos, el control y el suplemento de almidón también registraron los mayores valores significativos con respecto a la inulina y los fructanos experimentales de maguay tequilero.

Finalmente, en las lipoproteínas de alta densidad sólo la inulina superó estadísticamente al indeseable menor nivel registrado con el suplemento de fructanos de maguay tequilero extraídos en el laboratorio. Ninguna de las variables séricas evaluadas resultó significativamente alterada al aplicar cada tratamiento durante el periodo experimental (**Cuadro 7.2**).

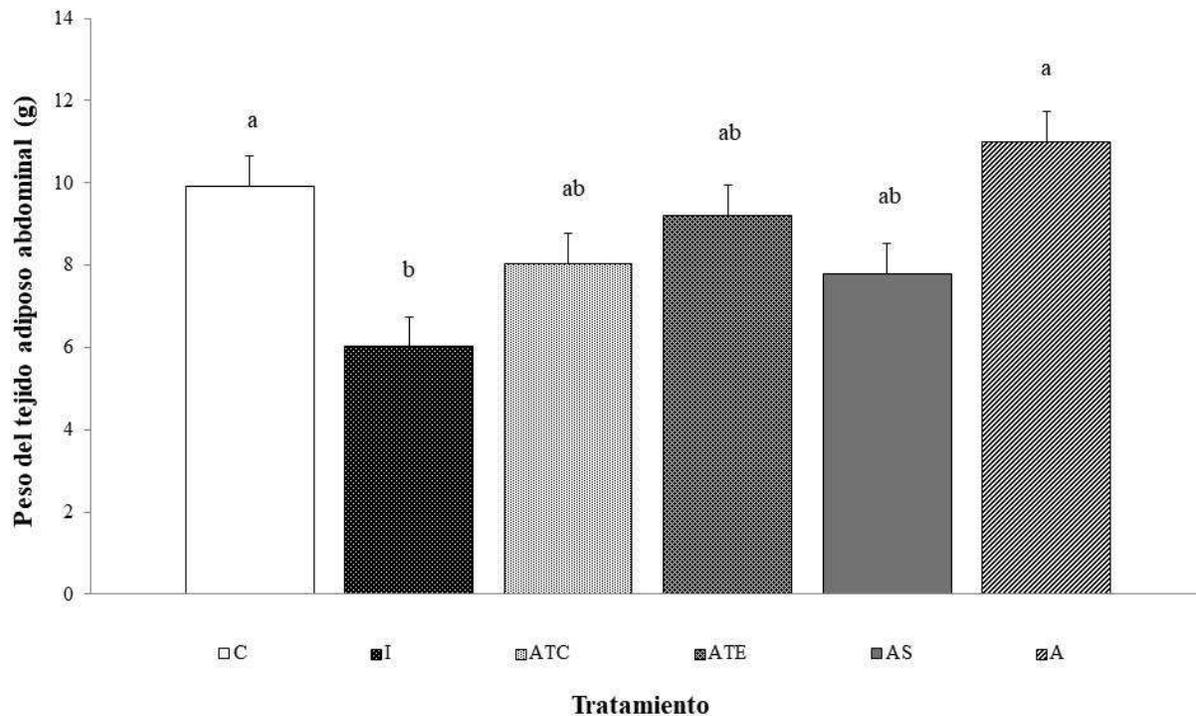


Figura 7.3: Peso del tejido adiposo abdominal (g). **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias \pm DE (n=9).

Existen diversas explicaciones de cómo los fructanos ejercen su acción metabólica en el organismo. Así, se menciona que los fructanos modifican los niveles de insulina y glucagón mediante la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Delzenne y Kok, 1998). Por otra parte, en ratas alimentadas con fructooligosacáridos se registraron niveles bajos de colesterol total y triglicéridos séricos, lo cual fue atribuido a una reducción en la síntesis de ácidos grasos *de novo* en el hígado y a la reabsorción de los ácidos biliares circulantes (Fiordaliso *et al.*, 1995).

Cuadro 7.2: Cuantificación de variables séricas (mg/dL) evaluadas al inicio (B) y al final (F) del periodo experimental de ratas sanas

Tratamiento	Glucosa		Colesterol total		Triglicéridos		Colesterol-HDL	
	B	F	B	F	B	F	B	F
C	106.53±10.63 ^{a,1}	120.52±26.97 ^{a,1}	63.39±8.54 ^{a,1}	86.17±17.21 ^{a,1}	67.92±9.95 ^{a,1}	84.03±13.27 ^{a,1}	36.15±0.17 ^{a,1}	37.21±16.52 ^{ab,1}
I	107.71±17.03 ^{a,1}	110.69±28.78 ^{a,1}	67.21±9.01 ^{a,1}	64.48±10.86 ^{c,1}	63.54±10.05 ^{a,1}	59.52±6.42 ^{b,1}	35.10±5.85 ^{a,1}	48.70±7.62 ^{a,1}
ATC	114.34±18.98 ^{a,1}	105.75±16.67 ^{a,1}	72.87±11.54 ^{a,1}	68.04±6.90 ^{bc,1}	71.28±11.10 ^{a,1}	68.56±9.52 ^{ab,1}	44.02±15.98 ^{a,1}	35.96±14.48 ^{ab,1}
ATE	106.51±12.34 ^{a,1}	115.48±26.18 ^{a,1}	73.72±10.63 ^{a,1}	68.74±6.75 ^{bc,1}	69.18±10.82 ^{a,1}	59.08±11.55 ^{b,1}	49.44±11.36 ^{a,1}	29.46±7.74 ^{b,1}
AS	116.64±15.74 ^{a,1}	101.63±20.34 ^{a,1}	81.59±13.90 ^{a,1}	68.04±6.10 ^{bc,1}	72.53±12.72 ^{a,1}	75.27±18.71 ^{ab,1}	45.88±14.17 ^{a,1}	45.20±14.97 ^{ab,1}
A	125.54±9.76 ^{a,1}	121.82±30.01 ^{a,1}	77.35±12.27 ^{a,1}	82.00±8.81 ^{ab,1}	70.76±9.08 ^{a,1}	81.80±9.39 ^{a,1}	47.52±9.62 ^{a,1}	44.39±13.57 ^{ab,1}

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias ± DE (n=9).

^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (p<0.05). ¹Medias con diferente dígito por renglón para cada parámetro son estadísticamente diferentes (p<0.05)

En el presente estudio, la suplementación con fructanos de achicoria y de maguey suministrada a unidades experimentales sanas mantuvo los niveles séricos deseables de glucosa (98-152 mg/dL) (Bolant-Hernández *et al.*, 1990), colesterol total (37-95 mg/dL) (Clifford y Giknis, 2008; Dantas *et al.*, 2008), triglicéridos (98-152 mg/dL) y HDL (30-64 mg/dL) (Lima *et al.*, 2014). Cabe destacar que los fructanos de *A. tequilana*, comerciales (ATC) y extraídos en el laboratorio (ATE), generaron resultados estadísticamente similares en todas las variables séricas evaluadas. Con los fructanos de *A. salmiana* en madurez fisiológica óptima se han suplementado ratas sanas, sin que se altere la concentración normal de las variables metabólicas séricas al finalizar la experimentación de corto plazo (5 semanas/ dosis de 12.5 %) (Castillo Andrade *et al.*, 2018), mediano plazo (12 semanas/ dosis de 20 %)(Jasso-Padilla *et al.*, 2016) y de plazo más largo (20 semanas/dosis de 10 %) del presente estudio.

Se ha documentado que al separar los fructanos de *A. tequilana* según su grado de polimerización, se obtienen resultados fisiológicos dependientes de la complejidad del polisacárido (Márquez-Aguirre *et al.*, 2013, 2016). En el presente estudio, sólo se utilizaron los fructanos completos de *A. salmiana* y *A. tequilana*, sin separarlos por grado de polimerización y los beneficios registrados (variables metabólicas séricas, peso corporal y tejido adiposo abdominal) fueron similares a los obtenidos al suplementar con fructanos de *A. tequilana* (Urías-Silvas *et al.*, 2008), *A. angustifolia* y *A. potatorum* (Santiago-García y López, 2014) y *A. fourcroydes* (García-Curbelo *et al.*, 2015).

7.5. pH y microbiología de las heces

La variación del pH de las heces en solución salina se resume en la **Figura 7.4**. Los valores registrados para todos los tratamientos permanecieron dentro de los límites normales (4.5 a 7.5) en el colon de animales experimentales (Fallingborg, 1999). Sin embargo, la suplementación con almidón provocó una alcalinización colónica y los suplementos de fructanos solo mostraron una tendencia, consistente pero no significativa, a provocar mayor acidez que el tratamiento sin suplementación.

A diferencia de las bacterias ácido lácticas, las enterobacterias en heces se mantuvieron sin cambios significativos debido a la escasa acidez provocada por los tratamientos (**Cuadro 7.3**). La generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación bacteriana de los fructanos sólo reduce parcialmente el pH promedio del medio intestinal, pues gradualmente dichos ácidos son generados, absorbidos y

metabolizados casi totalmente, mientras que *in vitro* permanecen en el medio, se acumulan y generan mayor acidez (Cummings y Macfarlane, 1991; Cummings, 1995).

Las concentraciones de enterobacterias en todos los tratamientos se mantuvieron sin cambios significativos entre el inicio y el final del experimento (**Cuadro 7.3**). Con respecto a las bacterias ácido lácticas, las muestras correspondientes a los tratamientos con suplemento de fructanos presentaron incrementos significativos al final del experimento, lo cual es concordante con lo publicado al respecto (Rendón-Huerta *et al.*, 2012; Castillo Andrade *et al.*, 2019; Márquez-Aguirre *et al.*, 2013; Jasso-Padilla *et al.*, 2016). El incremento final de BAL causado por el almidón, estadísticamente similar al provocado normalmente por los fructanos (Walker y Hope, 1963; Mayes y Ørskov, 1974), pudo deberse a su alteración térmica al incorporarlo como suplemento al resto del alimento (Campbell *et al.*, 1997).

Cuadro 7.3: Concentración de familias bacterianas (UFC) al final del periodo experimental

Tratamientos	Bacterias ácido lácticas		Enterobacterias	
C	9.23±0.25 ^a	9.18±0.09 ^a	5.93±0.42 ^a	6.29±0.44 ^a
I	9.15±0.71 ^a	10.64±0.50 ^a	5.71±0.85 ^a	5.72±0.76 ^a
ATC	9.35±0.53 ^a	10.34±0.08 ^a	5.76±0.11 ^a	6.16±0.90 ^a
ATE	9.57±0.61 ^a	10.36±0.88 ^a	5.92±1.55 ^a	6.00±1.29 ^a
AS	9.31±0.18 ^a	10.49±0.57 ^a	5.61±1.92 ^a	5.73±0.93 ^a
A	9.36±1.19 ^a	9.62±0.17 ^a	5.81±1.13 ^a	5.86±0.61 ^a

C: Control, **I:** Inulina comercial de achicoria, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos de *A. tequilana* experimental, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Media ± EEM (n=9). ^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (p<0.05). ¹Medias con diferente dígito por renglón para cada parámetro son estadísticamente diferentes (p<0.05)

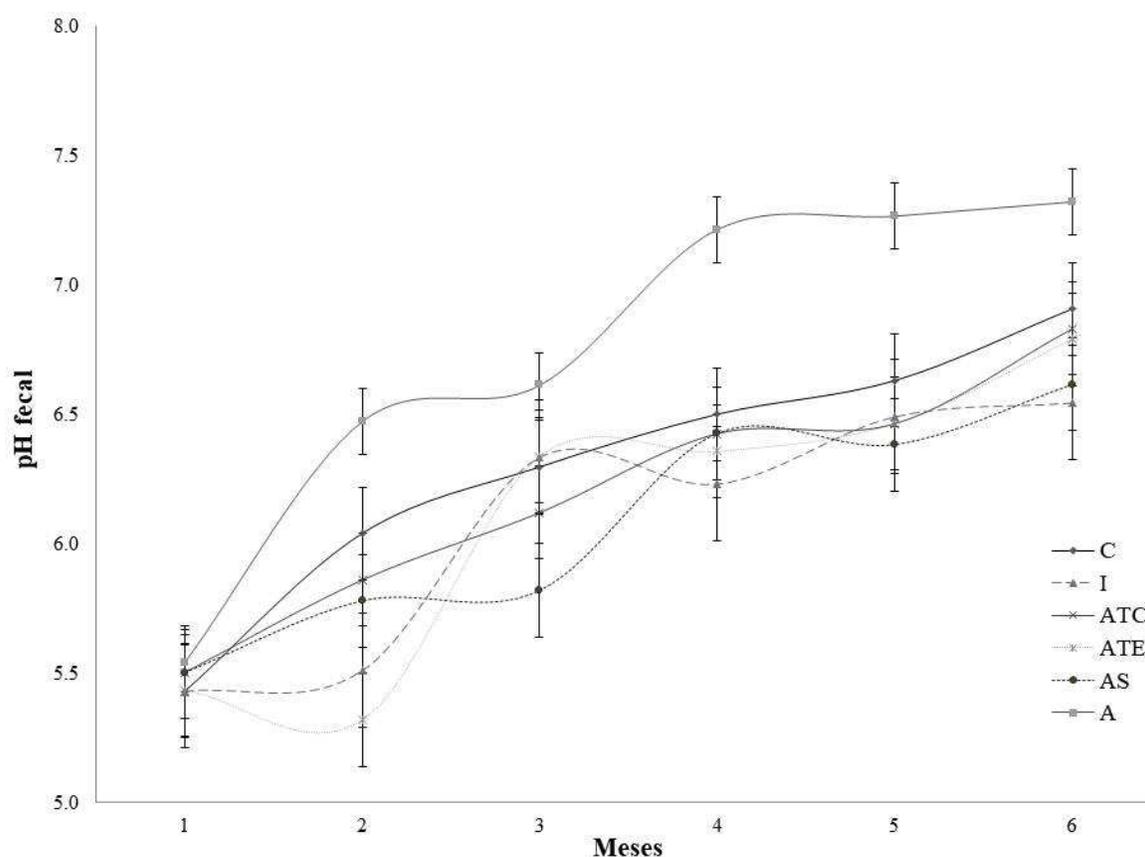


Figura 7.4: Variación del pH de heces húmedas durante el periodo experimental. **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias \pm DE (n=9).

Con respecto al principal género bacteriano, el tratamiento control mantuvo la abundancia original de *Lactobacillus*; mientras que con los tratamientos con fructanos se observó la disminución de *Lactobacillus* pero en general una mayor diversidad microbiana. Los tratamientos ATC y ATE incrementaron la abundancia de *Faecalibaculum*. Al analizar la abundancia delta (**Figura 7.5** y **7.6**) se observó que el tratamiento AS mantiene al género *Lactobacillus* en abundancia similar que el tratamiento I, pero mayor que ATC y ATE. El incremento de *Faecalibaculum* en AS y I fue menor que en los tratamientos ATC y ATE. El análisis de componentes principales, mostró patrones similares entre tratamientos, con excepción de AS con la mayor diversidad (**Figura 7.7**).

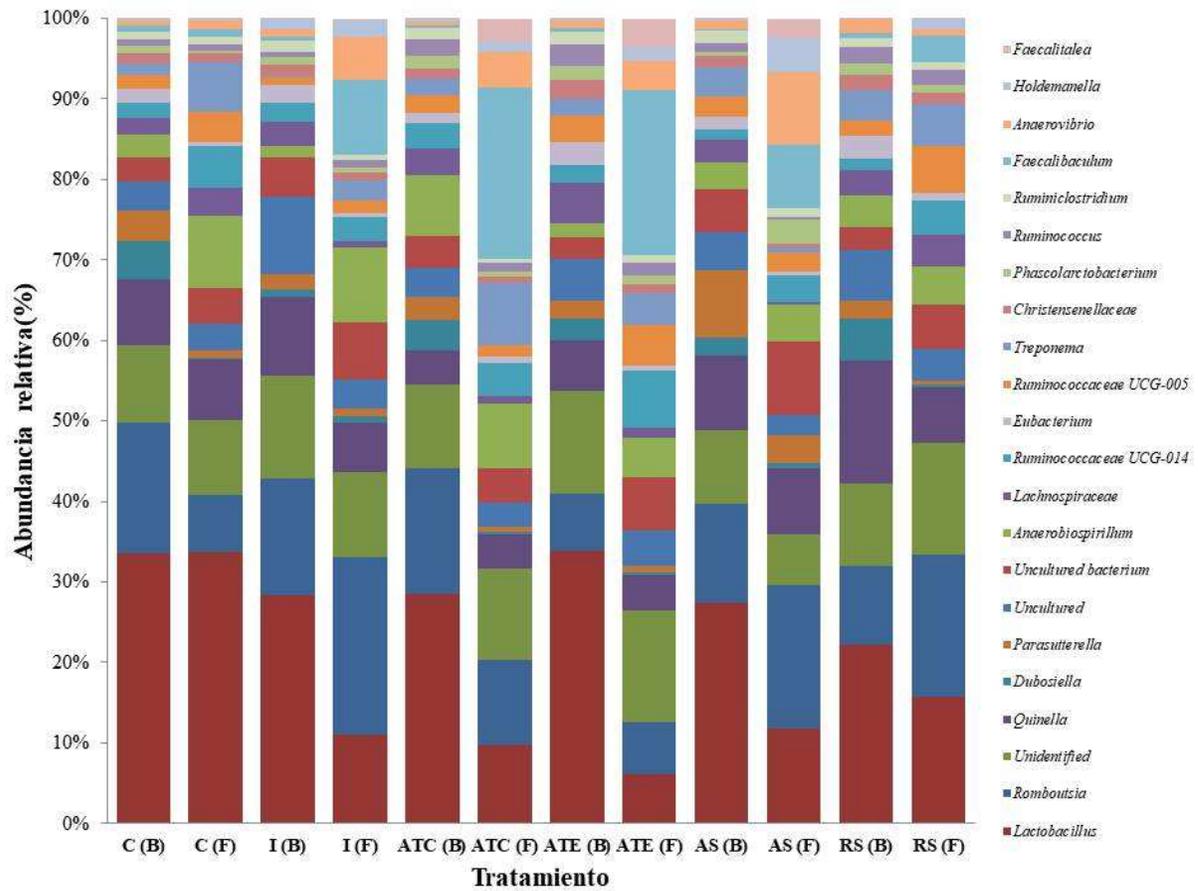


Figura 7.5: Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en las heces al principio (B) y al final del experimento (F) por tratamiento, cada taxón representa > 1% de la abundancia relativa promedio en cada tratamiento y se indica con un color diferente.

La diversidad de la microbiota intestinal varía de acuerdo a la porción anatómica del sistema gastrointestinal donde se colecte la muestra debido a las condiciones fisicoquímicas específicas del medio, como la velocidad del flujo intestinal, potencial redox, concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y respuesta inmune del huésped. Además la microbiota será variable si fue tomada de la porción mucosa o luminal (Metcalf *et al.*, 1987; Koropatkin *et al.*, 2012; Ermund *et al.*, 2013). Además, según la porción evaluada del sistema gastrointestinal, Li *et al.* (2017) encontraron una mayor proporción de los géneros *Lactobacillus* y *Turicibacter* en el estómago y el intestino delgado, mientras que anaerobios como *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, que fermentan carbohidratos y compuestos aromáticos vegetales constituyeron la mayor proporción de la microbiota del colon.

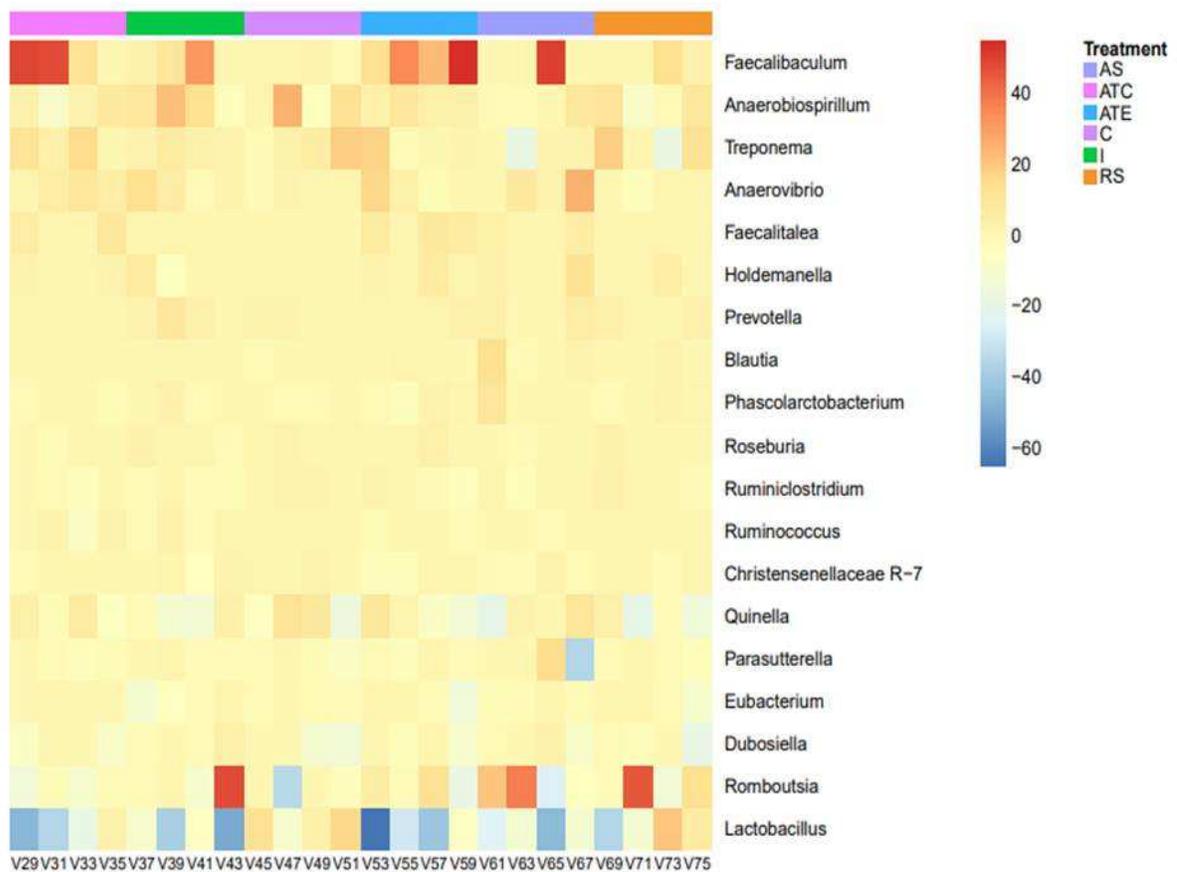


Figura 7.6: Mapa de calor de los valores delta para cada bacteria y tratamiento, que representa el porcentaje de AVS al comienzo y al final del experimento, el color rojo significa un aumento, mientras que el color azul una disminución, los números de cada color corresponden al valor de la diferencia.

En lo que respecta al uso de prebióticos para modular la microbiota intestinal, Everard *et al.* (2014) y Mao *et al.* (2015) evidenciaron mediante técnicas de secuenciación del gen ARNr 16S, que el consumo de inulina de achicoria por ratones obesos estimuló el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos y que además incrementó otras familias bacterianas como *Streptococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Olsenella*, *Akkermansia* y *Allobaculum*. Por lo que respecta a la suplementación con fructanos de agave, Huazano García *et al.* (2017) mostraron la modulación de la microbiota cecal en ratones obesos y encontraron como géneros enriquecidos a *Klebsiella* y *Citrobacter*.

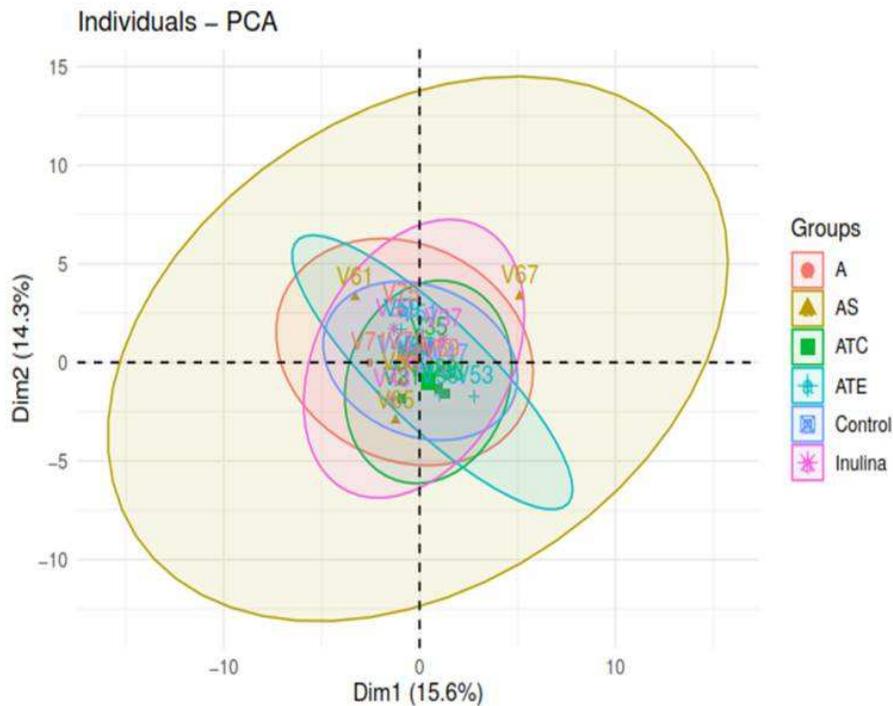


Figura 7.7: Análisis de componentes principales de las comunidades colónicas totales en ratas sanas al final del periodo experimental. **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz.

7.6. Longitud intestinal y contenido colónico y cecal

El acortamiento del colon ha sido considerado como indicador de su inflamación (Castillo-Martínez *et al.*, 2005; Schenk *et al.*, 2007), la cual podría resultar del consumo prolongado de fructanos; a la vez, la persistencia de algunos rafidios en los fructanos de maguey podrían causar daños mecánicos en el intestino. Como se muestra en el **Cuadro 7.4**, la suplementación con fructanos, especialmente los extraídos de maguey, tendieron de manera consistente a provocar un alargamiento del colon, aunque sin significación estadística; en cambio, en el intestino delgado los fructanos de maguey tendieron a reducirle su longitud, posiblemente al suceder una disminución del tiempo de retención del alimento. Tampoco, con base en la exploración microscópica, se observaron daños por rafidios al tejido intestinal en ninguna de las unidades experimentales. Estos resultados son concordantes con los antecedentes al respecto (Castillo Andrade *et al.*, 2018).

Cuadro 7.4: Longitud intestinal (cm) de ratas sanas

Tratamiento	Intestino grueso	Intestino delgado
C	19.11 ± 3.44 ^a	119.17 ± 5.00 ^{ab}
I	19.50 ± 0.84 ^a	122.50 ± 6.81 ^a
ATC	20.25 ± 1.91 ^a	111.00 ± 8.92 ^{ab}
ATE	20.39 ± 1.57 ^a	114.39 ± 11.12 ^{ab}
AS	20.63 ± 2.26 ^a	102.50 ± 14.46 ^b
A	19.11 ± 1.05 ^a	106.43 ± 14.05 ^{ab}

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias ± DE (n=9). ^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (p<0.05)

Los resultados de la evaluación del contenido cecal se resumen en la **Figura 7.8**. Los cuatro tratamientos de suplementación con fructanos fueron estadísticamente similares entre sí y a la vez superiores al control y al suplemento con almidón. El aumento de peso del contenido cecal se debió a su mayor proporción de agua y al incremento masivo de bacterias ácido lácticas provocado por los fructanos, al constituir su sustrato natural (Savage, 1986; Topping y Clifton, 2001).

En la **Figura 7.9** se resumen los resultados de la evaluación del contenido del colon. El tratamiento sin suplementación (C) destacó de manera significativa con alrededor del doble de contenido del colon que las suplementadas con fructanos. A la observación macroscópica, aunque similar estadísticamente en peso húmedo, el suplemento con almidón presentó un contenido más compacto y seco que los generados por los tratamientos con fructanos de inulina y de magueyes, los cuales presentaron contenidos de consistencia más suave y húmeda. En efecto, aunque el suplemento de fructanos incrementa el volumen de las heces, al aumentarse la retención de humedad y la biomasa bacteriana, la defecación se facilita y el tiempo de tránsito o retención del contenido intestinal se reduce, con lo cual el estreñimiento se previene y el tiempo de contacto de compuestos dañinos con el intestino se acorta (Slavin, 2013).

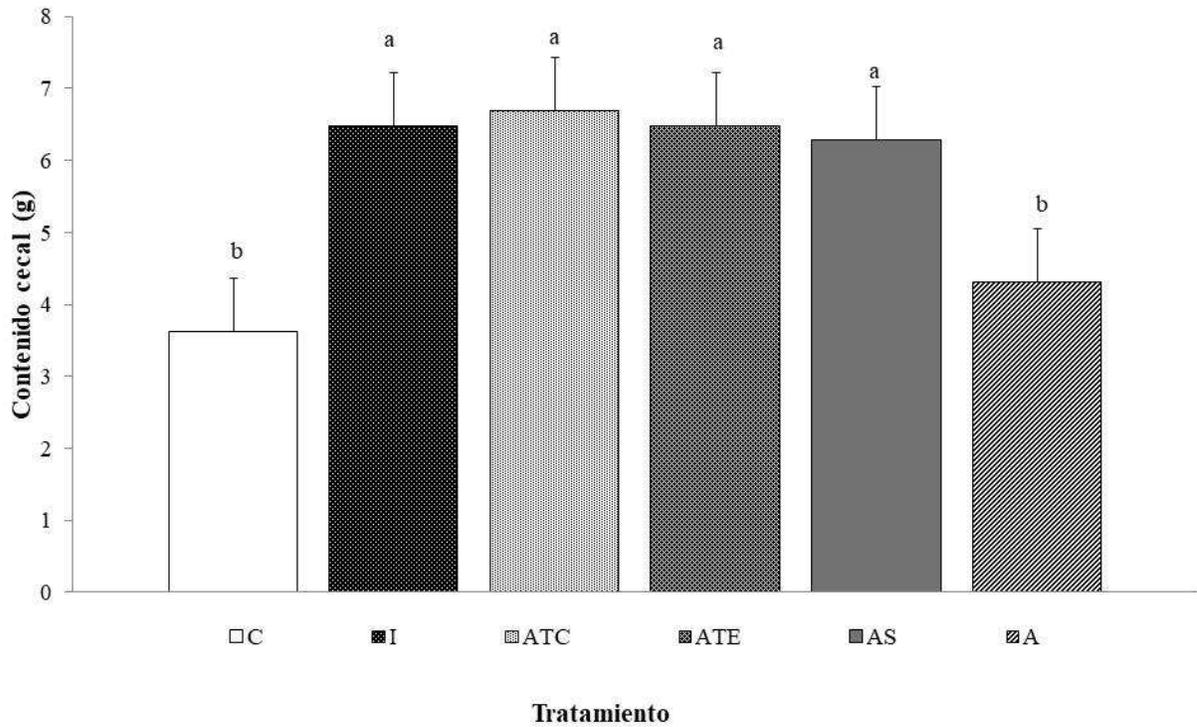


Figura 7.8: Peso del contenido cecal (g). **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias \pm DE (n=9).

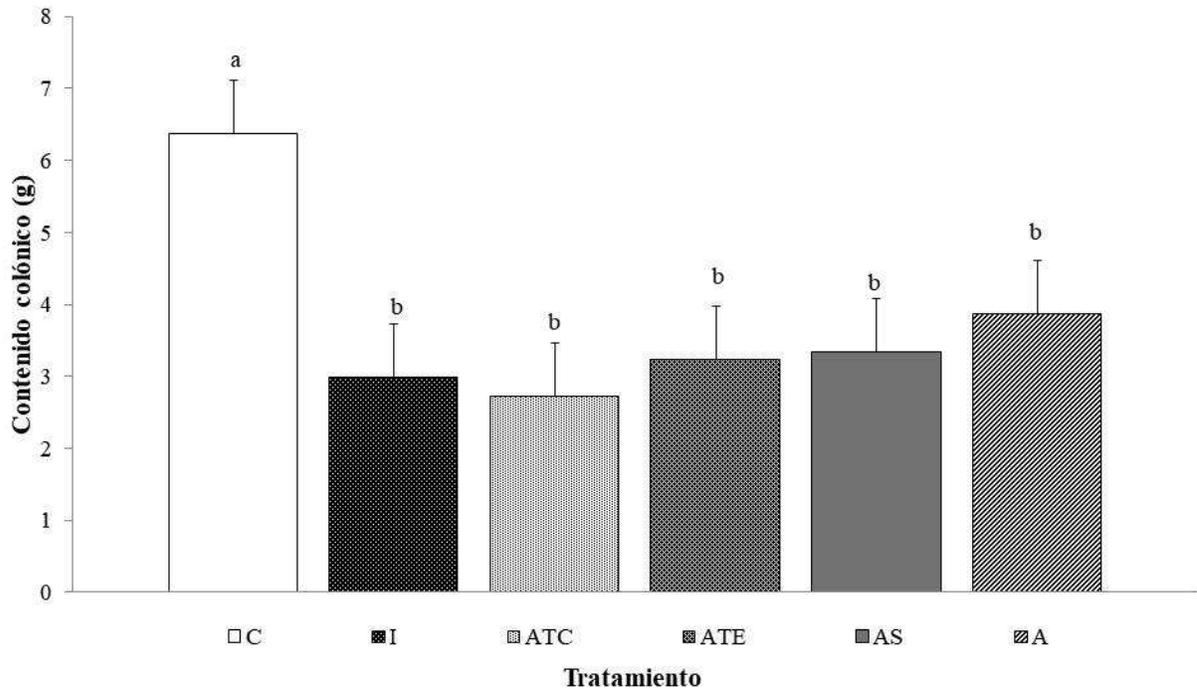


Figura 7.9: Peso del contenido colónico (g). **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:**Almidón de arroz. Medias \pm DE (n=9).

7.7. Análisis histológico

Los efectos de la suplementación prolongada con fructanos sobre el tamaño de los núcleos de hepatocitos y las criptas o glándulas de Lieberkühn del colon, se resumen en el **Cuadro 7.5**. Ninguno de los tratamientos evaluados provocó un cambio hístico significativo en el hígado; tampoco se registró acumulación de lípidos ni de pigmentos biliares intracelulares como reacción a cualquier patología, lo cual concuerda con los antecedentes (López Panqueva, 2013).

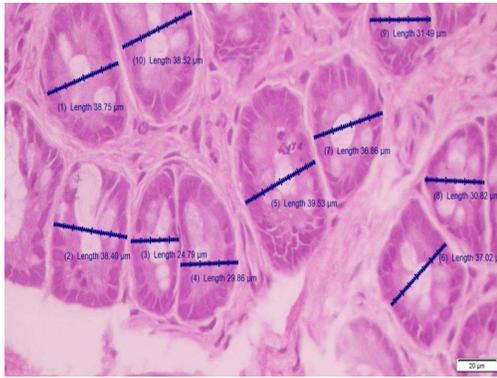
La anchura de las fosas crípticas del colon fue estadísticamente igual para todos los tratamientos evaluados (**Cuadro 7.5**); además de presentar el mismo tamaño, su morfología se registró intacta y el espacio pericríptico apareció bien definido. Sin embargo, las criptas correspondientes a los tratamientos con fructanos presentaron más estructuras vacuolares con mucina intracelular en las células caliciformes o de Goblet (**Figura 7.10**) lo cual es benéfico para el organismo (Burgel y Nadel, 2002).

Finalmente, cabe destacar que el colon de los animales suplementados con los fructanos de maguey obtenidos en nuestro laboratorio (ATE y AS), careció de daños mecánicos lo cual evidenció que los rafidios presentes de manera natural en los tallos fueron separados y eliminados totalmente durante el proceso de extracción aplicado (Godínez-Hernández *et al.*, 2016c).

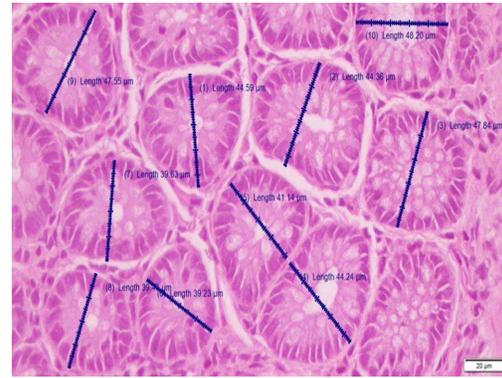
Cuadro 7.5: Diámetro nuclear (μm) de hepatocitos y criptas de Lieberkühn

Tratamiento	Hepatocitos	Criptas de Lieberkühn
C	9.25 \pm 0.41 ^a	40.29 \pm 2.91 ^a
I	9.72 \pm 0.60 ^a	43.63 \pm 3.57 ^a
ATC	9.44 \pm 0.91 ^a	41.60 \pm 7.03 ^a
ATE	9.76 \pm 0.62 ^a	41.82 \pm 2.49 ^a
AS	9.19 \pm 0.46 ^a	46.83 \pm 4.73 ^a
A	9.18 \pm 1.00 ^a	41.15 \pm 4.23 ^a

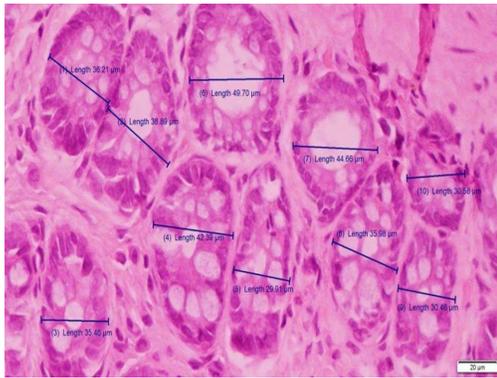
C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias \pm DE. ^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)



(C)



(I)



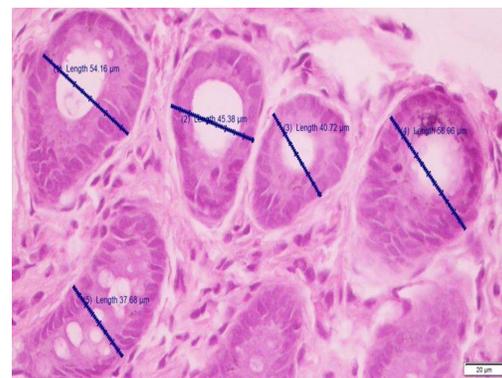
(ATC)



(ATE)



(AS)



(A)

Figura 7.10: Sección de muestra del tejido colónico (40X) teñidos con hematoxilina-eosina. **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz.

8

Conclusiones

El consumo de alimento se mantuvo sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con animales sanos. Los fructanos de achicoria (inulina) redujeron estadísticamente el peso corporal medio final de sus unidades experimentales. La suplementación con fructanos de maguey y de achicoria disminuyó significativamente el peso del tejido adiposo abdominal y mantuvo en niveles deseables los valores de las variables séricas evaluadas. La suplementación con almidón provocó un aumento estadísticamente significativo del pH de las heces. La concentración de enterobacterias en las heces se mantuvo sin cambios estadísticamente significativos en todos los tratamientos evaluados; en cambio, la suplementación con fructanos y almidón incrementó significativamente la concentración de bacterias ácido lácticas. La suplementación con fructanos de maguey y de achicoria incrementó significativamente el contenido cecal; a la vez, favoreció el vaciado intestinal y mejoró la consistencia de las heces. Esta suplementación resultó inocua para el hígado y para el tracto intestinal y en cambio se observó un incremento de mucina intracelular en las fosas crípticas de los colonocitos. Se observó que la suplementación con AS mantiene al género *Lactobacillus* en abundancia similar que el tratamiento I, pero mayor que ATC y ATE, además se registró la mayor diversidad microbiana fecal.

En general, la suplementación con fructanos íntegros de *A. salmiana* y *A. tequilana* a animales sanos, produjo efectos benéficos similares a los generados por la inulina.

Conflicto de intereses

No hay conflicto de intereses que declarar.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca doctoral otorgada. Al Dr. Manuel Núñez Muñoz (Nutrición y Genética Saludable, S.A. de C.V.) por su apoyo financiero mediante el apoyo del Programa de Estímulos a la Innovación PEI-CONACYT, No. 251911. Megafarma S.A. de C.V. por la donación de inulina de achicoria para el estudio. *Los financiadores no tuvieron ninguna función en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

Referencias citadas

- Aguirre-Rivera, J. R., Charcas-Salazar, H. F., Flores-Flores, J. L., 2001. El Maguey Mezcalero Potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, San Luis Potosí S. L. P., México, p. 78.
- Bolant-Hernández, B., Calvo-Bermúdez, M., Cejalvo-Lapeña, D., Gimeno-Forner, O., Gimeno-Forner, L., Lloris-Carsí, J., 1990. Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata. Parte 2. *Research in Surgery* 4, 12–20.
- Burgel, P., Nadel, J. A., 2002. Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management. Academic Press, Cap. 16. Mucus and Mucin-Secreting Cells, pp. 155–163.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nature Methods* 13 (7), 581.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campbell, J. M., Fahey Jr., G. C., Wolf, B. W., 1997. Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. *Nutrient Metabolism*, 130–136.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/127.1.130>
- Cani, P. D., Dewever, C., Delzenne, N. M., 2004. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *British Journal of Nutrition* 92 (3), 521–526.
URL <https://doi.org/10.1079/BJN20041225>
- Castillo Andrade, A., Rivera Bautista, C., Ruiz Cabrera, M., Soria Guerra, R., García Chávez, E., Fuentes Ahumada, C., Grajales Lagunes, A., 2019. *Agave salmiana* fructans as gut health promoters: Prebiotic activity and inflammatory response in Wistar healthy rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 136, 785–795.
URL <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.045>

- Castillo Andrade, A. I., Rivera Bautista, C., Godínez Hernández, C., Ruiz Cabrera, M. A., Fuentes Ahumada, C., García Chávez, E., Grajales Lagunes, A., 2018. Physiometabolic effects of *Agave salmiana* fructans evaluated in Wistar rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 108, 1300–1309.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.043>
- Castillo-Martínez, D., Rosas-Barrientos, J., Serrano-López, A., Amezcua-Guerra, L., 2005. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 10 (2), 10–20.
- Chaudhri, O. B., Salem, V., Murphy, K. G., Bloom, S. R., 2008. Gastrointestinal satiety signals. *Annual Review of Physiology* 70, 239–255.
URL <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100506>
- Clifford, C. B., Giknis, M. L. A., 2008. Clinical Laboratory Parameter for CrI: WI (Han). Reporte técnico, Charles River Laboratory, pp.1-14.
- Crispín-Isidro, G., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E., 2015. Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. *LWT-Food Science and Technology* 62, 438–444.
URL <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.042>
- Cummings, J. H., 1995. Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton Florida, USA, p. 292.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Microbiology* 70 (6), 443–459.
URL <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x>
- Dantas, J. A., Ambiel, C. R., Cuman, R. K. N., Baroni, S., Amado, C. A. B., 2008. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Health Sciences* 28 (2), 165–170.
URL <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v28i2.1099>
- D'Argenio, V., Salvatore, F., 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta* 451, 97–102.
URL <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>

- Delzenne, N. M., Cani, P. D., Daubioul, C., Neyrinck, A. M., 2005. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *British Journal of Nutrition* 93 (S1), S157–S161.
URL <http://doi.org/10.1079/bjn20041342>
- Delzenne, N. M., Kok, N., 1998. Effect of non-digestible fermentable carbohydrates on hepatic fatty acid metabolism. *Biochemical Society Transactions* 26 (2), 228–231.
URL <https://doi.org/10.1042/bst0260228>
- Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., Hugenholtz, P., 2010. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. Reporte técnico, Lawrence Berkeley National Laboratory. University of California, USA.
- Ermund, A., Schutte, A., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Hansson, G. C., 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal Liver Physiology* 305 (5), G341–G347.
URL <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00046.2013>
- Everard, A., Lazarevic, V., Gaia, N., Johansson, M., Ståhlman, M., Backhed, F., Delzenne, N. M., Schrenzel, J., François, P., Cani, P. D., 2014. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME Journal* 8 (10), 2116–2130.
URL <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.45>
- Fallingborg, J., 1999. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin* 46 (3), 183–196.
- Fiordaliso, M., Kok, N., Desager, J. P., Goethals, F., Deboyser, D., Roberfroid, M., Delzenne, N., 1995. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids* 30 (2), 163–167.
URL <https://doi.org/10.1007/BF02538270>
- Fish, S. K., Fish, P. R., Miksicek, C., Madsen, J., 1985. Prehistoric Cultivation in Southern Arizona. *Desert Plants* 7 (2), 107–112.
URL <http://hdl.handle.net/10150/554214>

- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., Roberfroid, M., 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 41, 353–362.
URL <https://doi.org/10.1080/20014091091841>
- Franck, A., 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87 (2), S287– S291.
URL <http://doi.org/10.1079/bjn/2002550>
- García-Curbelo, Y., Bocourt, R., Savón, L. L., García-Vieyra, M. I., López, M. G., 2015. Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model. *Food Function* 6 (9), 3177–3182.
URL <https://doi.org/10.1039/C5F000653H>
- García Mendoza, A., 2007. Los agaves de México. *Ciencias* (87), 14–23.
- Gentry, H. S., 1998. Agaves of Continental North America, 2da Edición. The University of Arizona Press, USA, p. 670.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews: Gastroenterology & Hepatology* 14 (8), 491–502.
URL <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G. R., Roberfroid, M., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401–1412.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez Flores, B. I., 2016a. Importancia creciente de los fructanos del maguey. Retos y perspectivas. *Tecnoagave* 40 (5), 26–29.
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., Becerra-Jiménez, J., 2016b. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 22 (1), 59–72.
URL <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>

- González Herrera, S. M., Rodríguez Herrera, R., López, M. G., Rutiaga, O. M., Aguilar, C. N., Contreras Esquivel, J. C., Ochoa Martínez, L. A., 2015. Inulin in food products: prebiotic and functional ingredient. *British Food Journal* 117 (1), 371–387.
URL <https://doi.org/10.1108/BFJ-09-2013-0238>
- Huazano García, A., López, M. G., 2015. Agavins reverse the metabolic disorders in overweight mice through the increment of short chain fatty acids and hormones. *Food Function* 6 (12), 3720–3727.
URL <https://doi.org/10.1039/C5F000830A>
- Huazano García, A., Shin, H., López, M., 2017. Modulation of Gut Microbiota of Overweight Mice by Agavins and Their Association with Body Weight Loss. *Nutrients* 9 (821), 1–12.
URL <https://doi.org/10.3390/nu9090821>
- Jasso-Padilla, I., Juárez-Flores, B., Alvarez-Fuentes, G., De la Cruz-Martínez, A., González-Ramírez, J., Moscosa-Santillán, M., González-Chávez, M., Oros-Ovalle, C., Prell, F., Czermak, P., Martínez-Gutiérrez, F., 2016. Effect of prebiotics of *Agave salmiana* fed to healthy Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (2), 556–563.
URL <http://doi.org/10.1002/jsfa.7764>
- Kaplan, H., Ratering, S., Felix-Henningsen, P., Schnell, S., 2019. Stability of *in situ* immobilization of trace metals with different amendments revealed by microbial ¹³C-labelled wheat root decomposition and efflux-mediated metal resistance of soil bacteria. *Science of the Total Environment* 659, 1082–1089.
URL <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.441>
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., Martens, E. C., 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 10 (5), 323–335.
URL <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>
- Leach, J. D., 2007. Prebiotics in ancient diets. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 4, 1–8.
URL <http://doi.org/10.1616/1476-2137.14801>
- Leach, J. D., Sobolik, K. D., 2010. High dietary intake of prebiotic inulin-type fructans in the prehistoric Chihuahuan Desert. *British Journal of Nutrition* 103 (11), 1558–1561.
URL <http://doi.org/10.1017/S0007114510000966>

- Li, D., Chen, H., Mao, B., Yang, Q., Zhao, J., Gu, Z., Zhang, H., Chen, Y. Q., Chen, W., 2017. Microbial biogeography and core microbiota of the rat digestive tract. *Scientific Reports* 7, 1–16.
URL <https://doi.org/10.1038/srep45840>
- Lima, C. M., Lima, A. K., Melo, M. G. D., Dória, G. A. A., Serafini, M. R., Albuquerque-Júnior, R. L. C., Araújo, A. A. S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 10 (3), 1–9.
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., Mendoza-Díaz, G., 2003. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (27), 7835–7840.
URL <http://doi.org/10.1021/jf030383v>
- López Panqueva, R. d. P., 2013. Hepatopatología para gastroenterólogos y hepatólogos. Segunda parte: Terminología útil en la interpretación de los hallazgos histopatológicos. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 28 (3), 247–255.
- Loredo Ramírez, A., Llamas Alba, E., Escalante Padrón, F. J., 1997. Histología, 3ra Edición. Universo Editorial SA de CV, Zacatecas Zac., México, pp. 296-301.
- Luo, J., Rizkalla, S. W., Alamowitch, C., Boussairi, A., Blayo, A., Barry, J., Laffitte, A., Guyon, F., Bornet, F., Slama, G., 1996. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63 (6), 939–945.
URL <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.6.939>
- Mao, B., Li, D., Zhao, J., Liu, X., Gu, Z., Chen, Y. Q., Zhang, H., Chen, W., 2015. Metagenomic insight into the effects of fructo-oligosaccharides (FOS) on the composition of fecal microbiota in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (3), 856–863.
URL <https://doi.org/10.1021/jf505156h>
- Márquez-Aguirre, A. L., Camacho-Ruiz, R. M., Arriaga-Alba, M., Padilla-Camberos, E., Kirchmayr, M. R., Blasco, J. L., González-Avila, M., 2013. Effects of *Agave tequilana* fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal Lactobacilli/Bifidobacteria in obese mice. *Food & Function* 4 (8),

1237–1244.

URL <https://doi.org/10.1039/C3F060083A>

Márquez-Aguirre, A. L., Camacho-Ruíz, R. M., Gutiérrez-Mercado, Y. K., Padilla-Camberos, E., González-Ávila, M., Gálvez-Gastélum, F. J., Díaz-Martínez, N. E., Ortuño-Sahagún, D., 2016. Fructans from *Agave tequilana* with a Lower Degree of Polymerization Prevent Weight Gain, Hyperglycemia and Liver Steatosis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Plant Foods for Human Nutrition* 71 (4), 416–421.

URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-016-0578-x>

Mayes, R. W., Ørskov, E. R., 1974. The utilization of gelled maize starch in the small intestine of sheep. *British Journal of Nutrition* 32, 143.

URL <https://doi.org/10.1079/BJN19740064>

McMurdie, P. J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8 (4), e61217.

URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Meier, J. J., 2012. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 8 (12), 728–742.

URL <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.140>

Meier, J. J., Gallwitz, B., Schmidt, W. E., Nauck, M. A., 2002a. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *European Journal of Pharmacology* 440 (2-3), 269–279.

URL [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01434-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01434-6)

Meier, J. J., Nauck, M. A., Schmidt, W. E., Gallwitz, B., 2002b. Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited. *Regulatory Peptides* 107 (1), 1–13.

URL [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00039-3)

Metcalf, A. M., Phillips, S. F., Zinsmeister, A. R., MacCarty, R. L., Beart, R. W., Wolff, B. G., 1987. Simplified assessment of segmental colonic transit. *Gastroenterology* 92, 40–47.

URL [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90837-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90837-7)

Miles, A. A., Misra, S. S., Irwin, J. O., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection* 38 (6), 732–749.

URL <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>

- Moreno-Vilet, L., García-Hernández, M., Delgado-Portales, R., Corral-Fernández, N., Cortez-Espinosa, N., Ruiz-Cabrera, M., Portales-Pérez, D., 2014. *In vitro* assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *International Journal of Biological Macromolecules* 63, 181–187.
URL <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.039>
- Mueller, M., Schwarz, S., Viernstein, H., Loeppert, R., Praznik, W., 2016. Growth of selected probiotic strains with fructans from agaves and chicory. *Agro Food Industry Hi-Tech* 27 (3), 54–57.
URL <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G. L., Solymos, P., H. Stevens, M. H., Wagner, H., 2008. The vegan Package: Community Ecology Package. R package: Version 1.15-1. Recuperado de: <http://cran.r-project.org/>, <http://vegan.r-forge.r-project.org>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41, D590–D596.
URL <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rendón-Huerta, J. A., Juárez-Flores, B., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., Delgado-Portales, R. E., 2012. Effects of different sources of fructans on body weight, blood metabolites and fecal bacteria in normal and obese non-diabetic and diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 67, 64–70.
URL <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0266-9>
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Leotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* 104, S1–S63.
URL <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>
- Rozan, P., Nejdí, A., Hidalgo, S., Bisson, J.-F., Desor, D., Messaoudi, M., 2008. Effects of lifelong intervention with an oligofructose-enriched inulin in rats on general health and lifespan. *British Journal of Nutrition* 100 (6), 1192–1199.
URL <http://doi.org/10.1017/S0007114508975607>

- SAGARPA, 2001. Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Reporte técnico, Diario Oficial de la Federación (2001, 18 de Junio). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Sánchez-Marroquín, A., Hope, P. H., 1953. Agave juice: fermentation and chemical composition studies of some species. *Agricultural and Food Chemistry* 1 (3), 246–249.
URL <https://doi.org/10.1021/jf60003a007>
- Santiago-García, P. A., López, M. G., 2014. Agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice. *Food Function* 5 (12), 3311–3319.
URL <https://doi.org/10.1039/C4F000561A>
- Savage, D. C., 1986. Gastrointestinal Microflora. *Annual Review of Nutrition* 6, 155–178.
URL <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.001103>
- Schenk, M., Bouchon, A., Seibold, F., Mueller, C., 2007. TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 117 (10), 3097–3106.
URL <https://doi.org/10.1172/JCI30602>
- Secretaría de Salud, 1984. Ley General de Salud, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título séptimo: de la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación, Capítulo único, Artículos 121-126. Reporte técnico, Diario Oficial de la Federación (1984, 7 de Febrero). Secretaría de Salud.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A., 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite* 51, 456–467.
URL <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>
- Slavin, J., 2013. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5 (4), 1417–1435.
URL <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Sosa-Herrera, M. G., Delgado-Reyes, V. A., 2016. Alimentos Funcionales de hoy. OmniaScience, Barcelona, España, Cap. 4. Propiedades funcionales y aplicaciones tecnológicas de los fructanos, pp. 97–116.

- Tannock, G. W., Lawley, B., Munro, K., Pathmanathan, S. G., Zhou, S. J., Makrides, M., Gibson, R. A., Sullivan, T., Prosser, C. G., Lowry, D., Hodgkinson, A. J., 2013. Comparison of the compositions of the stool microbiotas of infants fed goat milk formula, cow milk-based formula, or breast milk. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (9), 3040–3048.
URL <https://doi.org/10.1128/AEM.03910-12>
- Topping, D. L., Clifton, P. M., 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews* 81 (3), 1031–1064.
URL <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>
- Urías-Silvas, J. E., Cani, P. D., Delmée, E., Neyrinck, A., López, M. G., Delzenne, N. M., 2008. Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasylirion* spp. *The British Journal of Nutrition* 99, 254–261.
URL <http://doi.org/10.1017/S0007114507795338>
- Van Arkel, J., Sévenier, R., Hakkert, J. C., Bouwmeester, H. J., Koops, A. J., Van Der Meer, I. M., 2014. Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, Cap. 2. Fructan biosynthesis regulation and the production of tailor-made fructan in plants, pp. 5–22.
- Walker, G. J., Hope, P. M., 1963. The action of some α -amylases on starch granules. *Biochemical Journal* 86, 452.
URL <https://doi.org/10.1042/bj0860452>

Artículo publicado

Title

Effects of Agave Fructans, Inulin, and Starch on Metabolic Syndrome Aspects in Healthy Wistar Rats.

Authors

Evelyn Regalado-Rentería, Juan Rogelio Aguirre-Rivera, Cesar Ivan Godínez-Hernandez, Juan Carlos García-Lopez, A. Cuauhtemoc Oros-Ovalle, Fidel Martínez-Gutierrez, Marco Martinez-Martinez, Stefan Ratering, Sylvia Schnell, Miguel Angel Ruíz-Cabrera, and Bertha Irene Juarez-Flores*

Journal

ACS Omega

DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c00272>

Accepted: April 27, 2020

Capítulo III

Microbiota, histología colónica y parámetros metabólicos en
ratas Wistar con cáncer de colon suplementadas con fructanos
de Agaves y achicoria

Abstract

Although some cases of colorectal cancer are inheritable, most of them are correlated with unhealthy lifestyle and diet; thus, the decrease in the consumption of red or processed meats and the increase in foods with a high content of soluble fiber reduce the risk of its development due to its prophylactic potential. In Wistar rats with azoxymethane-induced colonic carcinogenesis, supplemented 10 % with commercial chicory (I) and *Agave tequilana* (ATC) fructans and maguey stem fructans with optimal physiological maturity (OPM) of *A. salmiana* (AS) and *A. tequilana* (ATE), some physiological effects were evaluated for 24 weeks. During the experimental period, body weight was recorded. At the end, glucose, total cholesterol and serum triglycerides were quantified, the colonic and cecal contents were weighed, adipose tissue, liver and colon were dissected, and the main fecal bacterial populations were identified by sequencing. Serum concentrations of glucose, cholesterol and triglyceride were similar among the treatments evaluated. Cecal content was significantly increased with fructans supplementation with respect to the control treatment. Histological analysis showed the chemopreventive effect of fructans with fewer aberrant cryptic foci compared to the control. The genera *Lactobacillus*, *Romboutsia* and *Faecalibaculum* stood out in the faecal microbiota. In general, the supplementation with whole fructans of *A. salmiana* and *A. tequilana* had beneficial effects in animals with colonic carcinogenesis.

Key words: *Colon cancer, Agave salmiana, aberrant crypt foci, microbiota*

Resumen

Aunque algunos casos de cáncer colorectal son heredables, la mayoría de ellos están correlacionados con estilo de vida y dieta poco saludables; así, la disminución del consumo de carnes rojas o procesadas y el incremento de alimentos con alto contenido de fibra soluble reducen el riesgo de su desarrollo debido a su potencial profiláctico. En ratas Wistar con carcinogénesis colónica inducida con azoximetano, suplementadas al 10 % con fructanos comerciales de achicoria (I) y *Agave tequilana* (ATC) y fructanos de tallos de magueyes con madurez fisiológica óptima (MFO) de *A. salmiana* (AS) y *A. tequilana* (ATE), se evaluaron algunos efectos fisiológicos durante 24 semanas. Durante el periodo experimental se registró el peso corporal. Al finalizar, se cuantificaron glucosa, colesterol total y triglicéridos séricos, se pesaron los contenidos colónico y cecal, se disecó el tejido adiposo, hígado y colon, y se identificaron las principales poblaciones bacterianas fecales mediante secuenciación. Las concentraciones séricas de glucosa, colesterol y triglicéridos fueron similares entre los tratamientos evaluados. El contenido cecal se incrementó significativamente con la suplementación de fructanos con respecto al tratamiento testigo. El análisis histológico evidenció el efecto quimiopreventivo de los fructanos con menor número de fosas crípticas aberrantes en comparación con el testigo. Los géneros *Lactobacillus*, *Romboutsia* y *Faecalibaculum* destacaron en la microbiota fecal. En general, la suplementación con fructanos íntegros de *A. salmiana* y *A. tequilana* tuvo efectos benéficos en animales con carcinogénesis colónica.

Palabras clave: Cáncer *de colon*, *Agave salmiana*, *fosas crípticas aberrantes*, *microbiota*

9

Introducción

En individuos sanos, el equilibrio de la microbiota intestinal mantiene una homeostasis con el hospedero, sin embargo, la disbiosis provocada por desequilibrios entre algunas poblaciones bacterianas potencialmente patógenas y/o alta exposición a sus metabolitos ha sido ligada a algunas enfermedades en tejidos mucosos como el cáncer cervical y gástrico causados respectivamente por el virus del papiloma humano y la bacteria *Helicobacter pylori* (zur Hausen, 2009).

Como el intestino grueso contiene la más compleja, abundante y metabólicamente activa proporción de microbiota en el organismo (más de 10^{11} células por gramo de contenido) (Eckburg *et al.*, 2005), el involucramiento de la microbiota intestinal sobre el posible inicio y progresión en enfermedades intestinales como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y cáncer colorectal (CCR) es un área activa de investigación (Sasaki y Klapproth, 2012; Louis *et al.*, 2014).

El CCR se encuentra entre las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, es el tercer tipo de cáncer más común (después del cáncer de pulmón y mama) y la cuarta causa más común de muerte en pacientes oncológicos (Torre *et al.*, 2015) aproximadamente 1.2 millones de personas son diagnosticadas con CCR en el mundo y la mayoría de los casos ocurre en países desarrollados (Jemal *et al.*, 2011).

Aunque algunas formas del CCR son heredables (Burn *et al.*, 2011), la mayoría de los casos de padecimiento son correlacionados con dieta y estilo de vida poco saludables (Fearhead *et al.*, 2002; Gill y Rowland, 2002), estudios sugieren que modificar hábitos dañinos para el organismo como disminuir el consumo de carnes rojas y/o procesadas, así como incrementar el consumo alimentos con alto contenido de fibra soluble reduce el riesgo de su desarrollo mediante la prevención (Reddy, 1999; Slavin, 2013; Serban, 2014). Ejemplos de fibra soluble son los fructanos y fructooligosacáridos (FOS), que al incluirlos

en la dieta se modifica significativamente la población y características metabólicas de las bacterias gastrointestinales que modulan las funciones entéricas y promueven la prevención del CCR (Buddington *et al.*, 2002a,b; Femia *et al.*, 2002). El incluir fructanos en la alimentación de forma cotidiana en un estado de salud óptimo tiene por objetivo obtener un efecto quimiopreventivo colorrectal, debido a su potencial para inhibir o retardar el desarrollo y la progresión de la neoplasia a través de mecanismos como la producción de ácidos grasos de cadena corta tras su fermentación por la microbiota intestinal y la alteración de las expresiones génicas en las células tumorales (Liong, 2008).

Por las condiciones éticas y heterogéneas que implica la investigación de pacientes con CCR, el uso de modelos animales con carcinogénesis colónica inducida con agentes químicos es una opción adecuada de investigación con unidades experimentales homogéneas para la evaluación preclínica de tratamientos quimiopreventivos y el modelo de carcinogénesis con roedores utilizando azoximetano (AOM) es el más usado y adecuado para predecir y extrapolar la eficacia quimiopreventiva en humanos (Corpet y Tache, 2002; Corpet y Pierre, 2005) mediante la inducción de formación de fosas crípticas aberrantes (FCA), que son un grupo heterogéneo de lesiones preneoplásicas de la carcinogénesis colónica que contienen múltiples alteraciones microscópicas, epigénéticas y fenotípicas y son utilizadas como biomarcadores en las etapas tempranas del CCR (Paulsen *et al.*, 1994; Fenoglio-Preiser y Noffsinger, 1999) son correlacionadas en un 100 % en los pacientes con cáncer de colon (Perše y Cerar, 2010) y han sido utilizadas como punto final en la identificación y evaluación de la función preventiva de compuestos naturales y farmacológicos, así como de factores dietéticos y ambientales en el proceso de carcinogénesis colónica en modelos animales (Reddy, 1999; Pool-Zobel, 2005; Femia y Caderni, 2008).

Así, el objetivo del presente estudio fue comparar la estructura histológica y la diversidad del microbioma bacteriano intestinal, además de cuantificar parámetros séricos de ratas Wistar con inicios de carcinogénesis colónica suplementadas con cuatro fructanos: comerciales (de inulina de achicoria y *A. tequilana*) y extraídos de tallos de *A. salmiana* y *A. tequilana* en condiciones similares de madurez fisiológica.

10

Materiales y métodos

10.1. Fructanos

Se utilizaron fructanos comerciales de achicoria (*Cichorium intybus* L.) (Orafti[®] Synergy¹, Tienen, Bélgica) y de *Agave tequilana* F.A.C. Weber (Inufib[™], Jalisco, México). Además de fructanos de *A. salmiana* y *A. tequilana* en condiciones similares de madurez fisiológica óptima (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001) y extracción (Godínez-Hernández *et al.*, 2016c).

10.2. Animales y dietas

Se utilizaron 30 ratas macho Wistar con un peso entre 200-250 g proporcionadas por el Centro de Biociencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Cada rata se tomó como una unidad experimental y se les mantuvo en cajas de polipropileno individuales en una habitación con temperatura entre 20 y 25°C, humedad relativa entre 30 y 60% y el ciclo circadiano invertido de 12 h luz/12 h oscuridad. Los animales experimentales se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones éticas locales de cuidado y mantenimiento correspondientes (SAGARPA, 2001; Secretaría de Salud, 1984). El protocolo fue aprobado por el comité de ética (CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20160830).

Los animales se sometieron a un periodo de adaptación de una semana con una ración de 25 g *per cápita* de alimento estándar para roedores (Chow[®] 5008, Missouri, EE.UU.) y agua *ad libitum*. Posteriormente, se distribuyeron aleatoriamente en cinco tratamientos (n=6): alimento estándar comercial (**C**) o 90% de alimento estándar comercial más 10% de cada uno de los fructanos siguientes: inulina de achicoria comercial (**I**), fructanos comerciales de *A. tequilana* (**ATC**), fructanos de *A. tequilana* (**ATE**) y de *A. salmiana* (**AS**) extraídos en el laboratorio.

Se administraron 25 g de alimento con o sin suplementación diariamente al iniciar el periodo de oscuridad de las unidades experimentales.

El periodo experimental duró 24 semanas; cada semana se registró el cambio de peso corporal de los animales. Al finalizar el periodo experimental, los animales se sacrificaron con pentobarbital sódico [0.063 g/mL] (SEDALPHARMA[®], Pet 's Pharma, México) a una dosis de 40 mg/kg de peso por vía intraperitoneal; luego se disecó y pesó el tejido adiposo abdominal, se disecó el intestino y se tomaron muestras para los análisis histológicos y se colectaron muestras de heces al inicio y final del experimento y se almacenaron (-60°C) para los posteriores análisis.

10.3. Inducción de inicios de carcinogénesis colónica

Para evaluar los efectos metabólico, modulador de la microbiota intestinal y quimiopreventivo sobre la formación de fosas crípticas aberrantes (FCA), después de ocho semanas del inicio de los tratamientos se indujo la etapa preneoplásica del cáncer de colon; utilizando 15 mg del fármaco carcinogénico azoximetano (AOM) (Sigma-Aldrich[®], San Louis Missouri, EE.UU., A2853) por kg de peso corporal del animal por vía intraperitoneal disuelto en solución salina estéril (0.85 %) (Reddy *et al.*, 1997), en dos administraciones semanales consecutivas, en la semana ocho y nueve del periodo experimental. Los animales siguieron con sus tratamientos hasta la semana 24 cuando concluyó el periodo experimental.

10.4. Análisis bioquímico de muestras séricas

Al iniciar y finalizar el periodo experimental, se obtuvieron muestras sanguíneas mediante punción de la vena caudal de cada unidad experimental, al inicio y al final del experimento. Después de 12 h de ayuno, se extrajeron 600 µL de sangre completa; esta muestra se dejó 10 min en reposo y luego se centrifugó a 2500 rpm por 10 min (SOLBAT, Modelo J-40, Puebla, México) para obtener el suero, el cual fue almacenado a -20°C hasta su análisis. Las variables evaluadas en este suero fueron glucosa, colesterol total y triglicéridos, para lo cual se utilizaron kits enzimáticos comerciales (Bayer, Sées, Francia) y un equipo semiautomatizado para análisis químicos (Excel[™], Stanbio, EE.UU.).

10.5. Análisis histológico

Al finalizar el periodo experimental, el intestino completo se disecó y se separó el colon; posteriormente se pesaron los contenidos del ciego y del colon y se almacenaron a -20°C ; posteriormente el colon se enjuagó con solución salina estéril (0.85 %), se le realizó una incisión longitudinal y se fijó en papel filtro con el lumen hacia el exterior. Fue fijado en paraformaldehído (Sigma-Aldrich[®], Milwaukee, EE.UU.) al 10 % en buffer de fostatos. Después de la fijación, las muestras se deshidrataron con gradientes de alcohol-xilol, se realizó la inclusión en parafina y fueron cortadas longitudinalmente (6 μm) y teñidas con hematoxilina-eosina. Los tejidos se observaron por microscopía de campo claro a 40X (Olympus CellSens Entry, Olympus Corporation, Tokio, Japón) y se realizaron mediciones del diámetro de las FCA de la mucosa colónica.

10.6. Extracción del ADN genómico

Se colectaron heces al finalizar el periodo experimental y se almacenaron a -60°C hasta el proceso de extracción del ADN de las poblaciones bacterianas según la metodología de Tannock *et al.* (2013) con algunas modificaciones.

Al obtener el ADN, se resuspendió con 50 μL de agua inyectable estéril tibia. Se le agregó 1 μL de ARNasa A (5 mg/mL) (QIAGEN, Cat No.19101) y se incubó 1 hr a 37°C . La concentración del ADN fue determinada por absorbancia a 230 nm y la pureza fue estimada por la determinación del radio A260/A280 con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific[™], Massachusetts, EE.UU.) posteriormente todas las muestras fueron secadas a 40°C y se ajustaron a 500 ng para comparar la estructura y diversidad del microbioma bacteriano mediante la amplificación de un fragmento del gen ARNr 16S y secuenciación de alto rendimiento.

10.7. Amplificación por PCR y secuenciación del fragmento del gen bacteriano ARNr 16S

Las secuencias parciales de la región hipervariable del fragmento del gen ARNr 16S (V4 y V5) de la línea de base y el ADN de muestreo de heces final se amplificaron por PCR usando los cebadores 520 F (5'- AYTGGGYDTAAAGNG-3 ') y 907 R (5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3 ') (Engelbrektson *et al.*, 2010) con dos ejecuciones de PCR según lo recomendado por Kaplan *et al.* (2019).

Los productos de PCR se eluyeron y purificaron en gel de agarosa (kit de purificación QIAquick PCR, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), luego se eliminaron los dímeros de los cebadores con perlas NucleoMag® (kit de limpieza NGS, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Alemania). La concentración del producto de PCR purificado se estimó con el kit de ensayo Qubit dsDNA HS mediante fluorómetro Qubit®3.0 (Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.) y la concentración se ajustó a 1 µM. Los productos de PCR se agruparon y la concentración final se ajustó a 26 pM. El producto agrupado se usó para PCR en emulsión con el kit Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 (Thermo Fisher Scientific™) usando Ion One Touch 2 (Life Technologies). El producto final se cargó en un chip 314 o 318 para la posterior secuenciación usando un secuenciador Ion PGM™ (Thermo Fisher Scientific™).

La calidad denoising, la verificación de quimera y la agrupación de variantes de secuencia de amplicón (ASVs), un análogo de mayor resolución de la OTU tradicional, se realizó utilizando QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, por sus siglas en inglés) (Versión 2018.4-2018.8, <https://qiime2.org>) plugin DADA2 (Callahan *et al.*, 2016).

Las secuencias fueron asignadas a la taxonomía por un clasificador pre-entrenado *Naive Bayes* en la base de datos Silva 132 (Quast *et al.*, 2013). Después de la afiliación taxonómica, se filtraron las secuencias mitocondriales y cloroplásticas. La riqueza microbiana, que mide el número de taxones en cada muestra (abundancia de microbios), se determinó calculando el número de ASV observados. A semejanza, las medidas del número relativo de taxones en las muestras (la frecuencia de cada taxón se detectó en una muestra) se midió utilizando los índices de Shannon y Simpson. La preparación de los datos de la secuencia del microbioma se llevó a cabo utilizando el software R studio 1.1.419, los paquetes R Phyloseq 1.22.3 (McMurdie y Holmes, 2013) y Vegan 2.4-6 (Oksanen *et al.*, 2008).

10.8. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue con asignación completamente al azar de cinco tratamientos, consistente en la suplementación alimentaria (10 %) con los cuatro polisacáridos (I, ATC, ATE y AS) y sin suplementación (C), a seis repeticiones, donde cada rata fue considerada como una unidad experimental. Con las variables estimadas semanalmente se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo. A las variables con una medición al finalizar el experimento se les hizo un análisis de varianza y comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS versión 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, EE.UU.). El grado de significación de los datos se basó en una probabilidad ($p < 0.05$).

El análisis de componentes principales (PCoA) y el mapa de calor fueron evaluados para visualizar diferencias entre tratamientos. La abundancia de bacterias y el número relativo de taxones en las muestras al comienzo y al final de la intervención de cada grupo se llevó a cabo por la disimilitud de Bray Curtis. El análisis estadístico multivariable se realizó con el software R studio 1.1.419, paquetes R paquetes R ggplot2, ade4, factoextra, FactoMineR y NMF.

11

Resultados y discusión

11.1. Cambios del peso corporal

La inducción de carcinogénesis colónica fue realizada hasta la semana ocho y nueve del experimento para observar el posible efecto quimiopreventivo de los tratamientos. En la segunda semana de inducción de carcinogénesis (novena) disminuyó el peso corporal de todas las unidades experimentales (**Figura 11.1**) sin embargo, retomaron su curva de crecimiento normal al continuar el periodo experimental; al realizar el análisis estadístico se evidenció que el cambio de peso corporal se mantuvo sin cambios estadísticamente significativos entre tratamientos durante y al finalizar el periodo experimental (**Cuadro 11.1**).

Cuadro 11.1: Peso corporal (g) basal (B) y final (F) de las unidades experimentales.

Tratamiento	B	F	Ganancia (F-B)
C	205.57 ± 45.57 ^a	510.00 ± 70.89 ^a	304.43 ± 79.83 ^a
I	218.29 ± 56.25 ^a	508.33 ± 26.96 ^a	276.17 ± 69.16 ^a
ATC	220.33 ± 52.09 ^a	494.17 ± 40.18 ^a	273.83 ± 79.59 ^a
ATE	219.83 ± 37.22 ^a	528.33 ± 35.59 ^a	308.50 ± 67.71 ^a
AS	215.33 ± 52.80 ^a	457.50 ± 60.64 ^a	242.17 ± 51.70 ^a

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias ± DE (n=6). ^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (p<0.05)

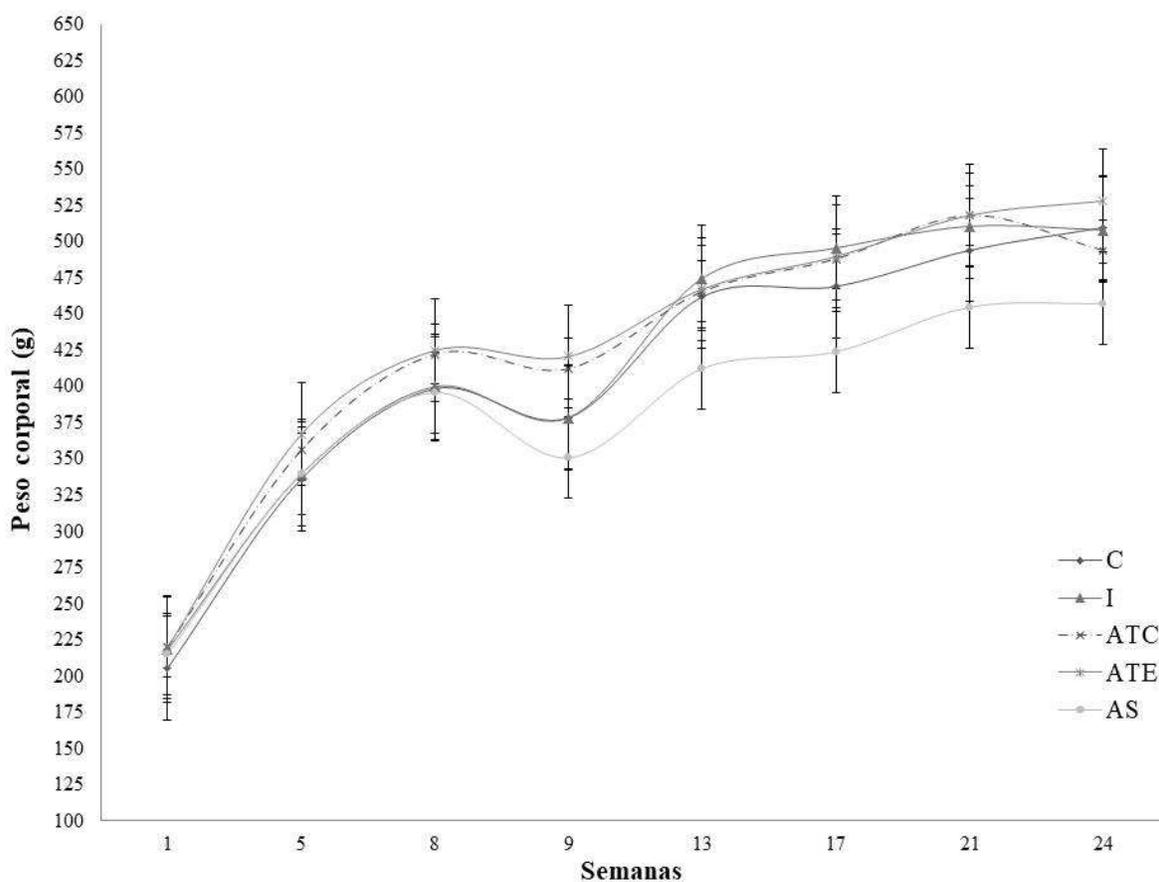


Figura 11.1: Cambios en el peso corporal (g) durante el periodo experimental. **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias \pm DE (n=6).

11.2. Tejido adiposo abdominal

En la **Figura 11.2** se resumen los efectos de los tratamientos en el peso del tejido adiposo abdominal. Los pesos medios (g) y estadísticamente similares fueron 12.60, 11.12, 10.75, 9.80 y 8.28 g para ATE, I, ATC, C y AS respectivamente. Los pesos de este tejido en los tratamientos con fructanos de maguay e inulina fueron estadísticamente similares entre sí.

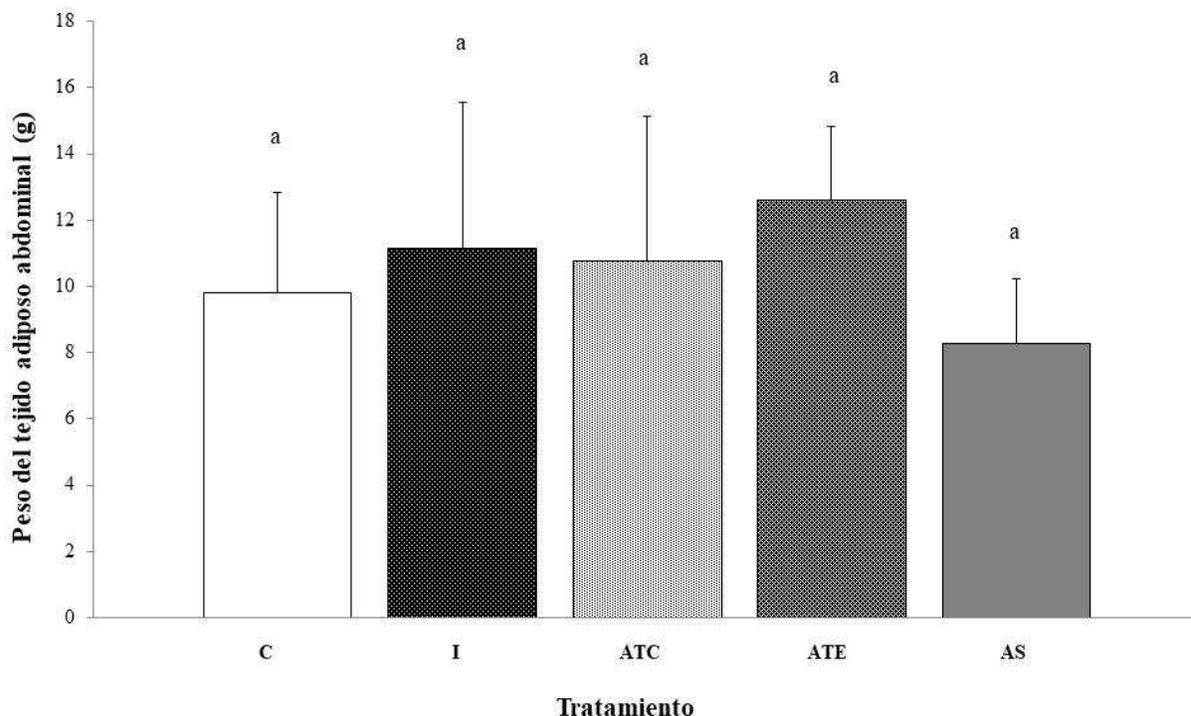


Figura 11.2: Peso del tejido adiposo abdominal (g). **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias \pm DE (n=6).

11.3. Contenido colónico y cecal

Se muestran en el **Cuadro 11.2** el peso de las heces contenidas en el intestino grueso (ciego y colon) de las ratas con inducción de carcinogénesis colónica al finalizar el periodo experimental. Al realizar el análisis estadístico se encontró que el contenido colónico fue estadísticamente similar entre los tratamientos evaluados, sin embargo, el contenido cecal fue diferente estadísticamente en las unidades experimentales testigo y las suplementadas con fructanos de maguey e inulina que fueron estadísticamente similares entre sí. En similitud a lo que se encontró en el presente trabajo, Hambly *et al.* (1997) y Pattananandecha *et al.* (2016) evidenciaron que al suplementar dietas enriquecidas en fibra soluble a unidades experimentales, se incrementa el contenido cecal al finalizar el periodo

experimental, debido principalmente al efecto de volumen de la fibra y al incremento de biomasa bacteriana. Y también a que los fructanos son principalmente fermentados en el ciego por la microbiota residente (Jenkins *et al.*, 1999).

Cuadro 11.2: Peso fresco del contenido colónico y cecal (g).

Tratamiento	Colónico	Cecal
C	2.10 ± 0.92 ^a	3.34 ± 0.36 ^a
I	2.33 ± 1.19 ^a	6.12 ± 1.22 ^a
ATC	2.80 ± 0.86 ^a	5.20 ± 1.37 ^a
ATE	2.58 ± 1.22 ^a	6.40 ± 1.46 ^a
AS	2.07 ± 0.95 ^a	5.10 ± 0.62 ^a

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias ± DE (n=6). ^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (p<0.05)

11.4. Efectos en las variables séricas

Debido a que la inducción de carcinogénesis colónica fue realizada hasta la semana ocho y nueve del experimento para observar el posible efecto quimiopreventivo de los tratamientos, al iniciar el experimento (B) y aún con las ratas en estado sano, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada una de las variables séricas cuantificadas, lo cual evidencia la homogeneidad original de las unidades experimentales (**Cuadro 11.3**). Al finalizar el experimento (F) en la semana 24, ninguna de las variables séricas evaluadas resultó significativamente alterada entre tratamientos. En el presente estudio se encontró un mantenimiento del peso corporal y los parámetros séricos, lo que resulta benéfico para el organismo, ya que algunos pacientes con carcinogénesis colorectal durante el desarrollo y progresión de la enfermedad, presentan disminución considerable de peso corporal (Fearon, 1992) e incremento en las concentraciones de triglicéridos y colesterol (Meance *et al.*, 2003).

Cuadro 11.3: Cuantificación de variables séricas (mg/dL) evaluadas al inicio (B) y al final (F) del periodo experimental de ratas con inicios de carcinogénesis colónica.

Tratamiento	Glucosa		Colesterol total (mg/dL)		Triglicéridos	
	B	F	B	F	B	F
C	89.90 ± 25.86 ^a	111.95 ± 11.84 ^a	71.66 ± 13.29 ^a	54.62 ± 14.59 ^a	47.92 ± 11.89 ^a	76.67 ± 25.21 ^a
I	89.43 ± 26.31 ^a	90.53 ± 19.43 ^a	63.04 ± 14.98 ^a	62.29 ± 12.32 ^a	60.14 ± 22.45 ^a	99.79 ± 44.42 ^a
ATC	85.23 ± 8.49 ^a	95.90 ± 27.92 ^a	68.87 ± 12.53 ^a	54.69 ± 15.57 ^a	51.24 ± 11.52 ^a	90.66 ± 29.99 ^a
ATE	92.53 ± 13.74 ^a	112.02 ± 10.13 ^a	72.35 ± 8.93 ^a	59.74 ± 14.76 ^a	69.71 ± 31.72 ^a	82.48 ± 39.19 ^a
AS	93.76 ± 21.38 ^a	111.07 ± 27.65 ^a	68.52 ± 11.65 ^a	60.08 ± 26.38 ^a	52.24 ± 25.89 ^a	70.29 ± 18.28 ^a

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias ± DE (n=9). ^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (p<0.05)

11.5. Análisis histológico

En el estudio de 15 semanas realizado por Dávila-Céspedes *et al.* (2014) en el que la inducción de carcinogénesis colónica se realizó desde el inicio del experimento, se evidenció la disminución de la cantidad de FCA en el colón de ratas suplementadas con fructanos de *A. salmiana* (20.5) e inulina de achicoria (7.0) en comparación con el tratamiento sin suplementación (39.0), en el presente estudio de 24 semanas (con nueve semanas previas de tratamiento a la inducción de carcinogénesis) se encontró y corroboró la disminución estadísticamente significativa de la cantidad de FCA de todos los tratamientos con suplementación en comparación con el tratamiento testigo (**Cuadro 11.4**).

Cuadro 11.4: Diámetro y cantidad de fosas crípticas aberrantes (FCA) en las criptas de Lieberkühn.

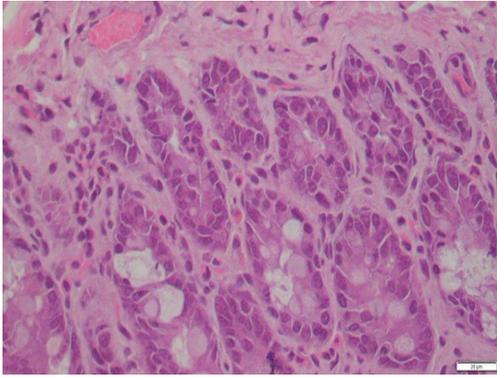
Tratamiento	Diámetro de FCA (μm)	Cantidad de FCA
C	30.37 ± 9.55^b	15.33 ± 0.57^a
I	38.81 ± 5.36^{ab}	11.66 ± 0.54^b
ATC	39.86 ± 8.39^a	10.00 ± 1.00^{bc}
ATE	37.42 ± 6.58^{ab}	9.66 ± 0.57^c
AS	43.16 ± 2.25^a	7.66 ± 0.55^d

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias \pm DE (n=6). ^aMedias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

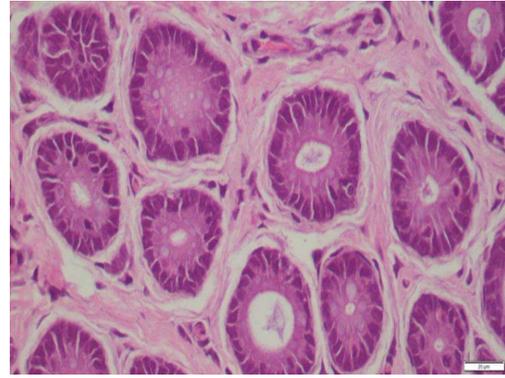
En las microfotografías del colon (**Figura 11.3**) se observan el efecto sobre la microarquitectura del tejido al finalizar el periodo experimental, en el tratamiento testigo (C) se observa proliferación regenerativa de FCA con contornos irregulares y anisocitosis, pleomorfismo y atipia nuclear, además hay despoblación de células mucosecretoras caliciformes y cuerpos apoptóticos en el epitelio, además de desorganización epitelial con mitosis atípicas. Waly *et al.* (2014) sugiere que el aumento en la actividad mitótica de las criptas puede sugerir una regeneración en respuesta a la lesión inducida por el AOM. También en los tejidos del colon de las ratas con los tratamientos con fructanos se observaron algunas características de irregularidad y asimetría en las microcriptas, pero se encontró una estructura más uniforme y atipia leve en comparación con en el tratamiento testigo.

Aunque el modelo animal de ratas con inducción de carcinogénesis con AOM no exenta ni reemplaza del estudio con pacientes, ni representa totalmente la complejidad del cáncer de colon humano, es una herramienta valiosa para estudiar con unidades experimentales homogéneas la progresión, desarrollo y quimprevención de compuestos terapéuticos emergentes (Perše y Cerar, 2010). En el presente estudio se concuerda con el estudio de Femia *et al.* (2002), que evidencia que los prebióticos disminuyen la carcinogénesis inducida por AOM. Dichos autores mencionan que los mecanismos por los cuales los prebióticos ejercen su acción no son aún claros, pero los resultados presentados sugieren que pueden actuar a través de una combinación de mecanismos que implican un aumento en la producción de SCFA, una menor actividad proliferativa y una variación en la expresión de algunas enzimas involucradas en la patogénesis del cáncer de colon.

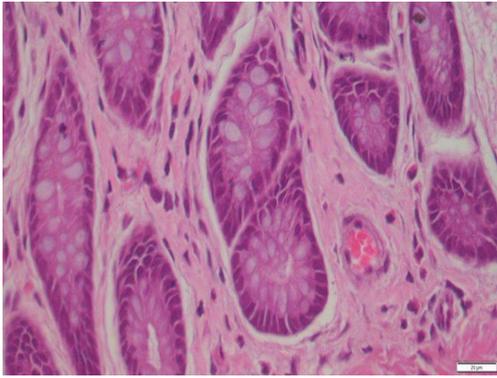
Fernández *et al.* (2016) mencionan que los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) ejercen efecto sobre el ciclo celular de colonocitos: los SCFA llegan al núcleo, donde inhiben la histona desacetilasa, lo cual permite la acetilación de las histonas, causando un cambio estructural en los nucleosomas y esto conduce a la expresión de genes implicados en la detención del ciclo celular y la apoptosis, como p21 y Bax. En su estudio de 45 semanas, Gourineni *et al.* (2011) evidenciaron una disminución del tamaño tumoral en el colon de ratas suplementadas con inulina y mencionan dos mecanismos de acción para el efecto de disminución de tumores: uno atribuido a los efectos directos de las dietas de tratamiento al actuar como factores antiproliferativos y antiangiogénicos o por un mecanismo indirecto como la estimulación de enzimas desintoxicantes y antioxidantes.



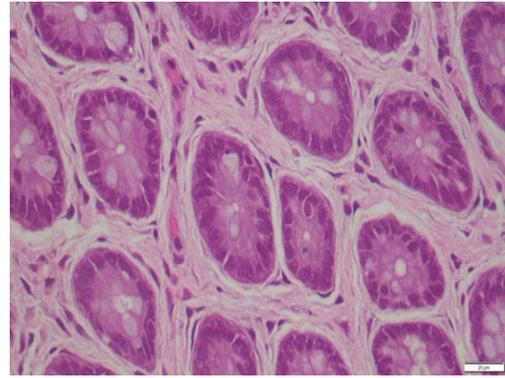
(C)



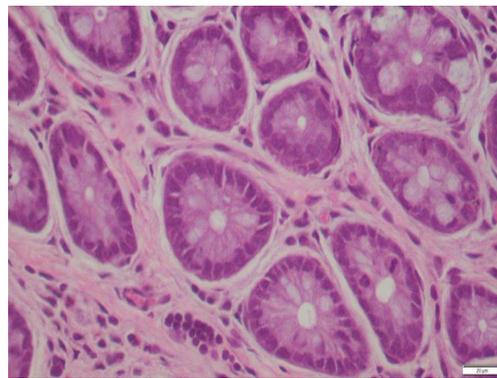
(I)



(ATC)



(ATE)



(AS)

Figura 11.3: Microfotografías del tejido colónico (40X) teñidos con hematoxilina-eosina. **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*.

11.6. Identificación de la diversidad bacteriana en la microbiota intestinal

En lo que respecta a la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos (Figura 11.4) se observó una mayor proporción de los géneros *Lactobacillus* y *Romboutsia* en todos los tratamientos al iniciar y finalizar el periodo experimental. Además, el mapa de calor mostró una mayor proporción de los géneros *Faecalibaculum* y *Lactobacillus* (Figura 11.5). Al realizar el análisis de componentes principales, no se encontraron diferencias estadísticas al finalizar el periodo experimental sobre los géneros bacterianos entre los tratamientos evaluados (Figura 11.6).

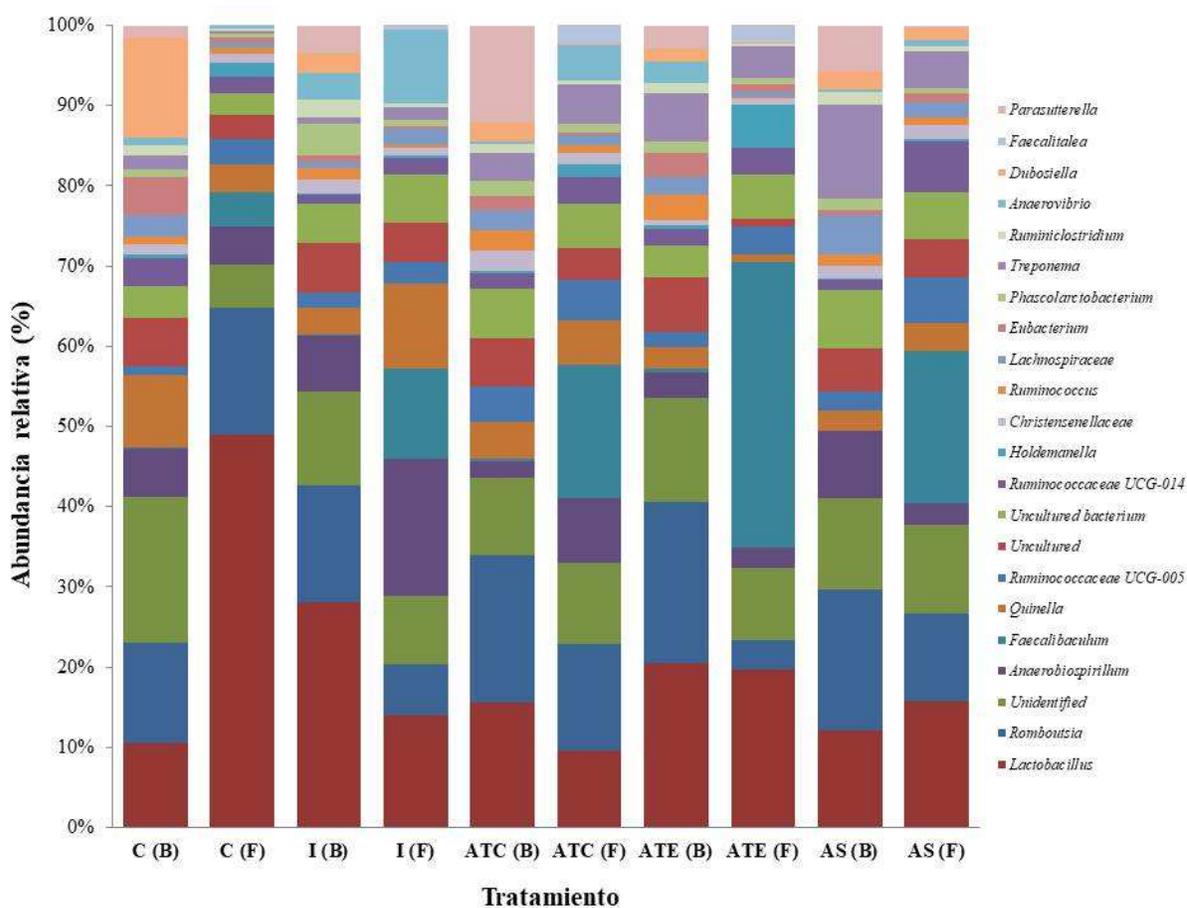


Figura 11.4: Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en las heces al principio (B) y al final del experimento (F) por tratamiento, cada taxón representa > 1% de la abundancia relativa promedio en cada tratamiento y se indica con un color diferente.

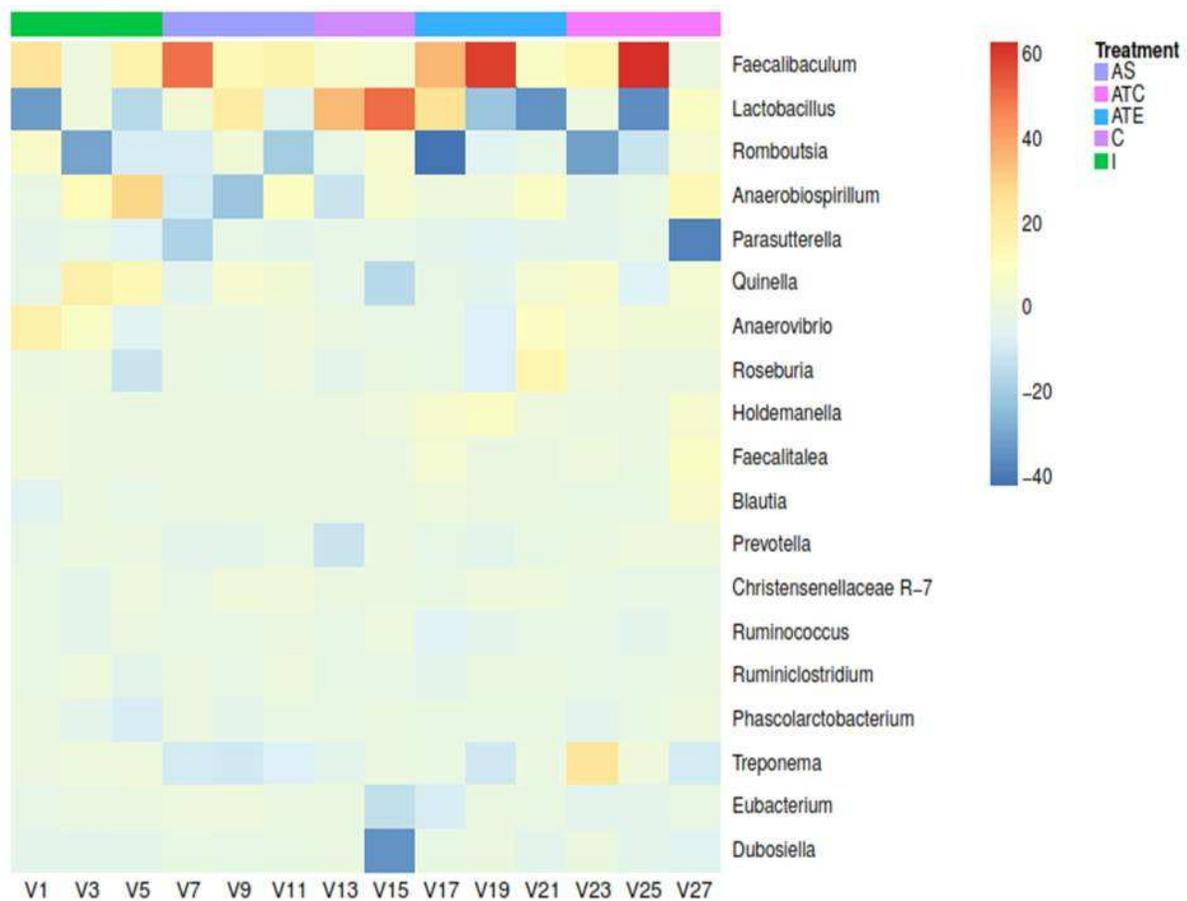


Figura 11.5: Mapa de calor de los valores delta para cada bacteria y tratamiento, que representa el porcentaje de AVS al comienzo y al final del experimento, el color rojo significa un aumento, mientras que el color azul una disminución, los números de cada color corresponden al valor de la diferencia.

En cuanto a estudios en modelos murinos con inducción de tumores con agentes carcinogénicos y sin suplementación de algún tratamiento quimiopreventivo, Zhu *et al.* (2014) evidenciaron que en unidades experimentales con CCR se mantiene como microbiota residente a nivel de *Phylum* un incremento de Firmicutes y Proteobacterias, pero disminución de Bacteroidetes en comparación con animales sanos. Y a nivel de género, los Bacteroides predominan en proporción, hay incremento en *Desulfovibrio*, *Erysipelotrichaceae* y *Fusobacterium*, mientras *Ruminococcus*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Treponema*, *Roseburia* y *Eubacterium* disminuyó en comparación con las ratas sanas. En otro trabajo, Zackular *et al.* (2013) evidenciaron que los géneros bacterianos que incrementan son *Bacteroides* spp., *Akkermansia* spp. y *Odoribacter* spp., mientras que otros disminuyen como *Prevotella* ssp. y *Porphyromonas* spp.

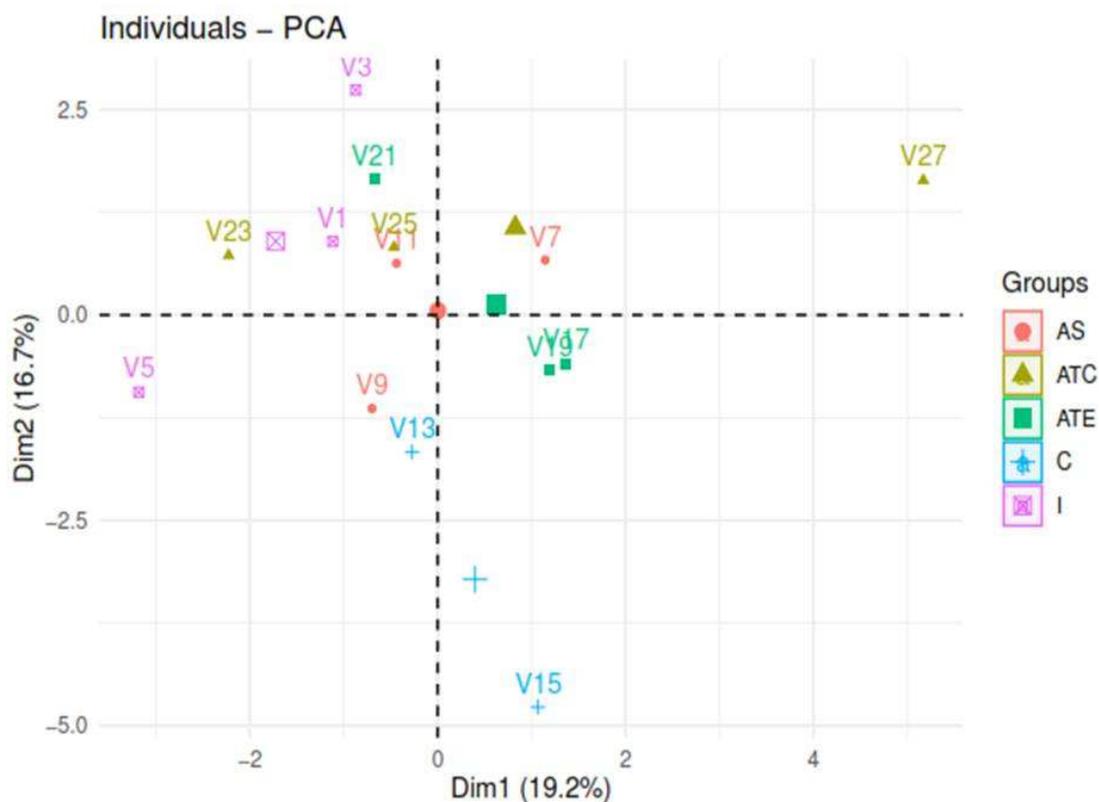


Figura 11.6: Análisis de componentes principales de las comunidades colónicas totales en ratas con carcinogénesis colónica al final del periodo experimental. **C:** Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*.

Wei *et al.* (2010) evaluaron los cambios en la microbiota intestinal de las heces de ratas con lesiones mucosas precancerosas inducidas con el carcinógeno 1,2-dimetil hidrazina y demostraron la abundancia de *Ruminococcus*, *Allobaculum* y *Fusobacterium* spp. Lo que evidencia discrepancias en los trabajos de investigación en cuanto a la clasificación predominante a nivel de género bacteriano. Por lo que, la lista de bacterias potencialmente carcinogénicas proporciona soporte de la hipótesis que la tumorigénesis es manejada por mecanismos y/o rutas que son comunes para muchos grupos bacterianos más que para un simple organismo (Louis *et al.*, 2014).

En cuanto al estudio de la modulación bacteriana con la suplementación de fructanos de maguey, en estudios *in vitro*, al adicionar fructanos de *Agave tequilana* para evaluar la influencia de su fermentación sobre la microbiota fecal, se observaron tendencias

de incremento de bifidobacterias y lactobacilos pero sin diferencias estadísticamente significativas comparadas con el tratamiento testigo (celulosa) (Gómez *et al.*, 2010).

Al adicionar fructanos de *A. angustifolia* al Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) se cuantificó un incremento de bifidobacterias en la porción colónica proximal y transversal (Allsopp *et al.*, 2013). En estudios *in vivo*, Dávila-Céspedes *et al.* (2014) evidenciaron cuantificaciones similares de lactobacilos en las heces de ratas sanas y con inducción de carcinogénesis colónica y sin diferencias estadísticas entre los estados de salud y los tratamientos testigo, inulina de achicoria y *A. salmiana*. Huazano García *et al.* (2017) evidenciaron mediante secuenciación, que los géneros predominantes de la microbiota colónica de ratones obesos suplementados con *A. tequilana* fueron *Klebsiella* y *Citrobacter*.

Por lo que, es evidente que la microbiota se modifica debido al estado fisiológico de salud, tratamiento y unidades experimentales utilizadas. Y debido a que generalmente el CCR tiene desarrollo paulatino y progresivo durante varios años, es un reto determinar si los cambios asociados a la microbiota son consecuencia de modificaciones fisiológicas o dietarias (Gill y Rowland, 2002; Louis *et al.*, 2014).

12

Conclusiones

Se encontró un mantenimiento de peso corporal de las unidades experimentales. El tejido adiposo abdominal se mantuvo sin diferencias significativas entre tratamientos. El peso del contenido colónico se mantuvo sin cambios significativos entre tratamientos, sin embargo, el contenido cecal incrementó significativamente en las unidades experimentales suplementadas con fructanos de agave e inulina estadísticamente similares entre si y diferentes al tratamiento testigo. Las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total y triglicéridos se mantuvieron sin diferencias entre tratamientos al finalizar el periodo experimental. La secuenciación evidenció incremento de los géneros *Faecalibaculum* y *Lactobacillus* en las heces. El consumo de fructanos de agaves y de inulina disminuye la formación de fosas crípticas aberrantes en el colon de unidades experimentales con carcinogénesis colónica inducida con azoximetano.

En general, la suplementación con fructanos íntegros de *A. salmiana* y *A. tequilana* tuvo efectos benéficos en animales con carcinogénesis colónica inducida con azoximetano.

Conflicto de intereses

No hay conflicto de intereses que declarar.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca doctoral otorgada. Al Dr. Manuel Núñez Muñoz (Nutrición y Genética Saludable, S.A. de C.V.) por su apoyo financiero mediante el apoyo del Programa de Estímulos a la Innovación PEI-CONACYT, No. 251911. Megafarma S.A. de C.V. por la donación de inulina de achicoria para el estudio. * Los financiadores no tuvieron ninguna función en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

Referencias citadas

- Aguirre-Rivera, J. R., Charcas-Salazar, H. F., Flores-Flores, J. L., 2001. El Maguey Mezcalero Potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, San Luis Potosí S. L. P., México, p. 78.
- Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Oyarzábal, I. S., Gill, C., Rowland, I., 2013. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* 22, 38–44.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.006>
- Buddington, K. K., Donahoo, J. B., Buddington, R. K., 2002a. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *The Journal of Nutrition* 132 (3), 472–477.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.472>
- Buddington, R. K., Kelly-Quagliana, K., Buddington, K. K., Kimura, Y., 2002b. Non-digestible oligosaccharides and defense functions: lessons learned from animal models. *British Journal of Nutrition* 87 (S2), S231–S239.
URL <http://dx.doi.org/10.1079/BJN/2002542>
- Burn, J., Gerdes, A. M., MacRae, F., Mecklin, J. P., Moeslein, G., Olschwang, S., Eccles, D., Evans, D. G., Maher, E. R., Bertario, L., Bisgaard, M. L., Dunlop, M. G., Ho, J. W., Hodgson, S. V., Lindblom, A., Lubinski, J., Morrison, P. J., Murday, V., Ramesar, R., Side, L., Scott, R. J., Thomas, H. J., Vasen, H. F., Barker, G., Crawford, G., Elliott, F., Movahedi, M., Pylvanainen, K., Wijnen, J. T., Fodde, R., Lynch, H. T., Mathers, J. C., Bishop, D. T., 2011. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: An analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *The Lancet* 378 (9809), 2081–2087.
URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61049-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61049-0)
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data.

- Nature Methods* 13 (7), 581.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Corpet, D. E., Pierre, F., 2005. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European Journal of Cancer* 41 (13), 1911–1922.
URL <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.06.006>
- Corpet, D. E., Tache, S., 2002. Most Effective Colon Cancer Chemopreventive Agents in Rats: A Systematic Review of Aberrant Crypt Foci and Tumor Data, Ranked by Potency. *Nutrition and Cancer* 43, 1–21.
URL <https://doi.org/10.1207/S15327914NC431>
- Dávila-Céspedes, A., Juárez-Flores, B. I., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., Oros-Ovalle, A. C., Loyola-Martínez, E. D., Andrade-Zaldívar, H., 2014. Protective effect of *Agave salmiana* fructans in Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Wistar Rats. *Natural Product Communications* 9 (10), 1503–1506.
URL <https://doi.org/10.1177/1934578X1400901025>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308 (5728), 1635–1638.
URL <https://doi.org/10.1126/science.11110591>
- Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., Hugenholtz, P., 2010. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. Reporte técnico, Lawrence Berkeley National Laboratory. University of California, USA.
- Fearnhead, N. S., Wilding, J. L., Bodmer, W. F., 2002. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin* 64 (1), 27–43.
URL <https://doi.org/10.1093/bmb/64.1.27>
- Fearon, K. C., 1992. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. *Proceedings of the Nutrition Society* 51, 251–265.
URL <https://doi.org/10.1079/PNS19920036>

- Femia, A. M., Caderni, G., 2008. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Medica* 74 (13), 1602–1607.
URL <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074577>
- Femia, A. P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K. J., Paglierani, M., Caderni, G., 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 23 (11), 1953–1960.
URL <https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1953>
- Fenoglio-Preiser, C. M., Noffsinger, A., 1999. Review Article: Aberrant Crypt Foci: A Review. *Toxicologic Pathology* 27 (6), 632–642.
URL <https://doi.org/10.1177/019262339902700604>
- Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del Río, I., Migulez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F., 2016. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods* 25, 511–522.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.032>
- Gill, C. I. R., Rowland, I. R., 2002. Diet and cancer: assessing the risk. *British Journal of Nutrition* 88 (S1), S73–S87.
URL <https://doi.org/10.1079/bjn2002632>
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., Becerra-Jiménez, J., 2016. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 22 (1), 59–72.
URL <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>
- Gómez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A., Costabile, A., 2010. *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology* 108 (6), 2114–2121.
URL <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04617.x>
- Gourineni, V. P., Verghese, M., Boateng, J., Shackelford, L., Bhat, N. K., Walker, L. T., 2011. Combinational effects of prebiotics and soybean against azoxymethane-induced

- colon cancer *in vivo*. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2011, 1–9.
URL <https://doi.org/10.1155/2011/868197>
- Hambly, R. J., Rumney, C. J., Fletcher, J. M., Rijken, P. J., Rowland, I. R., 1997. Effects of high-and low-risk diets on gut microflora-associated biomarkers of colon cancer in human flora-associated rats. *Nutrition and Cancer* 27 (3), 250–255.
URL <https://doi.org/10.1080/01635589709514534>
- Huazano García, A., Shin, H., López, M., 2017. Modulation of Gut Microbiota of Overweight Mice by Agavins and Their Association with Body Weight Loss. *Nutrients* 9 (821), 1–12.
URL <https://doi.org/10.3390/nu9090821>
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61, 69–90.
URL <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Vuksan, V., 1999. Inulin, oligofructose and intestinal function. *Journal of Nutrition* 129, S1431–S1433.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1431S>
- Kaplan, H., Ratering, S., Felix-Henningsen, P., Schnell, S., 2019. Stability of *in situ* immobilization of trace metals with different amendments revealed by microbial ¹³C-labelled wheat root decomposition and efflux-mediated metal resistance of soil bacteria. *Science of the Total Environment* 659, 1082–1089.
URL <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.441>
- Liong, M. T., 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and *in-vivo* evidence. *International Journal of Molecular Sciences* 9 (5), 854–863.
URL <https://doi.org/10.3390/ijms9050854>
- Louis, P., Hold, G. L., Flint, H. J., 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology* 12 (10), 661–672.
URL <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>
- McMurdie, P. J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8 (4), e61217.
URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- Meance, S., Boutron-Ruault, M.-C., Myara, A., Gerhardt, M. F., Marteau, P., Lavergne, A., Franchisseur, C., Bouley, C., 2003. Fecal primary bile acids and serum cholesterol are associated with colorectal adenomas. *Digestive Diseases and Sciences* 48 (9), 1751–1757. URL <https://doi.org/10.1023/A:1025443012049>
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G. L., Solymos, P., H. Stevens, M. H., Wagner, H., 2008. The vegan Package: Community Ecology Package. R package: Version 1.15-1. Recuperado de: <http://cran.r-project.org/>, <http://vegan.r-forge.r-project.org>.
- Pattananandecha, T., Sirilun, S., Duangjitcharoen, Y., Sivamaruthi, B. S., Suwannalert, P., Peerajan, S., Chaiyasut, C., 2016. Hydrolysed inulin alleviates the azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci by altering selected intestinal microbiota in Sprague–Dawley rats. *Pharmaceutical Biology* 54 (9), 1596–1605. URL <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1110597>
- Paulsen, J. E., Steffensen, I.-L., Namork, E., Alexander, J., 1994. Scanning electron microscopy of aberrant crypt foci in rat colon. *Carcinogenesis* 15 (10), 2371–2373. URL <https://doi.org/10.1093/carcin/15.10.2371>
- Perše, M., Cerar, A., 2010. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *BioMed Research International* 2011, 1–14. URL <https://doi.org/10.1155/2011/473964>
- Pool-Zobel, B. L., 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *British Journal of Nutrition* 93, 73–90. URL <https://doi.org/10.1079/BJN20041349>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41, D590–D596. URL <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Reddy, B. S., 1999. Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *Journal of Nutrition* 129 (7), 1478–1482. URL <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1478S>

- Reddy, B. S., Hamid, R., Rao, C. V., 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* 18 (7), 1371–1374.
URL <https://doi.org/10.1093/carcin/18.7.1371>
- SAGARPA, 2001. Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Reporte técnico, Diario Oficial de la Federación (2001, 18 de Junio). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Sasaki, M., Klapproth, J.-M. A., 2012. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Journal of Signal Transduction* 2012, 1–6.
URL <https://doi.org/10.1155/2012/704953>
- Secretaría de Salud, 1984. Ley General de Salud, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título séptimo: de la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación, Capítulo único, Artículos 121-126. Reporte técnico, Diario Oficial de la Federación (1984, 7 de Febrero). Secretaría de Salud.
- Serban, D. E., 2014. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer letters* 345 (2), 258–270.
URL <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.013>
- Slavin, J., 2013. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5 (4), 1417–1435.
URL <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Tannock, G. W., Lawley, B., Munro, K., Pathmanathan, S. G., Zhou, S. J., Makrides, M., Gibson, R. A., Sullivan, T., Prosser, C. G., Lowry, D., Hodgkinson, A. J., 2013. Comparison of the compositions of the stool microbiotas of infants fed goat milk formula, cow milk-based formula, or breast milk. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (9), 3040–3048.
URL <https://doi.org/10.1128/AEM.03910-12>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65, 87–108.
URL <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74>

- Waly, M. I., Al-Rawahi, A. S., Al Riyami, M., Al-Kindi, M. A., Al-Issaei, H. K., Farooq, S. A., Al-Alawi, A., Rahman, M. S., 2014. Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14, 60.
URL <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-60>
- Wei, H., Dong, L., Wang, T., Zhang, M., Hua, W., Zhang, C., Pang, X., Chen, M., Su, M., Qiu, Y., Zhou, M., Yang, S., Chen, Z., Rantalainen, M., Nicholson, J. K., Jia, W., Wu, D., Zhao, L., 2010. Structural shifts of gut microbiota as surrogate endpoints for monitoring host health changes induced by carcinogen exposure. *FEMS Microbiology Ecology* 73 (3), 577–586.
URL <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00924.x>
- Zackular, J. P., Baxter, N. T., Iverson, K. D., Sadler, W. D., Petrosino, J. F., Chen, G. Y., Schloss, P. D., 2013. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio* 4 (6), 1–9.
URL <https://doi.org/10.1128/mBio.00692-13>
- Zhu, Q., Jin, Z., Wu, W., Gao, R., Guo, B., Gao, Z., Yang, Y., Qin, H., 2014. Analysis of the intestinal lumen microbiota in an animal model of colorectal cancer. *PLoS ONE* 9 (3), 1–10.
URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090849>
- zur Hausen, H., 2009. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. *Virology* 392, 1–10.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.001>

Capítulo IV

Cuantificación de nitrógeno en las heces y de minerales en el
hueso de ratas Wistar sanas y con cáncer de colon
suplementadas con fructanos de Agave y achicoria

Abstract

Ingestion of soluble fiber tends to increase fecal nitrogen excretion; furthermore, after fermentation the concentration of short-chain fatty acids increases, thereby lowering the pH and increasing the intestinal solubility and absorption of minerals, and possibly their bone absorption. The mineral content in the femur and fecal nitrogen were quantified in healthy and colonic carcinogenesis Wistar rats supplemented with 10 % rice starch (RS), commercial chicory fructans (I) and *Agave tequilana* (ATC) and extracted fructans of stems of *A. salmiana* (AS) and *A. tequilana* (ATE) with optimal physiological maturity (OPM). In the femurs of the experimental units, their ashes and minerals were quantified using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Fecal nitrogen was quantified according to AOAC 993.13 methodology (Dumas method). The femur of healthy and cancerous rats kept without significant differences between treatments in its length, dry weight and ash content. The ash content in the cancer rats was markedly lower than in the healthy rats. The fecal nitrogen was only higher in healthy rats and supplemented with I and ATC fructans.

Key words: *Prebiotics, femur traits, minerals, fecal nitrogen, Colon cancer*

Resumen

La ingestión de fibra soluble tiende a incrementar la excreción fecal de nitrógeno; además, tras su fermentación se incrementa la concentración de ácidos grasos de cadena corta, con lo cual se abate el pH y se incrementa la solubilidad y absorción intestinal de los minerales, y posiblemente su absorción ósea. Se cuantificó el contenido de minerales en el fémur y de nitrógeno fecal en ratas Wistar sanas y con carcinogénesis colónica suplementadas al 10% con almidón de arroz (A), fructanos comerciales de achicoria (I) y de *Agave tequilana* (ATC) y fructanos extraídos de tallos de *A. salmiana* (AS) y *A. tequilana* (ATE) con madurez fisiológica óptima (MFO). En los fémures de las unidades experimentales se cuantificaron sus cenizas y minerales mediante espectrometría por emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El nitrógeno fecal se cuantificó de acuerdo con la metodología AOAC 993.13 (método Dumas). El fémur de las ratas sanas y cancerosas se mantuvo sin diferencias significativas entre tratamientos en su longitud, peso seco y contenido de cenizas. El contenido de cenizas en el fémur de las ratas con cáncer colorectal fue notablemente menor que el contenido en las ratas sanas. El nitrógeno fecal fue sólo mayor en las ratas sanas y suplementadas con los fructanos de achicoria y *Agave tequilana*.

Palabras clave: *Prebióticos, fémur, minerales, nitrógeno fecal, Cáncer de colon*

Introducción

El consumo de prebióticos se ha relacionado con el incremento de la absorción intestinal y biodisponibilidad de algunos macrominerales como calcio, magnesio y fósforo, así como microminerales como hierro y zinc (Kruger *et al.*, 2003; Morohashi *et al.*, 1998; Scholz-Ahrens *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2011).

Los mecanismos probables del efecto de los prebióticos sobre el aumento de la absorción de calcio en el intestino grueso están relacionados con el aumento de su solubilidad debido a la reducción del pH causado por el incremento en la producción bacteriana de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) o por el aumento del intercambio dinámico transepitelial de H^+ celular por Ca^{+2} causado directamente por los AGCC, o por el crecimiento de área y de los niveles de calbindina-D en el intestino grueso debido a la proliferación celular promovida por metabolitos generados por la microbiota residente como el butirato o poliaminas (Cashman, 2003). Dado que algunos de los efectos, como el cambio en la microestructura del tejido intestinal y en la disponibilidad de minerales no son específicos de calcio, los prebióticos también pueden aumentar la absorción intestinal de otros minerales como magnesio y zinc (Raschka y Daniel, 2005).

El ácido fólico presente de manera natural y abundante en la fibra insoluble, es considerado como el responsable de la absorción y retención deficiente de varios minerales (como calcio, magnesio y zinc) debido a su propiedad quelante (Lopez *et al.*, 2000); por el contrario, el consumo de fibra soluble, como pectinas, gomas, almidón resistente, lactulosa, fructooligosacáridos (FOS) e inulina, ha demostrado incrementar la absorción y biodisponibilidad de minerales (Greger, 1999). Esto se debe a que su ingestión y fermentación microbiana incrementan las concentraciones de AGCC que abaten el pH, hipertrofian el tejido cecal y promueven la disociación del ácido fólico y sus efectos nocivos sobre la homeostasis mineral (Demigné *et al.*, 1989; Lopez *et al.*, 2000).

Así, la fibra soluble incrementa la solubilidad, permeabilidad y absorción de minerales en el intestino (Raschka y Daniel, 2005; Scholz-Ahrens y Schrezenmeir, 2007) y la biodisponibilidad mineral para los huesos (Lobo *et al.*, 2006; Scholz-Ahrens *et al.*, 2007).

Además, las dietas altas en fibra soluble reducen la utilización de las proteínas e incrementan la excreción fecal de nitrógeno (Falcón V. *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 1982). El nitrógeno de las heces proviene de la proteína de la dieta que ha escapado de la digestión y de las proteínas endógenas, como las secreciones pancreáticas e intestinales, las células epiteliales desprendidas y de la urea sanguínea después de su difusión en el intestino (Mason, 1984).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue comparar los efectos de fructanos comerciales de achicoria y de *A. tequilana* y fructanos estandarizados de tallos de *A. salmiana* y *A. tequilana*, sobre la absorción de minerales en el fémur y el contenido de nitrógeno en las heces de ratas Wistar sanas y con carcinogénesis colónica incipiente.

14

Materiales y métodos

14.1. Polisacáridos probados

Los polisacáridos comerciales usados fueron fructanos de achicoria (*Cichorium intybus* L.) conocida como inulina (Orafti[®] Synergy¹, Tienen, Bélgica), fructanos de *Agave tequilana* F.A.C. Weber (Inufib[™], Jalisco, México) y almidón de arroz (Tres Estrellas[®], Toluca, México). Además, como polisacáridos no comerciales, se incluyeron fructanos obtenidos directamente de *A. salmiana* y *A. tequilana* extraídos de los tallos de seis individuos en condiciones similares de madurez fisiológica óptima (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001) procedentes de la región de Charcas, S.L.P. y Arandas, Jalisco, respectivamente y extraídos de acuerdo con el proceso desarrollado en nuestro laboratorio (Godínez-Hernández *et al.*, 2016c).

14.2. Animales y dietas

Para cada uno de los dos experimentos, uno con animales sanos y otro con animales a los que se les provocó carcinogénesis colónica, se utilizaron 36 ratas macho Wistar de dos meses de edad y peso entre 200-250 g proporcionadas por el Centro de Biociencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

En ambos experimentos, cada rata se tomó como una unidad experimental y el conjunto se mantuvo en cajas individuales de polipropileno, en una habitación con temperatura entre 20 y 25°C, humedad relativa entre 30 y 60% y el ciclo circadiano invertido de 12 h luz/12 h oscuridad. Los animales experimentales se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones éticas locales de cuidado y mantenimiento correspondientes (SAGARPA, 2001; Secretaría de Salud, 1984). El protocolo fue aprobado por el comité de ética institucional (CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20160830).

Los animales se sometieron a un periodo de adaptación de una semana con una ración de 25 g *per cápita* de alimento estándar para roedores (Chow[®] 5008, Missouri, EE.UU.) y agua *ad libitum*. Posteriormente, seis tratamientos fueron asignados aleatoriamente (n=6); alimento estándar comercial (**C**) o 90 % del mismo alimento más 10 % de cada uno de los polisacáridos siguientes: inulina comercial (**I**), fructanos comerciales de *A. tequilana* (**ATC**), fructanos de *A. tequilana* extraídos en el laboratorio (**ATE**), fructanos de *A. salmiana* extraídos en el laboratorio (**AS**) o almidón de arroz comercial (**A**).

Cada ración de alimento, con o sin suplementación se administró a las unidades experimentales diariamente al iniciar el periodo de oscuridad, durante las 20 semanas que duró el periodo experimental. La composición del alimento estándar fue 12 % de humedad, 23 % de proteína, 6.5 % de grasa, 4 % de fibra, 8 % de cenizas y 46.5 % de extracto libre de nitrógeno; así, la dieta diaria sin suplementación tuvo un contenido energético de 84.12 Kcal/25 g. Al finalizar el periodo experimental, los animales de ambos experimentos se sacrificaron con pentobarbital sódico [0.063 g/mL] (SEDALPHARMA[®], Pet's Pharma, México) en dosis de 40 mg/kg de peso por vía intraperitoneal.

14.3. Inducción de inicios de carcinogénesis colónica

Después de ocho semanas de aplicar los tratamientos, se indujo la etapa preneoplásica del cáncer de colon; para ello se aplicaron dos dosis por vía intraperitoneal de 15 mg del fármaco carcinogénico azoximetano (AOM) (Sigma-Aldrich[®], San Louis Missouri, EE.UU., A2853) por kg de peso corporal del animal, disuelto en solución salina estéril (0.85 %) (Reddy *et al.*, 1997), una al finalizar la semana ocho y la otra al terminar semana nueve del periodo experimental. Los animales siguieron con sus tratamientos hasta la semana 20, cuando concluyó el periodo experimental.

14.4. Caracterización y contenido de minerales en fémur

Al finalizar el periodo experimental, se disecaron ambos fémures de cada unidad experimental, se sumergieron en solución salina 0.85 %, se les retiró el tejido muscular adherido, se secaron (40°C/36 h) (Shel-Lab FX-14, Oregon, EE. UU.), hasta peso constante (Sartorius BPAA1S, Alemania) y se midió su longitud con un vernier digital (Calibrador Vernier Digital Cadena[®] Modelo A020, China).

El fémur izquierdo se utilizó para la cuantificación de cenizas (550°C/ 6hr) (LINDBERG SB, 51844, Wisconsin, EE. UU.). El fémur derecho pulverizado se utilizó para estimar el contenido de macro y microminerales. para lo cual se eliminó la materia orgánica con H₂NO₃ concentrado. El contenido de calcio, magnesio, fósforo y potasio se estimó mediante espectrometría por emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés); y el sodio, fierro, zinc y azufre por espectrofotometría de emisión óptica (Thermo Scientific iCAP 7000 Series, EE. UU.) por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, por sus siglas en inglés), con un sistema de cuadrupolo en un espectrofotómetro de emisión óptica acoplado a un espectrómetro de masas (Thermo Scientific X-Series 2, EE. UU.).

14.5. Contenido de nitrógeno en heces

Al finalizar el experimento, se recolectaron muestras de heces colónicas y se secaron a peso constante (40°C/ 36 h) (Shel-Lab FX-14, Oregon, EE. UU.); posteriormente se tomaron 100 mg de heces secas para estimar el contenido de nitrógeno, de acuerdo a la metodología AOAC 993.13 (método Dumas) con el equipo FLASH 2000 N/Protein analyzer (Thermo Scientific™, No. Serie 2015FO106).

14.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño de ambos experimentos: ratas sanas (1) y ratas con carcinogénesis colónica (2) fue con asignación completamente al azar de los tratamientos, consistentes en la suplementación alimentaria (10 %) con los cinco polisacáridos (A, I, ATC, ATE y AS) y sin suplementación (C), con seis repeticiones por tratamiento, donde cada rata fue considerada como una unidad experimental. A los datos de cada experimento se les realizaron pruebas de normalidad, análisis de varianza de una vía (ANOVA) y comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$), se realizó la prueba de t de student para comparar todas las variables entre los dos experimentos; los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS versión 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, EE.UU.). El grado de significación de los datos se basó en una probabilidad $p < 0.05$.

15

Resultados y discusión

15.1. Caracterización y contenido de minerales en fémur

El peso seco, la longitud y el contenido de cenizas de los fémures de las ratas carecieron de diferencias estadísticas entre tratamientos en ambos experimentos (**Cuadro 15.1**), en discrepancia con los resultados de Lobo *et al.* (2006), Rivera-Huerta *et al.* (2017) y Takahara *et al.* (2000), quienes atribuyeron un incremento en la masa, densidad y volumen del fémur, respectivamente, a la suplementación con FOS. En el presente estudio, el peso seco y la longitud del fémur fueron muy semejantes en ambos estados de salud; sin embargo, el contenido de cenizas del fémur de las ratas cancerosas fue consistentemente menor en todos los tratamientos que el de las ratas sanas; por ello, este efecto generalizado sólo puede ser atribuido a una disfunción derivada del cáncer provocado en estos animales experimentales, sobre lo cual no se encontraron antecedentes.

Tanto en las ratas sanas (**Cuadro 15.2**), como en las ratas carcinogénicas (**Cuadro 15.3**), la concentración de S, K, Zn y Fe en el fémur careció de diferencias estadísticas entre tratamientos. En cambio, en el contenido de Ca, P, Na y Mg se presentaron algunas diferencias significativas entre tratamientos, pero sólo para Ca y P se pueden reconocer tendencias consistentes en ambos experimentos: el tratamiento que registró el mayor contenido de Ca presentó a la vez el menor contenido de P, y viceversa; sin embargo, en estas tendencias, sólo en el experimento con ratas cancerosas estuvo involucrado un tratamiento con fructanos (AS).

Cuadro 15.1: Efecto de los tratamientos en atributos del fémur de ratas en ambos experimentos

Estado de salud	Sanas			Cáncer de colon		
Tratamiento	Peso seco(g)	Longitud (mm)	Cenizas (%)	Peso seco(g)	Longitud (mm)	Cenizas (%)
C	36.0 ± 3.3 ^a	43.30 ±1.01 ^a	65.65 ±10.00 ^a	0.97 ±0.15 ^a	41.83 ±2.33 ^a	57.45 ±3.03 ^a
I	0.84 ±0.10 ^a	42.47 ±1.87 ^a	72.23 ±13.39 ^a	0.96 ±0.06 ^a	42.69 ±1.91 ^a	55.33 ±5.07 ^a
ATC	0.84 ±0.05 ^a	40.37 ±0.90 ^a	61.24 ±1.82 ^a	0.93 ±0.07 ^a	41.14 ±1.92 ^a	59.91 ±2.57 ^a
ATE	0.97 ±0.15 ^a	44.83 ±1.75 ^a	78.28 ±0.26 ^a	0.92 ±0.15 ^a	42.76 ±1.72 ^a	57.05 ±2.62 ^a
AS	0.82 ±0.08 ^a	40.10 ±1.21 ^a	61.54 ±0.88 ^a	0.86 ±0.14 ^a	40.56 ±2.74 ^a	59.20 ±3.62 ^a
A	0.96 ±0.04 ^a	44.05 ±2.33 ^a	66.40 ±8.61 ^a	0.91 ±0.11 ^a	40.22 ±1.91 ^a	57.03 ±0.84 ^a
<i>p-valor</i>	<i>0.3045</i>	<i>0.0550</i>	<i>0.3039</i>	<i>0.6133</i>	<i>0.3277</i>	<i>0.2008</i>

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias ± DE. ^aMedias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes (p<0.05)

Cuadro 15.2: Contenido mineral (mg/g en base seca) en fémur de ratas sanas

Tratamiento	Minerales							
	Ca	P	Na	S	Mg	K	Zn	Fe
C	644.83±5.65 ^a	294.34± 4.76 ^b	29.09±0.89 ^b	17.60±0.22 ^a	11.47±0.60 ^a	1.54±0.14 ^a	0.95±0.17 ^a	0.21±0.11 ^a
I	611.17±29.94 ^{ab}	322.71±31.00 ^{ab}	34.72±2.31 ^a	17.88±0.36 ^a	10.55±0.65 ^{ab}	1.86±0.31 ^a	0.91±0.10 ^a	0.20±0.03 ^a
ATC	599.94±23.76 ^{ab}	343.97±24.10 ^{ab}	25.56±0.78 ^b	17.89±0.07 ^a	9.71±0.81 ^{ab}	1.55±0.07 ^a	1.13±0.04 ^a	0.25±0.06 ^a
ATE	607.01±20.14 ^{ab}	335.17±20.18 ^{ab}	27.74±1.39 ^b	17.94±0.65 ^a	9.41±0.82 ^b	1.67±0.28 ^a	0.77±0.03 ^a	0.28±0.07 ^a
AS	600.85±5.65 ^{ab}	343.77±5.21 ^{ab}	25.32±0.88 ^b	17.56±0.36 ^a	9.60±1.02 ^{ab}	1.52±0.32 ^a	1.07±0.25 ^a	0.31±0.09 ^a
A	586.37±12.6 ^b	356.14±2.14 ^a	27.04±2.14 ^b	17.95±0.26 ^a	9.77±0.07 ^a	1.65±0.21 ^a	0.83±0.13 ^a	0.25±0.04 ^a
<i>p-valor</i>	<i>0.0484</i>	<i>0.0393</i>	<i><.0001</i>	<i>0.8391</i>	<i>0.0311</i>	<i>0.4359</i>	<i>0.3316</i>	<i>0.2807</i>

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias ± DE (n=9). ^aMedias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes (p<0.05)

Cuadro 15.3: Contenido mineral (mg/g en base seca) en fémur de ratas con carcinogénesis colónica

Tratamiento	Minerales							
	Ca	P	Na	S	Mg	K	Zn	Fe
C	648.42± 5.79 ^a	290.62±4.56 ^b	29.14±0.66 ^{ab}	17.41±0.46 ^a	11.52±0.04 ^a	1.64±0.25 ^a	0.95 ±0.02 ^a	0.30±0.12 ^a
I	610.75±24.09 ^{ab}	332.21±39.17 ^{ab}	26.66±0.76 ^b	17.61±0.75 ^a	10.65±0.98 ^a	1.13± 0.13 ^a	0.82±0.03 ^a	0.17±0.01 ^a
ATC	607.86±10.89 ^{ab}	337.40±11.02 ^a	25.59±0.58 ^b	17.53±0.15 ^a	9.02 ±0.36 ^b	1.30±0.19 ^a	1.00±0.22 ^a	0.28±0.01 ^a
ATE	616.81±12.29 ^{ab}	324.68±9.53 ^{ab}	27.66±1.76 ^{ab}	17.74±0.66 ^a	10.59±0.49 ^a	1.45±0.22 ^a	0.83±0.17 ^a	0.21±0.06 ^a
AS	589.46± 7.39 ^b	354.15±6.72 ^a	26.18±1.31 ^b	17.59±0.51 ^a	10.09±0.45 ^{ab}	1.18±0.24 ^a	1.11±0.17 ^a	0.22±0.05 ^a
A	627.69± 2.88 ^{ab}	309.22±3.21 ^{ab}	30.79±0.52 ^a	18.15±0.17 ^a	11.24±0.18 ^a	1.58±0.24 ^a	1.11±0.41 ^a	0.24±0.05 ^a
<i>p-valor</i>	<i>0.0167</i>	<i>0.0074</i>	<i>0.0049</i>	<i>0.7307</i>	<i>0.0021</i>	<i>0.1376</i>	<i>0.4292</i>	<i>0.2645</i>

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*, **A:** Almidón de arroz. Medias ± DE (n=9). ^aMedias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes (p<0.05)

Así, el incremento en absorción intestinal y biodisponibilidad de Ca y P atribuido al consumo de fructanos (Ohta *et al.*, 1993; Kruger *et al.*, 2003; Morohashi *et al.*, 1998; Raschka y Daniel, 2005), no se reflejó en una mayor concentración en el fémur, como lo registraron García-Vieyra *et al.* (2014) y Takahara *et al.* (2000), pues sólo probablemente sí sucedió para el P en las ratas cancerosas con el tratamiento AS (**Cuadro 15.3**). En todos los tratamientos con fructanos la relación Ca-P vario de 1.6:1 a 1.9:1, menor que 2:1 considerada como normal (Pond *et al.*, 1995).

El nivel de absorción intestinal no determina la biodisponibilidad de los minerales y su fijación en hueso, Ohta *et al.* (1998) reportan que el flujo de Ca dentro y fuera del hueso en su formación y reabsorción respectivamente, no es influenciado por la suplementación con FOS, a pesar de su incremento en la absorción y balance. Vanhoof y De Schrijver (1996) mencionan que la suplementación con 6 % de inulina en ratas disminuye la absorción de minerales.

En general, la suplementación con fructanos alteró escasamente la concentración de minerales en el fémur en ambos estados de salud, en general la suplementación con los fructanos de agave y de achicoria mantiene las concentraciones de minerales en el hueso en niveles similares al tratamiento con almidón y testigo. Sólo cabe señalar que la inulina (I) indujo el mayor contenido de Na en las ratas sanas, pero a la vez uno de los contenidos más bajos en las ratas con cáncer; también, los fructanos de *Agave salmiana* (AS), en el experimento con ratas cancerosas, destacaron por provocar el menor contenido de Ca y el mayor de P, en una relación 1.6:1.

15.2. Contenido de nitrógeno en las heces

Como se aprecia en el **Cuadro 15.4**, en el experimento con las ratas sanas fue significativo el incremento del contenido de N en las heces debido a tres de los cuatro tratamientos con fructanos. En cambio, en el experimento con las ratas carcinogénicas todos los tratamientos generaron resultados estadísticamente similares, aunque con los fructanos comerciales (I y ATC) se obtuvo mayor contenido de N fecal que los fructanos experimentales, que el almidón y que el testigo, probablemente debido a su mayor contenido de FOS (Regalado-Rentería *et al.*, 2020).

Cuadro 15.4: Contenido de nitrógeno fecal (mg/g, base seca)

Tratamiento	Sanas	Cáncer de colon
C	36.0 ± 3.3 ^b	38.3 ± 2.2 ^a
I	43.8 ± 1.8 ^a	44.4 ± 1.7 ^a
ATC	43.6 ± 2.6 ^a	41.8 ± 5.5 ^a
ATE	44.3 ± 3.3 ^a	37.7 ± 4.1 ^a
AS	40.5 ± 4.6 ^a	37.7 ± 5.7 ^a
A	34.9 ± 2.5 ^b	38.7 ± 3.9 ^a
<i>p-valor</i>	<i>0.0014</i>	<i>0.3756</i>

C: Control, **I:** Inulina comercial, **ATC:** Fructanos comerciales de *A. tequilana*, **ATE:** Fructanos experimentales de *A. tequilana*, **AS:** Fructanos de *A. salmiana*. Medias ± DE (n=6). ^aMedias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes (p <0.05)

En general, niveles altos de fibra alimentaria incrementan la excreción de N en las heces (Shah *et al.*, 1982; Mongeau *et al.*, 1989; Falcón V. *et al.*, 2011). El N de las heces proviene primeramente de la proteína del alimento escapada de la digestión, pero también de las proteínas endógenas, como las secreciones pancreáticas e intestinales, las células epiteliales desprendidas y la urea sanguínea difundida en el intestino (Mason, 1984). Los fructanos, además de interferir en la digestión de las proteínas por ser indigeribles, constituyen el sustrato básico de diversas bacterias acidófilas intestinales (Rendón-Huerta *et al.*, 2011); por ello, la suplementación con estos prebióticos incrementa notablemente la cantidad de biomasa bacteriana en el ciego, en el intestino y en las heces, las cuales incorporan buena parte del N residual, abaten el pH y con ello reducen la absorción colónica de N amoniacal (Beynen *et al.*, 2002; Cani y Delzenne, 2011; Delzenne *et al.*, 2011).

La reducción de la absorción intestinal de amoniaco disminuye la generación de urea en el hígado y con ello se cambia la excreción de N de la orina a las heces; así, los fructanos favorecen la ruta de excreción extrarenal de N, al incrementar su eliminación a través de las heces (Younes *et al.*, 1999).

15.3. Contraste entre experimentos

Se muestra en el **Cuadro 15.5** la comparativa de las variables cuantificadas en ambos experimentos, con las ratas sanas y con cáncer de colon; el análisis estadístico mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de cenizas y el contenido de K en los fémures de las ratas sanas en comparación con las ratas con cáncer de colon. Para el resto de las variables, no se mostraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$).

Cuadro 15.5: Contraste de variables en ratas sanas y con cáncer de colon

VARIABLES	SANAS	CÁNCER DE COLON	<i>p</i> VALOR
Cenizas (%)	62.28 ± 8.91 ^a	57.78 ± 3.23 ^b	0.001
Peso seco (g)	0.88 ± 0.02 ^a	0.92 ± 0.11 ^a	NS
Longitud (mm)	42.42 ± 2.21 ^a	41.48 ± 2.23 ^a	NS
Ca (mg/g)	609.67 ± 33.92 ^a	612.82 ± 22.31 ^a	NS
P (mg/g)	331.62 ± 25.51 ^a	329.12 ± 24.42 ^a	NS
Na (mg/g)	28.40 ± 3.62 ^a	27.30 ± 1.92 ^a	NS
S (mg/g)	17.80 ± 1.14 ^a	17.6 ± 1.49 ^a	NS
Mg (mg/g)	10.00 ± 0.92 ^a	10.30 ± 0.77 ^a	NS
K (mg/g)	1.64 ± 0.21 ^a	1.35 ± 0.11 ^b	0.001
Zn (mg/g)	0.94 ± 0.11 ^a	0.98 ± 0.12 ^a	NS
Fe (mg/g)	0.25 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.04 ^a	NS
Nitrógeno fecal (mg/g)	40.39 ± 4.83 ^a	39.88 ± 4.35 ^a	NS

NS: No significativo. ^aMedias con diferente literal entre columnas son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

16

Conclusiones

El fémur de las ratas sanas y cancerosas se mantuvo sin diferencias significativas entre tratamientos en su longitud, peso seco y contenido de cenizas. El contenido de cenizas en el fémur de las ratas con cáncer colorectal fue notablemente menor que el contenido en las ratas sanas. El nitrógeno fecal fue sólo mayor en las ratas sanas y suplementadas con los fructanos de achicoria y *Agave tequilana*.

Conflicto de intereses

No hay conflicto de intereses que declarar.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca doctoral otorgada. Al Dr. Manuel Núñez Muñoz (Nutrición y Genética Saludable, S.A. de C.V.) por su apoyo financiero mediante el apoyo del Programa de Estímulos a la Innovación PEI-CONACYT, No. 251911. Megafarma S.A. de C.V. por la donación de inulina de achicoria para el estudio. * Los financiadores no tuvieron ninguna función en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

Referencias citadas

- Aguirre-Rivera, J. R., Charcas-Salazar, H. F., Flores-Flores, J. L., 2001. El Maguey Mezcalero Potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, San Luis Potosí S. L. P., México, p. 78.
- Beynen, A. C., Baas, J. C., Hoekemeijer, P. E., Kappert, H. J., Bakker, M. H., Koopman, J. P., Lemmens, A. G., 2002. Faecal bacterial profile, nitrogen excretion and mineral absorption in healthy dogs fed supplemental oligofructose. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 86, 298–305.
URL <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2002.00386.x>
- Cani, P. D., Delzenne, N. M., 2011. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology & Therapeutics* 130 (2), 202–212.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.012>
- Cashman, K., 2003. Prebiotics and Calcium Bioavailability. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 4, 21–32.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Cani, P. D., 2011. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: Consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microbial Cell Factories* 10 (Suppl 1), 1–11.
URL <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S10>
- Demigné, C., Levrat, M.-A., Rémésy, C., 1989. Effects of feeding fermentable carbohydrates on the cecal concentrations of minerals and their fluxes between the cecum and blood plasma in the rat. *The Journal of Nutrition* 119 (11), 1625–1630.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/119.11.1625>
- Falcón V., M. d. R., Barrón H., J. M., Romero B., A. L., Domínguez S., M. F., 2011. Adverse effect on the food protein quality of diets high in dietary fiber. *Revista Chilena de Nutrición* 38 (3), 369–375.

- García-Vieyra, M. I., Del Real, A., López, M. G., 2014. Agave fructans: their effect on mineral absorption and bone mineral content. *Journal of Medicinal Food* 17 (11), 1247–1255.
URL <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0137>
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., Becerra-Jiménez, J., 2016. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 22 (1), 59–72.
URL <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>
- Greger, J., 1999. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *The Journal of Nutrition* 129 (7), 1434S–1435S.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1434S>
- Kruger, M. C., Brown, K. E., Collett, G., Layton, L., Schollum, L. M., 2003. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Experimental Biology and Medicine* 228 (6), 683–688.
URL <https://doi.org/10.1177/153537020322800606>
- Lobo, A. R., Colli, C., Filisetti, T. M., 2006. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research* 26 (8), 413–420.
URL <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.06.019>
- Lopez, H. W., Coudray, C., Levrat-Verny, M.-A., Feillet-Coudray, C., Demigné, C., Rémésy, C., 2000. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11 (10), 500–508.
URL [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(00\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(00)00109-1)
- Mason, V., 1984. Metabolism of nitrogenous compounds in the large gut. *Proceedings of the Nutrition Society* 43, 45–53.
URL <https://doi.org/10.1079/PNS19840026>
- Mongeau, R., Sarwar, G., Peace, R. W., Brassard, R., 1989. Relationship between dietary fiber levels and protein digestibility in selected foods as determined in rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 39 (1), 45–51.
URL <https://doi.org/10.1007/BF01092400>

- Morohashi, T., Sano, T., Ohta, A., Yamada, S., 1998. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. *The Journal of Nutrition* 128 (10), 1815–1818.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/128.10.1815>
- Ohta, A., Motohashi, Y., Sakai, K., Hirayama, M., Adachi, T., Sakuma, K., 1998. Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin-D9k in the large intestine of gastrectomized rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 33 (10), 1062–1068.
URL <https://doi.org/10.1080/003655298750026769>
- Ohta, A., Ohtuki, M., Takizawa, T., Inaba, H., Adachi, T., Kimura, S., 1993. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 64 (4), 316–323.
- Pond, W. G., Church, D. B., Pond, K. R., 1995. Basic animal nutrition and feeding, 4ta Edición. Wiley, New York, USA, p. 615.
- Raschka, L., Daniel, H., 2005. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone* 37 (5), 728–735.
URL <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.05.015>
- Reddy, B. S., Hamid, R., Rao, C. V., 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* 18 (7), 1371–1374.
URL <https://doi.org/10.1093/carcin/18.7.1371>
- Regalado-Rentería, E., Aguirre-Rivera, J. R., Godínez-Hernández, C. I., García-López, J. C., Oros-Ovalle, A. C., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez-Martínez, M., Ratering, S., Schnell, S., Ruíz-Cabrera, M. A., Juárez-Flores, B. I., 2020. Effects of Agave Fructans, Inulin and Starch on Metabolic Syndrome Aspects in Healthy Wistar Rats. *ACS Omega*.
URL <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c00272>
- Rendón-Huerta, J. A., Juárez-Flores, B. I., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., Delgado-Portales, R. E., 2011. Effects of different kind of fructans on *in vitro* growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium lactis*. *African Journal of Microbiology Research* 5 (18), 2706–2710.
- Rivera-Huerta, M., Lizárraga-Grimes, V. L., Castro-Torres, I. G., Tinoco-Méndez, M., Macías-Rosales, L., Sánchez-Bartéz, F., Tapia-Pérez, G. G., Romero-Romero, L., Gracia-

- Mora, M. I., 2017. Functional effects of prebiotic fructans in colon cancer and calcium metabolism in animal models. *BioMed Research International* 2017, 1–10.
URL <https://doi.org/10.1155/2017/9758982>
- SAGARPA, 2001. Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Reporte técnico, Diario Oficial de la Federación (2001, 18 de Junio). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Scholz-Ahrens, K. E., Açil, Y., Schrezenmeir, J., 2002. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *British Journal of Nutrition* 88 (4), 365–377.
URL <https://doi.org/10.1079/BJN2002661P>
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açil, Y., Glüer, C.-C., Schrezenmeir, J., 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *The Journal of Nutrition* 137 (3), 838S–846S.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.838S>
- Scholz-Ahrens, K. E., Schrezenmeir, J., 2007. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *The Journal of Nutrition* 137 (11), 2513S–2523S.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2513S>
- Secretaría de Salud, 1984. Ley General de Salud, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título séptimo: de la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación, Capítulo único, Artículos 121-126. Reporte técnico, Diario Oficial de la Federación (1984, 7 de Febrero). Secretaría de Salud.
- Shah, N., Atallah, M. T., Mahoney, R. R., Pellett, P. L., 1982. Effect of dietary fiber components on fecal nitrogen excretion and protein utilization in growing rats. *Journal of Nutrition* 112 (4), 658–666.
URL <https://doi.org/10.1093/jn/112.4.658>
- Takahara, S., Morohashi, T., Sano, T., Ohta, A., Yamada, S., Sasa, R., 2000. Fructooligosaccharide consumption enhances femoral bone volume and mineral concentrations in

rats. *The Journal of Nutrition* 130 (7), 1792–1795.

URL <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1792>

Vanhoof, K., De Schrijver, R., 1996. Availability of minerals in rats and pigs fed non-purified diets containing inulin. *Nutrition Research* 16 (6), 1017–1022.

URL [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(96\)00101-7](https://doi.org/10.1016/0271-5317(96)00101-7)

Weaver, C. M., Martin, B. R., Nakatsu, C. H., Armstrong, A. P., Clavijo, A., McCabe, L. D., McCabe, G. P., Duignan, S., Schoterman, M. H., Van Den Heuvel, E. G., 2011. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (12), 6501–6510.

URL <https://doi.org/10.1021/jf2009777>

Younes, H., Alphonse, J., Behr, S. R., Demigne, C., Remesy, C. R., 1999. Role of fermentable carbohydrate supplements with a low-protein diet in the course of chronic renal failure: Experimental bases. *American Journal of Kidney Diseases* 33 (4), 633–646.

URL [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(99\)70213-1](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(99)70213-1)

Anexo

Dictamen del Comité de Ética



DICTAMEN

San Luis Potosí, México a 23 de enero de 2019

Dra. Bertha Irene Juárez Flores
Investigador Principal
Presente. -



Estimado Dra. Juárez Flores

En respuesta a su solicitud de revisión de los documentos correspondientes al protocolo titulado: **Comparación del efecto prebiótico y quimiopreventivo de fructanos en un modelo animal con inducción de cáncer de colon, versión 1.0**, con la siguiente información aportada por usted:

Datos del solicitante	
Nombre y título del solicitante	Dra. Bertha Irene Juárez Flores
Nombre de la institución y dirección en donde se llevará a cabo la investigación.	Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Investigación de Zonas desérticas San Luis Potosí S.L.P. C.P. 78250, México.

Habiéndose cumplido los requerimientos de quórum el día **19 de enero** del año **2019** en las oficinas del **Comité de Ética de Investigación Dixpertia (CEID) Número CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20160830**, dentro de las instalaciones de **Unidad Clínica DIXPERTIA, S.A. de C.V.** ubicada en Fray Diego de la Magdalena No.630, Col. Jardín, San Luis Potosí, S.L.P. México. C. P.78270, con teléfono de contacto Tel: (+52) 444 8 21 50 39, le informamos que el CEID se ha reunido para la revisión los siguientes documentos:

Documentos revisados	No. de páginas
1.- Protocolo de investigación de tesis doctoral de la alumna M.C. Evelyn Regalado Rentería, bajo la tutela de la Dra. Bertha Irene Juárez Flores, de fecha de noviembre de 2018.	16