

Informe etapa 2 proyecto 316514

Cambios en la sensibilidad a la insulina en hígado y músculo esquelético, microbiota intestinal y concentraciones postprandiales de GLP-1 provocados por el consumo de la sucralosa

Entregable: reporte del análisis de cambios en la composición de la microbiota intestinal después del periodo de intervención.

→METODOLOGÍA

Las muestras se recolectaron en frío y se almacenaron alícuotas de 180-220 mg en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con una balanza analítica electrónica marca OHAUS® modelo Explorer. Si la muestra era líquida, se pipeteó 220 µl en el tubo de microcentrífuga. Se añadió 1 ml de RNAlater (QIAGEN®) para almacenarse en congelación a -80°C hasta su análisis. Se realizó la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) de manera paulatina conforme se fueron recolectando las muestras.

La extracción de ADN se hizo con el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®). Todos los pasos que incluyeron centrifugación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (15-25°C) y a 14,000 rpm con una microcentrífuga marca Hettich® modelo MIKRO 220R.

Se evaluó en el equipo NanoDrop 2000 (espectrofotómetro) la concentración que se tuvo de ADN (idealmente 75-300 ng/µl) y que se encontrara dentro de los parámetros permitidos de pureza y contenido de sales.

Mediante el equipo Qubit 3 (fluorómetro) se cuantificó la cantidad de ADN de doble hélice que se obtuvo (idealmente 15-60 µg), para verificar la calidad del ADN que se extrajo.

En el equipo QIAxcel se midió la cantidad de ARN obtenido y que el peso de la muestra fuera adecuado.

Se almacenaron los tubos de microcentrífuga con el ADN extraído de las muestras a -80°C hasta el momento de su secuenciación.

Después de la extracción de ADN de todas las muestras, éstas se mandaron a secuenciar mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el equipo MiSeq. Se hizo la secuenciación por síntesis del ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) del gen 16S que poseen todas las bacterias y que tiene 9 regiones variantes, haciendo la amplificación de la región V3 y V4.

Posteriormente, con el programa de bioinformática QIIME se hizo el análisis del microbioma y arrojó los FASTQ, que son archivos de texto que contienen la secuencia de las bases nitrogenadas.

Los archivos FASTQ se ingresaron al programa GREENGENES para hacer el análisis de alfa y beta diversidad mediante la identificación de la similitud de secuencia con los OTUs (unidades taxonómicas operacionales) para finalmente reconocer la abundancia de géneros y especies de bacterias.

→RESULTADOS

Con base en el análisis de la biodiversidad bacteriana (heterogeneidad de una comunidad en base al número de especies presentes y su abundancia relativa) con el índice de Shannon, se observó una reducción significativa después del consumo de la sucralosa como se muestra en la figura 1 ($p < 0.0002$), sin detectarse cambios en el grupo placebo ($p = 0.2369$).

En la figura 2, se representa la composición de la microbiota intestinal por *phylums*, géneros y especies de bacterias a través del porcentaje de abundancia relativa antes y después de la intervención en ambos grupos. Al comparar la composición de la microbiota intestinal en el estado basal entre los grupos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$).

Posterior al periodo de intervención, en el grupo sucralosa se observó un aumento significativo en la abundancia relativa de los géneros *Anaerostipes* ($p = 0.03$), *Bacteroides* ($p = 0.03$) y *Odoribacter* ($p = 0.04$); al igual que una reducción significativa de los géneros *Prevotella* ($p < 0.01$), *Desulfovibrio* ($p < 0.01$) y *Lachnospira* ($p = 0.01$).

Respecto a la abundancia relativa por especies de bacterias, en el grupo sucralosa se detectó un aumento estadísticamente significativo de *Bacteroides fragilis* ($p < 0.01$), *Bacteroides plebeius* ($p = 0.02$), *Bacteroides uniformis* ($p = 0.02$), *Prevotella stercorea* ($p = 0.01$); así como una disminución significativa de *Ruminococcus bromii* ($p < 0.01$), *Ruminococcus gnavus* ($p < 0.01$), *Ruminococcus flavefaciens* ($p = 0.02$), *Coprococcus eutactus* ($p = 0.01$), *Butyricicoccus pullicaecorum* ($p = 0.02$), *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0.02$) y *Defluviitalea saccharophila* ($p = 0.04$).

En el grupo placebo no se detectaron cambios estadísticamente significativos al finalizar la intervención en la abundancia relativa de ningún género o especie de bacterias en comparación con el estado basal ($p \geq 0.05$).

Aunado a esto, al realizar el análisis discriminante lineal para hacer una predicción de la probabilidad de ver este efecto de acuerdo a la asignación de ambas intervenciones, no se encontraron efectos significativos asociados al grupo placebo y, en el grupo de sucralosa, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de *Bacteroides fragilis*, al igual que una disminución ($p < 0.05$) de *Ruminococcus bromii* y *Faecalibacterium prausnitzii* como se muestra en la figura 3.

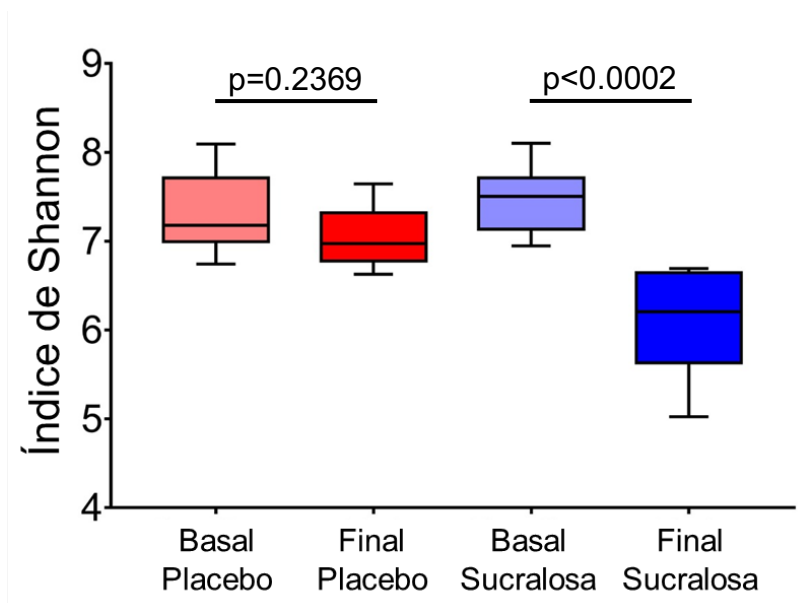


Figura 1. Cambios en el índice de Shannon después del consumo de cápsulas con placebo o sucralosa durante 30 días.

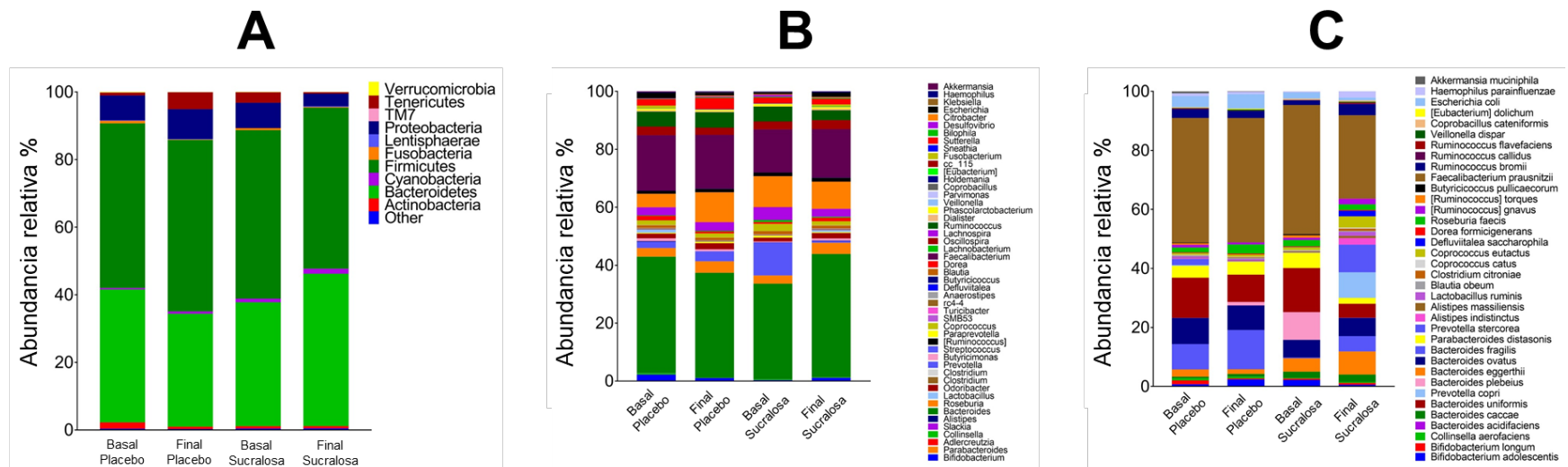


Figura 2. Cambios en la composición de la microbiota intestinal por (A) *Phylums*, (B) Géneros y (C) Especies de bacterias después del consumo de cápsulas con placebo o sucralosa durante 30 días.

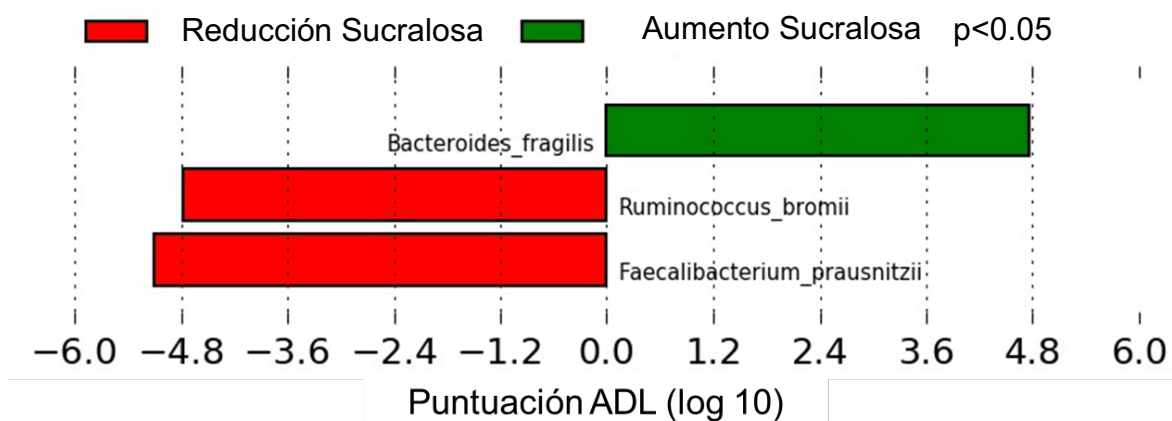


Figura 3. Cambios significativos identificados en la microbiota intestinal después del consumo de cápsulas de sucralosa durante 30 días, evaluados a través de la puntuación por análisis discriminante lineal (ADL).