

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOQUIMICA

**“Efecto prebiótico de los fructanos de Agaves y
Dasyilirion y su implicación en el metabolismo de
glucosa y lípidos en ratones”**

Tesis que presenta
M.C. Judith Esmeralda Urías Silvas

Como requisito parcial para obtener el grado de

Doctora en Ciencias
En la especialidad de Biotecnología de Plantas

Directora de Tesis: **Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez**

Irapuato, Gto. México

Enero, 2008

Este trabajo titulado "**Efecto prebiótico de los fructanos de Agaves y Dasyilirion y su implicación en el metabolismo de glucosa y lípidos en ratones**" fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Campus Guanajuato, bajo la asesoría de la Dra. Mercedes G. López y el apoyo del CONACYT, quien otorgo una beca mixta, la cual fue de gran ayuda para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mercedes G. López Pérez por haber aceptado que formara parte de su laboratorio, por su asesoría y apoyo.

A la Dra. Nathalie Delzenne de la Universidad Católica de Lovaina por aceptar que hiciera una estancia en su laboratorio y por formar parte de mi comité predoctoral.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, al Dr. Luis González de la Vara y al Dr. Jorge E. Ibarra Rendón por haber aceptado formar parte del jurado, así como también, por su valiosa ayuda en la revisión de este documento y por sus acertadas sugerencias.

Al Dr. Alejandro Blanco Labra por aceptar incorporarse al jurado, así como también por su disposición y revisión de este documento.

Al Dr. Patrice Cani por su asesoría en los experimentos realizados con ratones.

A Bárbara Pachikian y al Dr. Pedro Buc Calderón porque con su amistad y ayuda mi estancia en Bélgica fue mejor.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas (nacional y mixta) otorgadas para la realización del doctorado.

Al Centro de Investigación y De Estudios Avanzados del IPN por haberme permitido formar parte de su plantel estudiantil y por la beca otorgada.

A cada una de las personas que trabajan en CINVESTAV, Unidad Irapuato, en especial, a Sra. Carmelita, Claudia, Betty Vilchis, Marisol, Bertha (q.e.p.d) y sobre todo a Daniel.

A Dora por su apoyo y disposición durante todo el tiempo que estuve en el CINVESTAV, Unidad Irapuato.

A todos mis compañeros de laboratorio, aunque en este momento sean puras mujeres y debiera poner compañeras, en algún momento estuvo Octavio.

A Alejandra y a Tere por su amistad, por cada día que compartimos y que hacían que la hora de la comida fuera mejor.

A Alicia, Conchita, Kike, Roger y Laura, por.....

3

DEDICATORIAS

A mis **Papás**

Esmeralda y Jesús

Por su apoyo incondicional, por ser mis padres, por el esfuerzo que hacen cada día para que cada uno de sus hijos salgamos adelante y por haberme dado la oportunidad de hacer lo que me gusta

Muchas gracias

A mis hermanos

Jesús, Jenny, Jonny, Juriel, Jorge, Joel y Jonathan

Y a Mónica por incorporase a la familia como esposa de Jesús

A mis abuelos **Mamá Paula** (q.e.p.d), **Papá Nacho** (q.e.p.d), **Papá Chuy**
(q.e.p.d) y **Mamá Angelita**

Al **Sr. Eduardo**, a la **Sra. Rosa Elena**, a **Carlos** y a **Rosita** por dejarme entrar
a su familia y por su apoyo y cariño

A mi esposo **Eduardo**

Por cada uno de los momentos que hemos pasado (a veces buenos y otros no
tanto), por los momentos que aún nos faltan y porque esta historia que empezó
hace poco más de 2 años dure por muchísimos más (para siempre).

Gracias por tu apoyo y por acompañarme en este camino

A ti **Kiwi**

Cosa hermosa

4

INDICE	
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	14
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. AGAVE.....	18
A. Usos del Agave.....	21
B. Metabolismo del Agave.....	21
III. CARBOHIDRATOS.....	26
IV. FRUCTANOS.....	27
V. PREBIÓTICOS.....	29
A. Prebióticos, Probióticos y Efecto Bifidogénico.....	31
B. Tracto Gastrointestinal.....	32

a. Fermentación.....	35
1. Efecto de la dieta en la producción de ácidos grasos de	
cadena corta.....	36
2. Absorción de los ácidos grasos de cadena corta.....	37
C. Efectos Fisiológicos.....	39
a. Glicemia e insulinemia.....	40
1. Obesidad.....	41
1.1 Tratamientos antiobesidad.....	45
1.2. Obesidad y resistencia a la insulina.....	47
2. Diabetes.....	47
2.1. Diabetes mellitus tipo 1.....	48
2.2. Diabetes mellitus tipo 2.....	49
2.3. Tratamiento antidiabetes.....	50
VI. PÉPTIDO-1 TIPO GLUCAGON.....	53
A. Secreción del Péptido-1 Tipo Glucagon.....	54
B. Efectos Fisiológicos del Péptido-1 Tipo Glucagon.....	55
a. Efectos del péptido-1 tipo glucagon sobre la alimentación.....	56
b. Efectos del péptido-1 tipo glucagon en el páncreas.....	56
c. Efectos del péptido-1 tipo glucagon en las células β.....	57
C. Administración del Péptido-1 Tipo Glucagon.....	59
D. Estimulación del Péptido-1 Tipo Glucagon Endógeno.....	61
E. Péptido-1 Tipo Glucagon y Obesidad.....	62
F. Péptido-1 Tipo Glucagon y Diabetes.....	64
VII. HIPÓTESIS.....	65
VIII. OBJETIVO GENERAL.....	65
IX. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
X. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
A. Extracción de los Fructanos de <i>Agave</i> spp. y <i>Dasyllirion</i> sp.....	68
B. Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	68
C. Metodología <i>in vitro</i>	68
a. Crecimiento bacteriano.....	68
b. Fermentación de carbohidratos.....	70
c. Determinación de ácidos grasos de cadena corta por medio de	
cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	70
D. Metodología <i>in vivo</i>	70
a. Materiales.....	71
b. Animales y dietas.....	72
c. Ingesta de alimento, peso corporal y heces.....	72
d. Muestra de sangre.....	

e. Muestra de tejidos.....	73
f. Análisis de hígado.....	74
g. Extracción de péptido-1 tipo glucagon (7-36) amida intestinal...	74
h. Aislamiento del ácido ribonucleico.....	74
i. Reacción en cadena de la polimerasa - transcripción reversa.....	75
XI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
A. Análisis de Fructanos por Medio de Cromatografía de Capa Fina..	76
B. Efecto de lo fructanos sobre el crecimiento de bacterias	
probióticas.....	76
C. Efecto del consumo de fructanos de <i>A. tequilana</i> y <i>Dasyilirion</i> sp.	
en ratones.....	88
a. Peso y contenido de lípidos de hígado y tejido epididimal.....	89
b. Niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no	
esterificados en sangre.....	89
c. Análisis histológicos.....	93
d. Peso del ciego.....	93
e. Ácido ribonucleico mensajero de proglucagon intestinal	
(precursor) y niveles de péptido-1 tipo glucagon en intestino	
y vena porta.....	94
XII. CONCLUSIONES.....	103
XIII. ABREVIATURAS.....	106
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	107
XV. APÉNDICE.....	122
A. Análisis tipo MALDI-TOF-MS de los fructanos de <i>Agave tequilana</i>	
y <i>Dasyilirion</i> sp.....	122
B. Curvas de crecimiento para <i>Bifidobacteria</i> spp y <i>Lactobacillus</i>	
spp.....	123
C. Programa de la reacción en cadena de la polimerasa-	
transcriptasa reversa (RT-PCR).....	124
D. Artículo publicado.....	125

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biodiversidad de los géneros <i>Agave</i> y <i>Dasyilirion</i> en México.....	19
Figura 2. Clasificación taxonómica del género <i>Agave</i>	20
Figura 3. Clasificación taxonómica del género <i>Dasyilirion</i>	20
Figura 4. Estructura molecular básica de los fructanos de <i>A. tequilana</i> var. azul.....	24
Figura 5. Clasificación de los fructanos de <i>Agave</i> spp. y <i>Dasyilirion</i> sp.....	25
Figura 6. Efecto bifidogénico de fructanos tipo inulina.....	32
Figura 7. Cuenta bacteriana viable en el intestino grueso obtenida de víctimas humanas (muerte repentina) y producción de ácidos grasos de cadena corta en el contenido intestinal.....	34
Figura 8. Efectos metabólicos de los ácidos grasos de cadena corta en el organismo.....	38
Figura 9. Panorama mundial de la obesidad.....	43
Figura 10. Efecto de la administración de glucosa por vía oral comparada contra intravenosa sobre los niveles plasmáticos de glucosa y péptido C.....	53
Figura 11. Proglucagon y péptidos derivados.....	54
Figura 12. Conformación del islote de Langerhans y efectos pancreáticos de péptido-1 tipo glucagon.....	58
Figura 13. Efectos de péptido-1 tipo glucagon en las células β.....	59
Figura 14. Proceso de inactivación de péptido-1 tipo glucagon por la enzima dipeptidil peptidasa IV.....	60
Figura 15. Material vegetal e inulinas comerciales utilizadas.....	67
Figura 16. Esquema general de trabajo de los experimentos <i>in vitro</i>	69
Figura 17. Esquema general de trabajo de los experimentos <i>in vivo</i>	71
Figura 18. Cromatografía de capa fina de los fructanos de <i>Agave</i> spp. y <i>Dasyilirion</i> sp.....	77
Figura 19. Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de <i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> y <i>B. longum</i> incubados anaeróticamente a 37°C en la presencia de 10 g de fructanos/L.....	78
Figura 20. Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> y <i>L. rhamnosus</i> incubados anaeróticamente a 37°C en la presencia de 10 g de fructanos/L.....	79

Figura 21. Ganancia de peso corporal.....	90
Figura 22. Ingesta de energía total.....	92
Figura 23. Efecto de la dieta sobre el peso del ciego en ratones.....	94
Figura 24. Concentración intestinal de GLP-1 (7-36) amida.....	96
Figura 25. Concentración de GLP-1 (7-36) amida en vena porta.....	96

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grado de polimerización promedio estimado para los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp..... 21

Tabla 2. Contenido porcentual de fructanos en base húmeda para algunas importantes fuentes vegetales..... 27

Tabla 3. Panorama epidemiológico de la diabetes..... 48

Tabla 4. Agentes terapéuticos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. 51

Tabla 5. Efectos antidiabetogénicos de péptido-1 tipo glucagon..... 52

Tabla 6. Descenso de pH debido a la fermentación de fructanos por *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*..... 84

Tabla 7. Descenso de pH debido a la fermentación de fructanos por *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*..... 86

Tabla 8. Concentración de los ácidos grasos de cadena corta generados a través de la fermentación de 4 diferentes fructanos..... 87

Tabla 9. Efecto de la dieta sobre la ingesta de alimento, producción de heces, peso de hígado y tejido epididimal..... 91

Tabla 10. Efecto de la dieta sobre los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en hígado..... 92

Tabla 11. Concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en sangre..... 93

Tabla 12. Niveles de mRNA de proglucagon en el ciego..... 95

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica relacionada a obesidad e inactividad física. Un manejo nutricional apropiado es una manera importante de controlar y manejar los desordenes metabólicos asociados con la acumulación excesiva de grasa y/o glucosa. En ese contexto, la Asociación

Americana de la Diabetes recomienda incrementar el consumo de fibra, principalmente fibra que sea fermentada en el ciego-colon. Los fructanos son carbohidratos no digeribles en el tracto gastrointestinal, y fermentables por bacterias probióticas en el intestino grueso. Este tipo de carbohidratos ha mostrado importantes efectos metabólicos como una disminución en el desarrollo de tejido adiposo y de esteatosis hepática, así como también una disminución en los niveles de glicemia, todos estos efectos se han reportado como una consecuencia del incremento en la producción de incretinas. El péptido-1 tipo glucagon (GLP-1) es una incretina secretada por las células L intestinales derivado de la expresión del gen proglucagon; es un importante regulador de las células β pancreáticas, promueve la secreción de insulina, el crecimiento celular y neogénesis del islote pancreático, además, se le considera como un importante péptido sacietogénico. En relación a las plantas que contienen fructanos, el género *Agave* contiene importantes cantidades de fructanos con interesantes propiedades nutraceuticas y biotecnológicas, sin embargo, no existen reportes sobre sus efectos prebióticos y fisiológicos cuando son incorporados en la dieta. Por todo lo anterior, se decidió evaluar el efecto prebiótico *in vitro*, así como también el efecto de suplementar la dieta de ratones con 10% de fructanos de agave, dasyilirion o achicoria (control positivo) en el metabolismo de glucosa y lípidos.

11

El propósito de los experimentos *in vitro* fue evaluar la capacidad de diferentes bacterias probióticas para utilizar a los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. como fuente de carbono. Los resultados que se obtuvieron indican que las bifidobacterias y los lactobacilos fueron capaces de crecer usando a estos fructanos. La absorbancia y valores de pH obtenidos, mostraron que la mayoría de los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. estimularon el crecimiento de ambos géneros bacterianos más eficientemente que las inulinas comerciales, siendo *Dasyilirion* sp. de Chihuahua y *Agave tequilana* Weber var. azul de Guanajuato, los fructanos más efectivos. Después de evaluar el efecto prebiótico se seleccionaron los 2 mejores fructanos para la realización de los

experimentos *in vivo*, donde se utilizaron ratones macho C57BL/6J alimentados con una dieta estándar (STD) o suplementada con Raftilosa P₉₅ (RAF), fructanos de *Agave tequilana* var. azul de Guanajuato (ATG) o fructanos de *Dasyilirion* sp. de Chihuahua (DSC) durante 5 semanas. La ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento en los ratones alimentados con la dieta suplementada con fructanos fueron significativamente menores al compararlos con STD (Estándar), ATG generando el valor más bajo. Glucosa y colesterol fueron similarmente disminuidos en todos los grupos alimentados con fructanos, no así en el grupo STD. Por otra parte, con respecto a los triglicéridos, solamente RAF mostró una disminución significativa. Como previamente ha sido reportado para los fructanos de achicoria (fructooligosacáridos), la suplementación con los fructanos de *A. tequilana* y *Dasyilirion* sp. indujo una mayor concentración de GLP-1 y de su precursor, el mRNA de proglucagon en los diferentes segmentos colónicos evaluados, esto sugiere que los fructanos fermentables de diferente origen botánico y estructura

12

Page 13

química, son capaces de promover la producción de péptidos incretinas/sacietogénicos en la parte inferior del intestino, con efectos promisorios en el metabolismo de glucosa, peso corporal y desarrollo de tejido adiposo, lo cual puede ser de interés para el control de la diabetes y la obesidad.

ABSTRACT

Diabetes type 2 is a critical disease definitely linked to obesity and physical inactivity. Appropriate nutritional advice is an important way to control and manage all the metabolic disorders associated with excessive fat and glucose storage. In this context, current recommendations for the management of obesity and diabetes mellitus include an increase in dietary fiber intake. It has been proposed that some carbohydrates, which are fermented in the caeco-colon, might be of particular interest in the fields of obesity and diabetes. Fructans are non-digestible and fermentable carbohydrates, which present positive metabolic effects (decrease in fat mass, steatosis, and glycemia). Interestingly, the fermentation of fructans in the colon promotes incretin production. Incretin (Glucagon-like peptide or GLP-1) is secreted by endocrine L cells after post-translational modification of the peptide derived from proglucagon gene expression; it is an important regulator of the pancreatic β -cell, known to promote insulin secretion, proinsulin biosynthesis, and islet cell growth and neogenesis. Incretins are also considered as key satietogenic peptides. In the last decade, it has been proved that the *Agave* genus contains important amounts of native fructans, with relevant nutritional and technological properties, but no data has been reported on their physiological effect when added in the diet. Therefore, we decided to evaluate the prebiotic potential of

different agave and dasyllirion fructans obtained from different *Agave* species including *Dasyllirion* sp. as well as their physiological effect by supplementing the diet of mice with 10% of *Agave tequilana* Weber var. azul, *Dasyllirion* sp. or chicory fructans from Orafiti (Raftilose P95) as positive control.

14

Page 15

The aim of the *in vitro* experiments was to evaluate the capacity of different probiotics (strains of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*) to use different agave and dasyllirion fructans as solely carbon source. The results obtained indicate that *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* were able to growth using these fructans. The observed absorbances and pH values showed that most agave and dasyllirion fructans stimulated the growth of all strains more efficiently than the commercial inulin (Raftilose P95). *Dasyllirion* sp. from Chihuahua and *A. tequilana* var. azul from Guanajuato were the most effective fructans with *B. adolescentis* and *L. acidophilus*. After evaluating the prebiotic effect, the best fructans were selected for the *in vivo* experiments. Male C57Bl/6J mice were fed a standard (STD) diet or a diet supplemented with Raftilose P95 (RAF), fructans from *A. tequilana* var. azul Gto. (ATG) or fructans from *Dasyllirion* sp. Chih. (DSC) for five weeks. In general, fructan supplementation decreased daily food and/or calorie intake and body weight gain, and increased feces excretion compared with STD diet, ATG leading to the lowest value. Serum glucose and cholesterol were similarly lower in all fructans-fed groups than in the STD group. Only RAF led to a significant decrease in serum TAG. As previously shown for RAF, the supplementation with agave fructans (*A. tequilana* var. azul Gto. and *Dasyllirion* sp.) induced a higher concentration of GLP-1 and its precursor, proglucagon mRNA, in the different colonics segments, thus suggesting that fermentable fructans from different botanical origin and chemical structures are able to promote the production of satietogenic/incretin peptides in the lower part of the gut, with promising effects on lipid metabolism, body weight, and fat mass development.

The main findings of this study emphasize the potential of improving glucose and lipid homeostasis as well as the modulation of GLP-1 and proglucagon

expression by fructans from *A. tequilana* var. azul and *Dasyilirion* sp. Finally, these results present an important positive influence on glucose and body weight control, which might be of interest in the control of diabetes and obesity, in addition to their prebiotic properties.

I. INTRODUCCIÓN

México es considerado el centro de origen y biodiversidad del género *Agave*, debido a que un gran número de especies se encuentran dentro de su territorio. Estas plantas presentan metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) y su principal producto fotosintético son los fructanos. Los fructanos son polímeros de fructosa generalmente unidos a una molécula de glucosa terminal. Debido a la configuración β del carbono 2 anomérico en sus monómeros de fructosa, los fructanos son resistentes a hidrólisis por las enzimas digestivas humanas y pueden llegar a ser fermentados por la microflora colónica que producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Los fructanos poseen numerosas propiedades nutraceuticas, siendo una de ellas su efecto prebiótico. Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible en el hospedero que estimula selectivamente el crecimiento o actividad de algunas bacterias en el colon que pueden mejorar la salud del hospedero. Los fructanos afectan procesos fisiológicos y bioquímicos en ratas y humanos lo que ocasiona una mejora en la salud y reducción en el riesgo de muchas enfermedades, estimulando el sistema inmunológico, disminuyendo los niveles de bacterias patogénicas en el intestino. Alivian el estreñimiento, disminuyen el riesgo de osteoporosis incrementando la absorción mineral, reducen el riesgo de aterosclerosis disminuyen la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado y disminuyen su nivel en sangre (Gibson y col., 2003; Roberfroid, 2001; Gibson y col., 1995; Gibson y Wang, 1994). La inulina y los fructooligosacáridos también reducen la incidencia de cáncer de colon. Esos fructanos modulan el nivel hormonal de insulina y glucagon disminuyendo los niveles de glucosa en sangre, así como también se ha reportado que modulan los niveles del péptido-

17

l tipo glucagon, siendo este péptido de gran relevancia actualmente como posible agente terapéutico en el tratamiento de la obesidad y la diabetes.

II. AGAVE

Del griego, *Agave*, *Agavus*, significa admirable y fue a partir de la especie *Agave americana* que Carlos Linneo describió el género en 1753. Las plantas del género *Agave* son de gran importancia para México, debido a que nuestro país es considerado su centro de origen y biodiversidad. Actualmente se encuentran reportadas 136 especies dentro del territorio Mexicano (García-Mendoza y Galván, 1995; Nobel, 1998).

La variabilidad del género *Agave* es amplia y diversa (Figura 1), algunos ejemplos de tal variabilidad son los siguientes, *Agave lechuguilla*, *A. atrovirens* y *A. mapisaga* se encuentran en la altiplanicie Potosina; *A. tequilana*, *A. longisepala* y *A. subtilis* en la región Occidental; *A. pacifica*, *A. palmeri* y *A. zebra* en la zona del Pacífico; *A. americana*, *A. striata* y *A. lechuguilla* en el estado de Hidalgo; *A. fourcroydes* y *A. sisalana* en la península de Yucatán; *A. cantala*, *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii* en el estado de Oaxaca; *A. salmiana* y *A. mapisaga* en el Valle de México (Granados, 1993; Nobel, 1998).

Hoy en día la clasificación taxonómica aceptada para las plantas de agave es la que se muestra en la Figura 2 (USDA Plants Data Base; Nobel, 1998; Wang y Nobel, 1998; Dahlgren y col., 1985).

18

Dasyllirion spp.
CHIHUAHUA

A. angustifolia
SONORA

A. salmiana
SAN LUIS POTOSÍ

A. fourcroydes
YUCATAN

A. tequilana
JALISCO y GTO.

A. angustifolia, potatorum y cantala
OAXACA

Figura 1. Biodiversidad de los géneros *Agave* y *Dasyllirion* en México.

Page 20

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Liliopsida*
Orden: *Liliales*
Familia: *Agavaceae*
Género: *Agave*

Figura 2. Clasificación taxonómica del género *Agave*.
Fuente: USDA Plants Data Base.

En cuanto a *Dasyllirion*, este género se encuentra dentro del mismo orden que los agaves, *Liliales*, lo cual se debe a que poseen características similares tal como la morfología, distribución geográfica y características del polen, sin embargo, presentan diferencias genéticas en cuanto al número de cromosomas, motivo por el cual *Dasyllirion* se clasificó dentro de otra familia, la *Liliaceae* (Figura 3) (USDA Plants Data Base).

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Liliopsida*
Orden: *Liliales*
Familia: *Liliaceae*
Género: *Dasyllirion*

Figura 3. Clasificación taxonómica del género *Dasyllirion*.
Fuente: USDA Plants Data Base.

A. Usos del Agave

Desde la antigüedad, las plantas de agave o maguey, como son llamadas en México, han representado una importante fuente de fibra, medicina y producción de bebidas alcohólicas.

Dentro de los principales usos que se le han dado a las plantas de agave y los cuales juegan un importante papel dentro de la economía Mexicana, se encuentran la producción de bebidas alcohólicas, como el tequila, mezcal, pulque y bacanora (Granados, 1993). La producción de bebidas depende de la acumulación de carbohidratos en los tallos de las plantas de agave. En el caso de *Dasyilirion*, se le atribuye la elaboración de sotol, el cual es una bebida alcohólica típica en los estados de Chihuahua y Durango.

Sin embargo, existen otros usos no menos importantes, como por ejemplo, la formulación de alimentos donde se utilizan la base de las hojas, tallos e inflorescencias. Desde un punto de vista ornamental, las plantas de agave, principalmente *A. americana* son comercializadas en Europa (Nobel, 1998; Granados, 1993).

B. Metabolismo del Agave

La mayoría de las plantas fijan el bióxido de carbono durante la fotosíntesis en presencia de luz solar. Bajo estas condiciones, los estomas se encuentran abiertos y presentan una gran pérdida de humedad. Algunas plantas que evolucionaron en condiciones de poca humedad modificaron su metabolismo con la finalidad de ahorrar agua. Así los estomas sólo se abren en la oscuridad para tomar el bióxido de carbono y se cierran durante el día. Este tipo de metabolismo se encontró por primera vez en plantas de la familia Crassulaceae

y se llamó metabolismo ácido de las crasuláceas, y a las plantas que lo presentan se les denomina tipo CAM (Valenzuela-Zapata, 1997).

La más importante adaptación fisiológica de las plantas de agave y dasyliirion es su metabolismo tipo CAM (Santamaría y col., 1995). En 1953, Sánchez-Marroquín y Hope reportaron que el principal producto fotosintético de estas plantas son los fructanos (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953).

Los fructanos en las plantas de agave y dasyliirion son sintetizados y almacenados en el tallo y su principal función es como carbohidratos de reserva. También se ha reportado que actúan como osmoprotectores en medio ambiente de sequía, constituyendo quizás otra posible adaptación fisiológica hacia climas extremos (Wang y Nobel, 1998). Debido a que los fructanos son solubles en agua, estos son osmóticamente activos. Cambiando el grado de polimerización (DP) de los fructanos en la vacuola de la planta, ésta puede cambiar el potencial osmótico de sus células sin alterar la concentración total de carbohidratos. La hidrólisis interna de los fructanos por endoinulinasas disminuye el grado de polimerización dando origen a fructanos tipo F_n y GF_n (m y n corresponden a unidades de fructosa). Estas moléculas permiten que la planta se osmorregule, sobreviviendo periodos de frío y sequía (Boeckner y col., 2001).

La estructura de los fructanos parece ser dependiente de la especie, tal como lo reportaron Bonnet y col. (1997) quienes propusieron la elucidación de la estructura de fructanos como un marcador taxonómico potencial de Poaceae. En el caso de las especies de *Agave* ha sido reportada más de una estructura para los fructanos. Sánchez-Marroquín y Hope (1953) y Bathia y Nandra (1979) reportaron a los fructanos tipo inulina como los principales carbohidratos de

reserva en *A. tequilana* y *A. americana*, respectivamente. Por otro lado, López y col. (2003) reportaron la estructura molecular para los fructanos de *A.*

tequilana var. azul, la cual consiste de una mezcla compleja de fructooligosacáridos presentando principalmente enlaces $\beta(2-1)$, pero también observaron enlaces del tipo $\beta(2-6)$, con ramificaciones y con glucosa terminal o interna (Figura 4).

Siguiendo con el análisis estructural de los fructanos de agave, Mancilla-Margalli y López (2006) reportaron las diferencias estructurales entre los fructanos de agave dentro de las mismas especies pero que crecieron en diferentes regiones ambientales. La heterogeneidad estructural observada, mencionan, puede ser atribuida a los mecanismos de adaptación de la planta para sobrevivir en áreas hostiles. Mancilla-Margalli y López clasificaron a los fructanos de agave en 3 grupos principales dependiendo del grado de polimerización (DP) promedio y la abundancia de enlaces (Tabla 1) con 2 diferentes estructuras, siendo estas, graminanos y agavinas (Figura 5).

Tabla 1. Grado de polimerización promedio estimado para los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp.

Grupo	DP estimado
I	
<i>A. angustifolia</i> Oax	32
<i>A. tequilana</i> Jal	18
<i>A. potatorum</i> Oax	15
<i>A. angustifolia</i> Son	13
II	
<i>A. cantala</i> Oax	11
<i>Dasyilirion</i> sp. Chih	9
<i>A. fourcroydes</i> Yuc	6
III	
<i>A. tequilana</i> Gto	7

Fuente: Mancilla-Margalli y López, 2006.

Inulina
 $\beta(2-1)$

Neoserie
(Glucosa interna)

Levano
 $\beta(2-6)$

Figura 4. Estructura molecular básica de los fructanos de *A. tequilana* var. azul.
Fuente: López y col. (2003)

24

Graminanos

Neofructanos (Agavinas)

Grupo I

Grupo II

Grupo III

Figura 5. Clasificación de los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp.
Fuente: Mancilla-Margalli y López, 2006.

25

Page 26

III. CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos son componentes esenciales para todos los organismos vivos y son además, la clase de moléculas biológicas más abundante. La unidad básica de los carbohidratos se conoce como monosacáridos o azúcares simples. Los oligo y polisacáridos consisten de monosacáridos unidos covalentemente.

La sacarosa y el almidón son los carbohidratos más comunes y mejor conocidos, son los carbohidratos de reserva en las plantas superiores, sin embargo, aproximadamente el 15% de las plantas con flores almacenan fructanos como una reserva en al menos uno de sus órganos durante su ciclo de vida (Kaur y Gupta, 2002; Van Laere y Van den Ende, 2002). La presencia de fructanos en plantas se ha relacionado también con aspectos de protección contra déficit de agua causado por sequía o bajas temperaturas (Wang y Nobel 1998). Las especies vegetales que contienen fructanos se encuentran distribuidas en algunas familias de mono- y dicotiledóneas tales como Liliaceae, Amaryllidaceae, Gramineae, Compositae y Agavaceae, existiendo diferencias estructurales entre dichas familias de plantas. Las especies de

dicotiledóneas almacenan fructanos tipo inulina, mientras que en monocotiledóneas se pueden encontrar fructanos más complejos y de tipo ramificado (Kaur y Gupta, 2002; Vijn y Smeekens, 1999). Partes de varias especies de plantas que contienen fructanos son frecuentemente consumidos como vegetales, algunos ejemplos son los espárragos, ajo, cebolla, alcachofa y achicoria (van Loo y col., 1995). Algunas fuentes importantes de fructanos son dadas en la Tabla 2.

26

Tabla 2. Contenido porcentual de fructanos en base húmeda para algunas importantes fuentes vegetales.

Fuente vegetal	Contenido de fructanos	^a (%)
Espárrago	10-15	
Ajo	15-20	
Alcachofa	15-20	
Dalia	15-20	
Achicoria	15-20	
Agave ^b	15-22	

^a Kaur y Gupta, 2002; ^b Datos del laboratorio.

Los fructanos aislados de plantas tienen una amplia variedad de aplicaciones. En el caso de los fructanos de bajo DP, éstos muestran un sabor dulce, mientras que los de alto DP forman emulsiones con una textura tipo grasa y sabor neutro, por lo que hay gran interés por parte de la industria de los alimentos en usar estos carbohidratos como ingredientes alimenticios bajos en calorías y/o como ingredientes nutraceuticos (Frank, 2002; Vijn y Smeekens, 1999).

IV. FRUCTANOS

Los fructanos son carbohidratos no reductores y solubles en agua, compuestos por unidades fructosil, que suelen contener una molécula de glucosa terminal. Su estructura puede ser lineal o ramificada y algunas veces cíclica (López y col., 2003; Wang y col., 1999). Vijn y Smeekens (1999) clasificaron a los fructanos en cinco grupos principales según las unidades estructurales mayoritarias que conforman su molécula en: inulinas, levanos, graminanos, inulinas neoserie y levanos neoserie.

Los fructanos del tipo de las inulinas consisten de unidades fructosil $\beta(2-1)$, que inicialmente presentan una molécula de glucosa a partir de la cual se le unen por lo menos dos residuos de fructosa. La molécula de inulina más corta es la

27

 Page 28

1-cestosa, también llamada isocestosa. Los levanos, en lugar de presentar el tipo de enlace que se observa en las inulinas, presentan enlaces $\beta(2-6)$. Los graminanos están compuestos tanto de enlaces $\beta(2-1)$ como $\beta(2-6)$. Un ejemplo de este tipo de fructanos es la bifurcosa. Las inulinas neoserie contienen unidades fructosil con enlaces $\beta(2-1)$ unidas tanto al carbono 1 como al 6 de la molécula de glucosa. Esto resulta en un polímero de fructanos con una cadena de inulina en ambos extremos de la molécula de glucosa (mF2-1F2-6G1-2F1-2Fn). La inulina neoserie más pequeña, es la neocestosa. Por último, los levanos neoserie son polímeros predominantemente con enlaces $\beta(2-6)$ unidos a ambos extremos de la molécula de glucosa. La presencia de fructanos en plantas aún no está completamente entendida. Además de su función como carbohidratos de reserva, la síntesis de fructanos regula la concentración de sacarosa en la vacuola y ayuda a la planta a tolerar el estrés por sequía o frío (Vijn y Smeekens, 1999).

Las dos especies que se usan actualmente dentro de la industria para la obtención de inulina y fructooligosacáridos pertenecen a la familia Asteraceae, estas especies son alcachofa (*Helianthus tuberosus*) y achicoria (*Chicorium intibus*), siendo la última la más comúnmente utilizada (Debruyn y col., 1992).

La inulina es procesada por la industria de los alimentos para producir fructanos de cadena corta, denominados fructooligosacáridos (DP 2 a 10; promedio de 5), como resultado de hidrólisis enzimática parcial. Además de la inulina y sus hidrolizados que provienen de fuentes vegetales, la industria de los alimentos también produce fructanos sintéticos (Kaur y Gupta, 2002; Crittenden y Playne, 1996).

28

La importancia de los fructanos radica en que pueden utilizarse como ingrediente alimenticio bajos en energía y funcionar como edulcorantes o como sustituto de grasas; sin restarle mérito a su efecto prebiótico, donde han mostrado, como una consecuencia directa del consumo de estos carbohidratos, efectos positivos en la salud, como mayor absorción de minerales, inhibición en el desarrollo de cáncer de colon y disminución de triglicéridos y colesterol en la sangre (Vijn y Smeekens, 1999).

La ingesta diaria promedio de fructanos para humanos se ha estimado entre 3 y 11 g en Europa y entre 1 y 3 g en los Estados Unidos, por lo que es deseable incrementar la ingesta a 15 g/d (Roberfroid y col., 1998). La mayor ingesta de fructanos se puede alcanzar ya sea incrementando el consumo de fuentes vegetales que sean ricas en fructanos, tal como trigo, cebada, tubérculos de achicoria, cebolla y ajo o bien suplementado los alimentos con fructanos como un ingrediente alimenticio (Finke y col., 2002).

V. PREBIÓTICOS

Una de las propiedades de promoción de la salud por ciertos componentes alimenticios, principalmente compuestos como los fructanos, es su efecto prebiótico.

Debido a la configuración β del carbono 2 anomérico en sus monómeros de fructosa, los fructanos son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas (α -glucosidasa, maltasa, isomaltasa y sacarasa), las cuales son específicas para enlaces α -glicosídicos, siendo clasificados entonces, los fructanos, como oligosacáridos no digeribles. Debido a que la hidrólisis que sufren los fructanos durante su recorrido desde que son ingeridos hasta que llegan al intestino

grueso es mínima, esos carbohidratos pasan sin ser digeridos hasta llegar al

colon. Sin embargo, la medición del grado de digestibilidad que presenta cualquier sustancia *in vivo* es difícil. Un modelo útil para realizar tales estudios, es el paciente con ileostomía a través de la cual se puede aspirar el contenido ileal. Cummings y col. (2001) encontraron que al menos el 90% de la inulina y fructooligosacáridos ingeridos alcanza el colon. Por otro lado, Nilsson y Bjorck (1988) incubaron inulinas de diferentes cereales en jugo gástrico humano por 1 hora a 37°C y encontraron que a pH 1.05 se hidrolizaron de 10 a 15% de los carbohidratos, pero a pH 1.8 el grado de hidrólisis fue menor al 1%. Una prueba adicional de su indigestibilidad es el hecho de que no se ha observado un incremento en los niveles de glucosa después de que son ingeridos (Kaur y Gupta, 2002; Cummings y Macfarlane, 2002; Cummings y col., 2001; Coudray y col., 1997).

Para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico, debe reunir los siguientes requisitos: **1)** no ser hidrolizado o absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal, **2)** ser sustrato selectivo para un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, por ejemplo, *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, cuyo crecimiento se estimula y **3)** como una consecuencia, ser capaz de alterar la microflora colónica hacia una población o actividad potencialmente más saludable. Por lo tanto, cualquier ingrediente que logre llegar al intestino grueso podría ser un prebiótico. Sin embargo, para que sea efectivo, es crucial la fermentación selectiva por la microbiota colónica (Roberfroid, 2001).

30

A. Prebióticos, Probióticos y Efecto Bifidogénico

Una vez que los carbohidratos no digeridos en el intestino delgado llegan al colon, éstos son susceptibles a fermentación por las bacterias. La microflora intestinal humana esta compuesta por más de 400 especies; el colon es la porción que tiene la más alta población bacteriana (10^{10} a 10^{12} ufc/g) (Gibson y col., 2003; Salminen y col., 1998). Los Lactobacilli constituyen sólo 0.07 a 1%

de la población bacteriana intestinal, mientras que Bifidobacteria representan del 25 al 30%. Las cepas de Bifidobacteria y Lactobacilli son consideradas como probióticas, por lo cual se está generando un gran interés en estimular su crecimiento en el intestino grueso. Guarner y Schaafsma (1998) definen a los probióticos como microorganismos vivos que al ser ingeridos en cierta cantidad tienen efectos benéficos en la salud más allá de su función alimentaria. McKellar y Modler (1989) reportaron que las principales cepas probióticas encontradas en el intestino grueso de niños son *Bifidobacterium bifidum* y *B. infantis*. En el intestino grueso de adultos se encuentran predominantemente *B. adolescentis* y *B. longum*, mientras que en el intestino de animales predominan *B. thermophilum* y *B. pseudolongum*. Tratando de validar el efecto bifidogénico de los fructanos, en un estudio *in vitro* Gibson y Wang (1994) compararon el efecto de 10 g/L de glucosa y de fructooligosacáridos (oligofructosa) en cultivos con microbiota fecal por un período de incubación de 12 h y obtuvieron que la utilización de estos fructanos modificó significativamente la composición de dicha microbiota, estimulando el crecimiento de Bifidobacteria. El número de Bifidobacteria fue casi de 3 órdenes de magnitud mayor que Bacteroide (Figura 6). Además, la utilización

de fructooligosacáridos redujo significativamente la cuenta de Bacteroide y Clostridia y no se observó diferencia significativa en la cuenta de coniformes.



b.	-2	Bacteroide Bifidobacteria Clostridia	Coliformes	Bif. – Bact.
	-4			

Figura 6. Efecto bifidogénico de fructanos tipo inulina. Cultivo *in vitro* utilizando microbiota fecal. La glucosa y los fructooligosacáridos se utilizaron a una concentración de 10 g/L. Fuente: Gibson y Wang, 1994.

B. Tracto Gastrointestinal

El intestino grueso de humanos se encuentra compuesto por el ciego, colon ascendente, transverso, descendente, sigmoideo y recto. Es la principal área de colonización bacteriana del tracto gastrointestinal y es a través de la microflora, que el colon es capaz de realizar funciones hidrolíticas y digestivas complejas (Macfarlane y Macfarlane, 1997; Cummings y Macfarlane, 1991), estas funciones implican el rompimiento de componentes dietarios, principalmente carbohidratos complejos, pero también algunas proteínas que no fueron hidrolizadas ni absorbidas en el intestino delgado (Macfarlane y col.,

32

1992a). La disponibilidad de carbohidratos disminuye conforme los residuos dietarios pasan del colon proximal, al transverso y luego al distal (Macfarlane y Macfarlane, 2003).

Además de la dieta, el tiempo que tardan los residuos digestivos en el intestino grueso es un importante determinante del metabolismo bacteriano. Grandes tiempos de tránsito colónico afectan la digestión de carbohidratos y proteínas, existiendo una fuerte correlación entre el tiempo de tránsito y la masa bacteriana en el colon, donde tiempos de tránsito rápidos se asocian a alto peso de heces e incremento en la excreción de materia bacteriana (Stephen y col., 1987).

Desde los puntos de vista anatómico, microbiológico y ambiental, el ciego, colon proximal, medio y distal son bastante diferentes entre ellos. Cuando los residuos digestivos del ileum pasan al ciego, encuentran un “pool” de bacterias colónicas e inicia la hidrólisis de carbohidratos complejos y proteínas, sirviendo estos como fuente de carbono y nitrógeno.

Debido a la producción de ácidos durante la fermentación, el pH se ve reducido

a 5.5 o menos en el colon proximal (Cummings y col., 1987), y debido a los niveles relativamente altos de sustratos disponibles, el ciego y el colon ascendente son sitios con la más intensa actividad microbiana, aunque la densidad bacteriana incrementa distalmente a través del colon (Macfarlane y col., 1992b), como se muestra en la Figura 7.

La microbiota colónica interactúa con el intestino de muchas maneras, por ejemplo, la masa celular bacteriana estimula el movimiento peristáltico, por lo tanto, facilita el paso de los residuos digestivos a través del intestino.

33

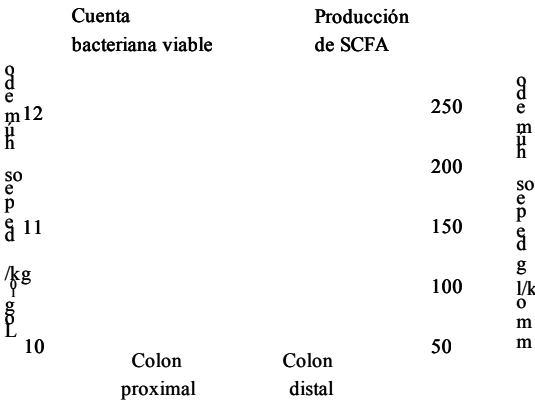


Figura 7. Cuenta bacteriana viable en el intestino grueso obtenida de víctimas humanas (muerte repentina) y producción de ácidos grasos de cadena corta en el contenido intestinal. Fuente: Macfarlane y col. (1992b).

Históricamente ha sido difícil demostrar los cambios significativos del efecto de la dieta sobre la composición de la población bacteriana intestinal, sin embargo, con la introducción y amplio estudio de los oligosacáridos prebióticos, en la última década se han generado trabajos donde se ha ido dilucidando tal efecto.

Gibson y col. (1995) demostraron que el incluir inulina como parte de la dieta cambia la composición de especies bacterianas del intestino grueso, a través de la reducción en el número de microorganismos putrefactivos e incrementando la población de Bifidobacteria. En este estudio las Bifidobacteria incrementaron de 8 a 20% de la cuenta total de anaerobios.

Entre las principales actividades de los microorganismos colónicos se

encuentra su implicación en el metabolismo de vitaminas. Directamente pueden sintetizar vitaminas que llegan a estar disponibles para el hospedero. En ratas, las bacterias intestinales han mostrado ser una fuente significativa de ácido fólico (vitamina B9), niacina (B3), piridoxina (B6) y cobalamina (B12) (Pompei y

34

 Page 35

col., 2007; Deguchi y col., 1985). Similarmente, más de la mitad de los requerimientos de vitamina K en humanos son suministrados por las bacterias colónicas (Fernández y Collins, 1987).

a. Fermentación

La microflora colónica rompe substratos dietarios para obtener energía para su crecimiento y para el mantenimiento de sus funciones por fermentación (Pérez-Chaia y Oliver, 2003).

Las bacterias del colon dependen del suministro de carbohidratos dietarios que hayan escapado a la digestión en el TGI superior (estómago e intestino delgado) para la obtención de energía. Estas bacterias poseen enzimas (glicosidasas) capaces de hidrolizar los enlaces de oligo- y polisacáridos no digeridos o parcialmente digeridos por las enzimas intestinales y luego metabolizan los monosacáridos resultantes (Macfarlane y Macfarlane, 2003; Pérez-Chaia y Oliver, 2003; Cummings y Englyst, 1987).

En una población compleja, como lo es la microflora colónica, el rompimiento de carbohidratos implica a más de una especie bacteriana. Los productos de fermentación de algunas especies son incorporados como metabolitos intermediarios a las rutas metabólicas de otras especies. Además de que otros factores implícitos a los carbohidratos también pueden afectar su hidrólisis en el intestino grueso, dentro de los que se pueden incluir, su composición química, su tamaño molecular y la solubilidad, entre otros (Morris, 1992; Englyst y col., 1987)

La fermentación colónica de inulina y fructooligosacáridos produce SCFA, lactato y gases como producto del metabolismo anaeróbico de las bacterias

(Macfarlane y Gibson, 1995). La mayor proporción de los SCFA (>95%) formada por las bacterias intestinales es absorbida y metabolizada por el hospedero (Cummings, 1995). Esto permite la obtención de energía de los alimentos que no son digeridos en el TGI superior, y que puede representar hasta un 9% de los requerimientos energéticos del hospedero (Hume, 1995). Los SCFA presentan un amplio intervalo de efectos fisiológicos en el cuerpo, incluyendo al metabolismo de los colonocitos (Roediger, 1980), el crecimiento y la diferenciación celular (deFazio y col., 1992), el transporte celular epitelial (del Castillo y col., 1994), el metabolismo de lípidos y carbohidratos en el hígado (Demigné y Remesy, 1994), la motilidad intestinal (Cherbut y col., 1996), así como la generación de energía en músculo, riñón, corazón y cerebro (Macfarlane y Cummings, 1991).

El acetato es el principal SCFA formado por los microorganismos intestinales, seguido por el propionato y el butirato. Las concentraciones de los SCFA son mayores en el colon proximal donde la acidez del contenido intestinal refleja los mayores niveles de carbohidratos fermentables que son disponibles para las bacterias en esa región intestinal (Cummings y col., 1987).

1. Efecto de la dieta en la producción de ácidos grasos de cadena corta

Como se ha mencionado anteriormente, la composición de la dieta se espera sea un factor importante que afecta la formación de los SCFA en el intestino grueso, sin embargo, esto ha sido difícil de demostrar en humanos. Esto se debe a los productos de fermentación que son utilizados por el colon, con el resultado de que la medición en SCFA en heces explica poco acerca de los

procesos de fermentación que ocurren en el intestino grueso (Cummings y Macfarlane, 1991).

Las dietas que contienen fibra producen mayores concentraciones de SCFA comparadas a las dietas que no la contienen. Los microorganismos colónicos producen enzimas que degradan polisacáridos, sin embargo, la solubilidad de los polisacáridos afecta la velocidad de hidrólisis enzimática. En ese sentido, se ha mostrado que polisacáridos solubles como las pectinas son hidrolizados más rápidamente que los xilanos, los cuales son relativamente insolubles (Cummings y Englyst, 1987).

2. Absorción de los ácidos grasos de cadena corta

Aunque es difícil determinar la estequiometría de la formación de los SCFA en humanos, esto sí se ha podido analizar *in vitro*. La producción de SCFA a partir de carbohidratos polimerizados depende de muchos factores, incluyendo el número y tipo de poblaciones bacterianas hidrolíticas y sacarolíticas en la microbiota colónica, así como también de la disponibilidad de sustrato disponible y de su composición química (Cummings, 1995).

Según el reporte de Anderson y Hanna (1999) el acetato atraviesa el hígado y entra a la circulación periférica, el propionato es extraído por el hígado y afecta el metabolismo de lípidos; el butirato es utilizado preferentemente por el epitelio colónico, donde produce energía y sólo una porción de este ácido llega al hígado (Figura 8).

Aunque los colonocitos pueden utilizar glucosa y glutamina como fuente de energía, las células epiteliales del colon obtienen hasta un 70% de su energía de los SCFA (Roediger, 1989; 1980), por lo que los SCFA absorbidos no

37

alcanzan el torrente sanguíneo debido a que son metabolizados en el epitelio gastrointestinal (Fitch y Fleming, 1999). El butirato es el combustible preferido por la mucosa, pero el propionato y acetato también son metabolizados. El butirato induce una variedad de cambios fisiológicos y morfológicos. Los efectos de butirato difieren considerablemente entre células normales y células

neoplásicas, es un fuerte agente que estimula la diferenciación, así como también, es antiproliferativo para varias líneas de cáncer de colon humano *in vitro* (Wilson y Weiser, 1992). Uno de los más importantes mecanismos de acción del butirato es la hiperacetilación de histonas (Kruh y col., 1995; Tanaka y col., 1989).

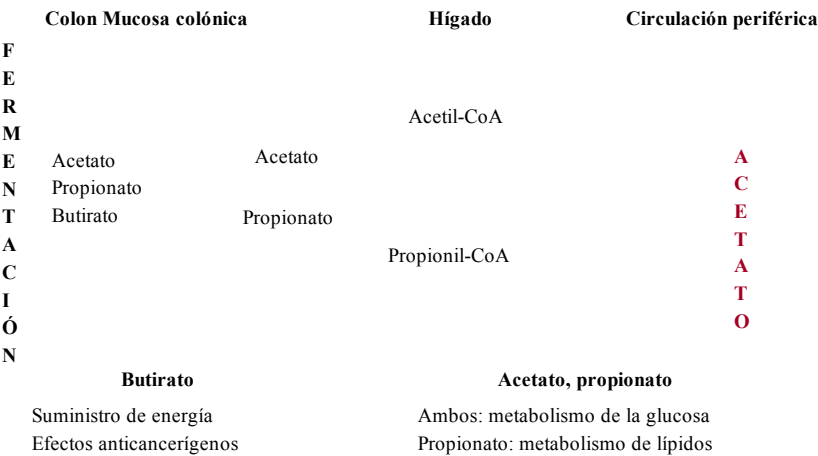


Figura 8. Efectos metabólicos de los ácidos grasos de cadena corta en el organismo. Fuente: Anderson y Hanna (1999).

Otro de los efectos que se le atribuyen al butirato es la regulación en la expresión de los genes que codifican para insulina y glucagon. Philippe y col. (1987) utilizaron células RIN 1056 (aisladas de un tumor del islote pancreático inducido por rayos X), las cuales se incubaron con o sin butirato (2 mM). De

este experimento se pudo concluir que la transcripción de ambos genes se vio incrementada por el butirato.

C. Efectos Fisiológicos

Además de los efectos funcionales de los fructanos como fibra dietaria, como se mencionó previamente, la inulina y los fructooligosacáridos son fermentados por las bacterias colónicas y se han considerado como ingredientes alimenticios funcionales, ya que afectan procesos fisiológicos y bioquímicos tanto en ratas como en humanos, resultando en una mejor salud y reducción del riesgo de muchas enfermedades. Estudios experimentales han mostrado su

uso como agentes bifidogénicos, estimulando el sistema inmune del cuerpo, disminuyendo los niveles de bacterias patogénicas en el intestino, aliviando el estreñimiento, disminuyen el riesgo de osteoporosis incrementando la absorción mineral (Carabin y Flamm, 1999; Coudray y col., 1997; Ohta y col., 1994), especialmente de calcio, reduciendo el riesgo de aterosclerosis disminuyendo la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado y disminuye su nivel en sangre (Roberfroid, 2001; Delzenne, 1999).

La inulina y los fructooligosacáridos también reducen la incidencia de cáncer de colon (Rao y col., 1998; Reddy, 1998; Rowland y col., 1998; Reddy y col., 1997; Wargovich y col., 1996). Los fructooligosacáridos han sido reportados como no cariogénicos debido a que *Streptococcus mutans* no los utiliza para la producción de ácidos y de glucanos insolubles, los cuales son los principales responsables de la caries dental (Kaur y Gupta, 2002). Otra importante característica de los fructanos es que son ingredientes de bajo contenido calórico, su valor energético es solamente del 40% al 50% comparado a

39

 Page 40

carbohidratos digeribles, es decir, proporcionan de 1 a 2 Kcal/g, por tal motivo, tanto la inulina como los fructooligosacáridos son utilizados en la formulación de dietas para personas obesas (Kaur y Gupta, 2002). Los fructanos también modulan el nivel hormonal de insulina y glucagon (Luo y col., 1996; Boillot y col., 1995), por medio de la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Delzenne, 1999) disminuyendo los niveles de glucosa en sangre. Por último, el consumo de fructanos se ha reportado que tiene efectos sobre la modulación del gen proglucagon incrementando como consecuencia, los niveles de la incretina GLP-1 y confiriendo así, efectos positivos en obesidad y diabetes (Cani y col., 2006b; 2005; 2004).

a. Glicemia e insulinemia

Los efectos del consumo de inulina y fructooligosacáridos en glicemia e insulinemia no han sido completamente elucidados, y los datos disponibles son algunas veces contradictorios, indicando que esos efectos pueden depender de

condiciones fisiológicas (ayunas comparado contra estado postprandial) o enfermedad (diabetes, por ejemplo) (Kaur y Gupta, 2002).

Oku y col. (1984) reportaron que los fructooligosacáridos a una dosis de 10% de la dieta de ratas por 30 días, redujeron glicemia e insulinemia postprandial en un 17% y 26%, respectivamente. Por otro lado, Yamashita y col. (1984), en un estudio con personas diabéticas observaron que cuando la dieta fue suplementada con 8 g/d de fructooligosacáridos durante 14 días, los niveles de glucosa sanguínea en ayunas disminuían.

40

Page 41

La menor gluconeogénesis hepática inducida por la ingesta de inulina y fructooligosacáridos puede ser mediada por los SCFA, especialmente por propionato.

El propionato adicionado a la dieta de ratas durante 4 semanas, redujo los niveles de glucosa sanguínea en ayunas (Boillot y col., 1995). El propionato también inhibió la gluconeogénesis en hepatocitos aislados, probablemente vía su conversión metabólica en metilmalonil-CoA y succinil-CoA, los cuales son inhibidores específicos de la piruvato carboxilasa (Baird y col., 1980).

1. Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un aumento de la masa grasa y en consecuencia por un aumento de peso. Existe entonces, un aumento en las reservas energéticas del organismo en forma de grasa. De acuerdo con la primera ley de la termodinámica, la obesidad es consecuencia de un desequilibrio entre el consumo y el aporte de energía (Marti y col., 2004; Barbany y Foz, 2002; Beysen y col., 2002).

La obesidad es un problema muy complejo, que resulta de la combinación de influencias genéticas, comportamientos individuales, cultura y factores económicos y ambientales, esta situación exige cambios no sólo a nivel del comportamiento individual, sino también cambios en la política pública, en el

medio social y en las normas culturales.

En nuestro país, como en muchas otras partes del mundo, se ha cambiado el estilo de vida. Se han ido adoptando nuevos regímenes alimenticios y un mayor sedentarismo, los cuales se han considerado como factores contraproducentes para mantener un buen estado de salud. Esto ha derivado en lo que

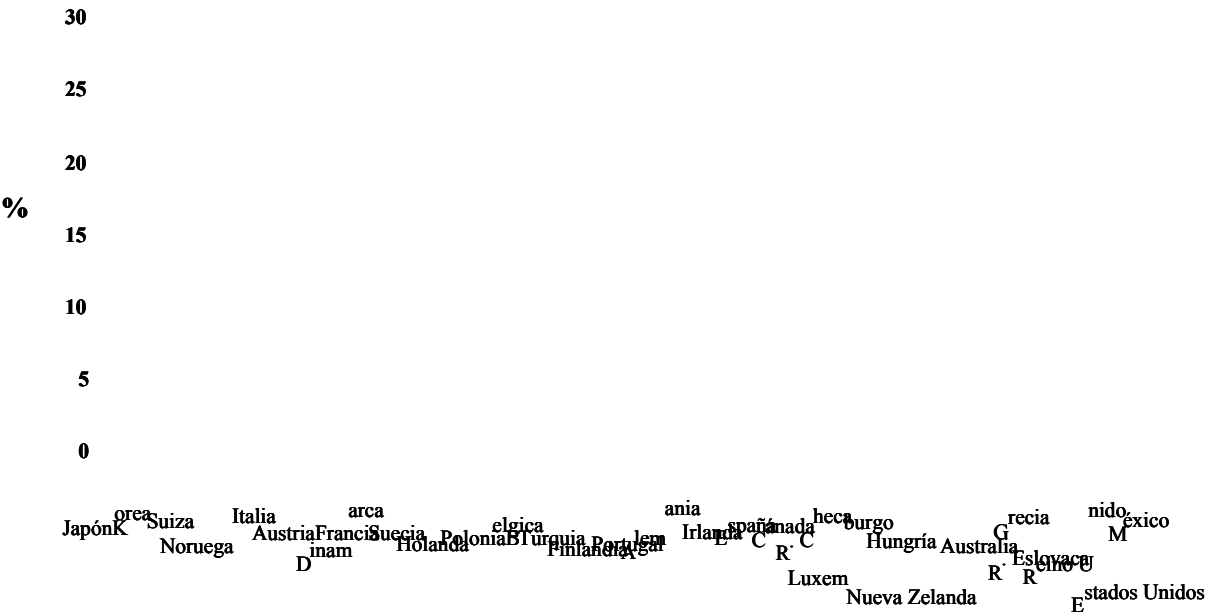
41

Page 42

conocemos como transición epidemiológica, estado en el que las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son las principales causas de muerte (SSA, México, 2003). Actualmente la obesidad, denominada la epidemia del siglo XXI, coloca a México dentro del panorama mundial (Figura 9), como el segundo país con el mayor porcentaje de su población padeciendo ésta enfermedad, después de Estados Unidos (OECD Factbook, 2006).

Desde el punto de vista antropométrico, que es habitualmente utilizado, se considera obesa a una persona con un índice de masa corporal igual o superior a 30 Kg/m^2 . Obesidad y sobrepeso son términos que denotan incremento del contenido de grasa en el cuerpo, por encima de un intervalo normal, ideal o estándar. La masa corporal guarda relación con la talla del sujeto. Por lo tanto, el grado de obesidad suele expresarse en relación con la talla, en la forma de índice de masa corporal (IMC, y el término en inglés, body mass index, BMI), que es el peso del cuerpo, en kilogramos, dividido entre la talla en metros elevada al cuadrado (Kg/m^2).

La obesidad es una enfermedad en cuya génesis están implicados diversos factores, muchos de los cuales todavía no se conocen muy bien. Los genes, el ambiente y el sedentarismo son factores que están implicados en esta enfermedad, así como también, los producidos por medicamentos o por distintas enfermedades.



(PVN), el núcleo dorsomedial (DMH), el área hipotalámica ventromedial (VMH) y área hipotalámica lateral (LH) y regiones no hipotalámicas como el núcleo del tracto solitario (NTS). Uno de los sistemas periféricos que informan de manera relevante al sistema nervioso central (SNC) sobre la situación nutricional del individuo es el tracto gastrointestinal (Konturek y col., 2004).

El aparato digestivo transforma y degrada los alimentos mediante procesos mecánicos y químicos para facilitar la asimilación de los nutrientes contenidos en ellos (Woods, 2004). Dichos procesos se acompañan de señales nerviosas y de la estimulación y secreción de distintas hormonas y péptidos, que mediante señalizaciones periféricas pueden informar al sistema nervioso central de la situación nutritiva y metabólica (Stanley y col., 2005). Por otro lado, no se pueden excluir ambas conexiones de otro sistema esencial en la regulación de la ingesta y balance energético: el tejido adiposo (Erlanson-Albertsson, 2005).

Determinados factores anorexigénicos y orexigénicos, como pueden ser GLP-1, insulina, leptina, entre otros, se generan en el tracto gastrointestinal en función del estado nutricional. Dichas señales interaccionan con neuropéptidos

Page 45

centrales implicados en la regulación del apetito y gasto energético como el neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada con aguti (AGRP), orexinas, hormona concentradora de melanina (MCH), pro-opiomelanocortina (POMC), entre otros.

En definitiva, el tracto gastrointestinal y el SNC participan conjuntamente tanto en la regulación del apetito a corto y mediano plazo, como en el control del gasto energético y por lo tanto, en la homeostasis energética y en la estabilidad de peso y composición corporal (Solomon y Martínez, 2006).

1.1 Tratamientos antiobesidad

La obesidad es una condición médica desafiante debido a la complejidad de su etiología. El peso corporal representa la integración de diferentes componentes biológicos y ambientales. Los componentes ambientales pueden ser

modificados a través de cambios en el comportamiento alimenticio y actividad física, mientras que los componentes biológicos son más difíciles de manejar.

Tradicionalmente, la eficacia de un nuevo tratamiento para la obesidad es medido por su efecto en el peso corporal, por lo cual, un tratamiento es considerado satisfactorio si evita una mayor ganancia de peso corporal, induce una pérdida de peso del 5 al 10% y permite el mantenimiento del peso alcanzado.

Los medicamentos antiobesidad pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo primario de acción en el balance de energía, dentro de los cuales encontramos cuatro clases generales; **1)** Los inhibidores de la ingesta de energía (o supresores del apetito) reduciendo la percepción de hambre, incrementando la sensación de saciedad, esto se logra actuando a nivel

45

Page 46

cerebral; **2)** los inhibidores de la absorción de grasas a través de mecanismos de acción gastrointestinales sin alterar la química cerebral; **3)** mejoradores del gasto de energía incrementando la termogénesis, sin requerir incremento en actividad física; y **4)** estimuladores de la movilización de grasas los cuales reducen la masa grasa y/o disminuyen la síntesis de triglicéridos (Campfield y col., 1998).

Las bases sobre las que descansa el tratamiento de la obesidad se orientan hacia la manipulación de la ecuación de equilibrio energético en un intento de conseguir un balance calórico negativo que conduzca a la reducción del exceso de grasa corporal, que es el elemento que define la condición de obesidad. En consecuencia, la instauración de un plan de alimentación hipocalórico equilibrado junto al aumento de actividad física y la consiguiente educación nutricional encaminada a la adquisición de hábitos saludables conforman el tratamiento convencional de la obesidad. El frecuente fracaso de estas medidas ha generado la necesidad de contar con recursos terapéuticos adicionales. Es precisamente la estimulación de algunos sistemas de neurotransmisión el mecanismo que más se ha aprovechado para modular el comportamiento alimentario y así aumentar la saciedad y/o disminuir el apetito.

En la última década, se ha mostrado que la incretina GLP-1 reduce la ingesta calórica y genera saciedad, muy probablemente vía receptores específicos dentro del sistema nervioso central, lo que resulta en una reducida ganancia de peso corporal y menor tejido adiposo en experimentos con animales (Meier y col., 2002; Zander y col., 2001; Gutzwiller y col., 1999; Flint y col., 1998; Turton y col., 1996).

46

Page 47

Meier y col. (2002) mencionan que GLP-1 muestra efectos anorexigénicos y puede tener un gran potencial en la farmacoterapia de la obesidad.

1.2. Obesidad y resistencia a la insulina

La obesidad es el primer factor de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). La razón de esta asociación tan estrecha entre obesidad y DMT2 es la resistencia a la insulina. Cuando la resistencia a la insulina se combina con una disminución en la secreción de insulina por las células pancreáticas, la glucosa sanguínea sube a los rangos de la diabetes (ayunas mayor o igual a 120 mg/dL \cong 7.0 mmol/L) (Beysen y col., 2002; Kopelman, 2000).

Los cambios fisiológicos responsables de las manifestaciones clínicas de la DMT2 incluyen la secreción defectuosa de la insulina, el aumento en la producción de glucosa por el hígado, la resistencia a la acción de la insulina en tejidos sensibles a ella (músculo, tejido adiposo e hígado) y los niveles altos en sangre de triglicéridos y ácidos grasos libres.

2. Diabetes

La diabetes es una enfermedad grave que se relaciona con la incapacidad del cuerpo para producir (tipo I) o regular (tipo 2) insulina, la cual controla los niveles de glucosa en la sangre. La prevalencia de la diabetes aumenta rápidamente entre la población, llegando a predecirse que para el año 2025, México podría ocupar el séptimo lugar dentro del panorama epidemiológico de esta enfermedad a nivel mundial, con un 12.3% de su población padeciendo

diabetes (Tabla 3). En nuestro país, la diabetes se ha convertido en la primera causa de muerte, superando a las enfermedades cardiovasculares, pero está

muy ligada con los fallecimientos por infartos, aseguran especialistas (Smith, 2007; SSA, 2005; King y col., 1998).

Tabla 3. Panorama epidemiológico de la diabetes.

País (2000)	%	País (2025)	% Incremento	
Brasil	5.5	Brasil	7.2	1.7
China	2.2	China	3.4	1.2
Egipto	10.2	Egipto	13.3	3.1
India	4.0	India	6.0	2.0
Indonesia	4.3	Indonesia	6.5	2.2
Japón	6.9	Japón	8.7	1.8
México	8.1	México	12.3	4.2
Pakistán	7.1	Pakistán	8.7	1.6
Rusia	9.0	Rusia	11.4	2.4
USA	7.6	USA	8.9	1.3
Mundo	4.2	Mundo	5.4	1.2

Fuente: King y col., 1998. % = Por ciento de la población mayor de 20 años que padece la enfermedad. El incremento = diferencia entre el % del año 2025 menos el % del año 2000.

Las consecuencias de esta enfermedad pueden ser bastante severas, incluyendo problemas al corazón y al riñón, mala circulación ocasionando amputación de las extremidades, problemas de visión llegando a presentarse ceguera, una disminuida calidad de vida con una consecuente muerte prematura (Smith, 2007). Las principales causas que conllevan a la mayor prevalencia de la diabetes son una ganancia de peso excesivo, obesidad, así como factores hereditarios.

2.1. Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) se caracteriza por aparecer a temprana edad y se debe a un déficit completo de insulina, dado por la destrucción de las células β pancreáticas por procesos autoinmunes. Cerca del 5% de las

personas que padecen diabetes, corresponde al tipo 1. Anteriormente a este tipo de diabetes se le conocía como diabetes mellitus insulino dependiente o diabetes juvenil. En ella, las células β del páncreas no producen insulina o la llegan a producir de manera escasa (Tisch y McDevitt, 1996).

2.2. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es en la actualidad uno de los principales problemas de salud que enfrenta México y la mayoría de los países occidentales. Representa del 90 al 95% de todos los casos de diabetes. Este desorden afecta un estimado del 6% de la población adulta occidental; su frecuencia en todo el mundo se estima que continué creciendo en un 6% por año, potencialmente llegando a ser más de 300 millones de casos para el 2025, siendo uno de los principales desencadenantes de esta patogénesis, la obesidad (Moller, 2001).

En el 2006, en México existían 6.5 millones de enfermos de diabetes, de los cuales el 22% no saben que la padecen, informa la Secretaría de Salud. Siendo esta enfermedad considerada como la primera causa de muerte en nuestro país.

La DMT2 resulta tanto de la resistencia a la insulina como de la secreción defectuosa de esta hormona. La resistencia a la insulina se presenta como una consecuencia de la obesidad, de un estilo de vida sedentario y del envejecimiento, ocasionando hiperglicemia y diabetes, elevada presión sanguínea y dislipidemia, siendo definido todo lo anterior como síndrome metabólico.

Las personas con obesidad central (androide), en quienes la grasa se acumula alrededor de la cintura, presentan un riesgo mayor de hacerse resistentes a la

insulina. No es una coincidencia que los casos de DMT2 hayan aumentado de forma paralela al incremento mundial del sobrepeso y la obesidad, hasta el punto de que la DMT2 recibe el nombre de diabetes.

2.3. Tratamiento antidiabetes

El manejo y control de la hiperglicemia en pacientes con DMT2 puede atenuar el desarrollo de complicaciones crónicas tales como la retinopatía y nefropatía. En la actualidad, las terapias para el tratamiento de la DMT2 radican en reducir la hiperglicemia por sí misma con medicamentos como la sulfonilureas, las cuales incrementan la liberación de insulina de células pancreáticas; metformina, la cual actúa para reducir la producción de glucosa hepática; tiazolidindionas, las cuales aumentan la acción de la insulina; los inhibidores de α -glucosidasa, que interfirieron con la absorción de glucosa intestinal; e insulina por sí misma, la cual suprime la producción de glucosa y aumenta su utilización (Tabla 4). Sin embargo, esas terapias tienen limitada eficacia, limitada tolerabilidad y efectos secundarios considerables, siendo de particular importancia mencionar que la mayoría de los tratamientos muestran una tendencia hacia la ganancia de peso corporal y a episodios de hipoglucemia (Arulmozhi y Porta, 2006).

Para los pacientes con DMT2 con deficiencia relativa de insulina, una variedad de medicamentos orales ya disponibles en el mercado podrían ayudar a mantener un adecuado control glucémico. A pesar de ello, con la progresión de la diabetes los pacientes frecuentemente exhiben una pérdida primeramente de

50

la secreción de insulina postprandial, por lo cual, en algunos casos, podrán requerir de suplementación con insulina exógena o medicamentos que estimulen en forma rápida la secreción de insulina, además de la preservación de la célula β , manteniendo un ritmo fisiológico de secreción de insulina pre- y post-ingesta, motivo por el cual se presenta una imperiosa necesidad de investigar nuevas terapias para el control glicémico que puedan complementar a las terapias existentes y mantengan una respuesta fisiológica normal a la

Tabla 4. Agentes terapéuticos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Medicamento	Blanco molecular	Sitio (s) de acción	Efectos adversos
Insulina	Receptor de insulina	Hígado, músculo	Hipoglicemia, ganancia de peso
Sulfonilureas	Receptor SU/Canales K ⁺ ATP	Células β pancreáticas	Hipoglicemia, ganancia de peso
Metforminas - Biguanidas	Desconocido	Hígado (músculo)	Disturbios gastrointestinales, acidosis láctica
Acarbosa	α-glucosidasa	Intestino	Disturbios gastrointestinales
Pioglitazona, rosiglitazona (tiazolidindionas)	PPARγ	Músculo, hígado	Ganancia de peso, edema, anemia

Fuente: Arulmozhi y Porta, 2006.

Tabla 5. Efectos antidiabetogénicos del péptido-1 tipo glucagon.

Proceso	Acción
Secreción de insulina	Estimulación
Secreción de glucagon	Supresión
Vaciado gástrico	Retardo
Sensibilidad a la insulina	Incremento
Apetito	Supresión
Masa células β	Incremento
Disponibilidad de glucosa	Aumento

Fuente: Arulmozhi y Porta, 2006

Se ha estimado que más del 50% de la secreción de insulina postprandial es atribuida a las hormonas peptídicas intestinales. Esta respuesta se debe al efecto incretina (Figura 10) y es definida como la acción de hormonas

peptídicas liberadas por el intestino en respuesta a la ingestión de nutrientes por vía oral para estimular la liberación de insulina en concentraciones importantes fisiológicamente (Meier y col., 2002; Nauck y col., 1986). Actualmente el tratamiento para la DMT2 incluye dieta, ejercicio y una variedad de agentes farmacológicos. Sin embargo, el hecho de que GLP-1 induzca la síntesis y la secreción de insulina, aunado a que su actividad es dependiente de glucosa, indica que pueda aportar alguna ventaja sobre el grupo de las sulfonilureas (pueden producir hipoglucemia por no ser dependientes de glucosa, y no aumentan la expresión del gen de insulina). Además, disminuye los niveles de glucagon, retrasa el vaciado gástrico, reduce la ingesta alimentaria y puede aumentar la sensibilidad a la insulina y favorecer la

52

neogénesis de células β de los islotes pancreáticos (Arulmozhi y Portha, 2006; Drucker, 2005; Knauf y col., 2005; Meier y col., 2002).

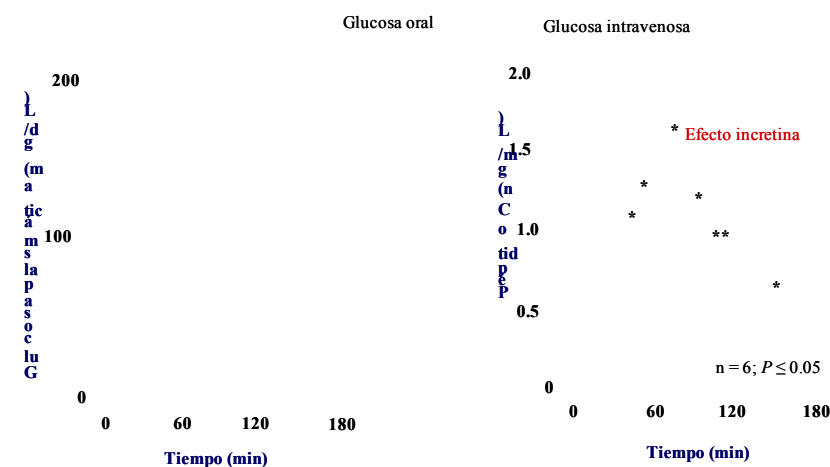


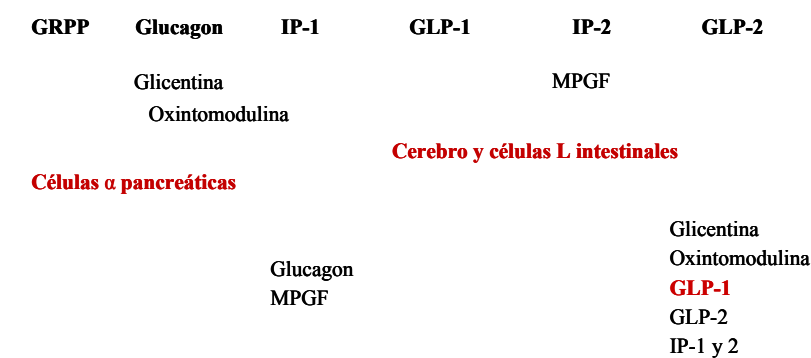
Figura 10. Efecto de la administración de glucosa por vía oral comparada contra intravenosa sobre los niveles plasmáticos de glucosa y péptido C. Fuente: Nauck y col. (1986).

VI. PÉPTIDO-1 TIPO GLUCAGON

El péptido-1 tipo glucagon fue descubierto en 1984 y es un producto del gen

proglucagon, se expresa tanto en las células α pancreáticas, como también en las células L de la mucosa intestinal, uno de los tipos de células más abundantes en el intestino (Majsov y col., 1986; Bell y col., 1983). El GLP-1 se sintetiza del precursor de glucagon, el cual no solamente codifica para GLP-1, si no también para glucagon, principal fragmento de proglucagon, glicentina, oxintomodulina y GLP-2 (Figura 11) (Druker, 2005; Bell y col., 1983).

53



GLP, Péptido tipo glucagon; GRPP, Polipéptido pancreático relacionado a glicentina; IP, Péptido intermedio; MPGF, Principal fragmento de proglucagon.

Figura 11. Proglucagon y péptidos derivados. Fuente: Druker, 2005

A. Secreción del Péptido-1 Tipo Glucagon

Después de la ingestión de alimentos, se secretan 2 formas de GLP-1, GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36) amida, las cuales difieren en un solo aminoácido. Ambos péptidos son equipotentes y exhiben actividades plasmáticas idénticas actuando a través del mismo receptor (Nauck y col., 1993; Orskov y col., 1993); sin embargo, la mayoría de GLP-1 activo (~80%) que se encuentra circulando, es GLP-1 (7-36) amida (Kieffer y Habener, 1999; Orskov y col., 1994). El GLP-1 es secretado en respuesta a la absorción de glucosa, fibra, ácidos grasos y en menor magnitud por aminoácidos (Brubaker y Anini, 2003; Macintosh y col., 2001; Fehmann y col., 1995). Sin embargo, a pesar de la

localización distal de las células L, los niveles circulantes de GLP-1 incrementan rápidamente dentro de los primeros minutos después de la ingestión de alimentos, lo que lleva a sugerir que la secreción de este péptido

54

 Page 55

en el intestino distal es controlada tanto por señales neurales como por endocrinas e iniciada por la entrada de nutrientes en el tracto gastrointestinal proximal, así como también, por el subsiguiente contacto directo de las células L con los nutrientes digeridos (Herrmann y col., 1995). La acción de los nutrientes metabolizados para estimular la secreción de GLP-1, puede estar relacionada a la generación de ATP celular, bloqueo de los canales de potasio sensibles a ATP y a la elevación del Ca^{+2} intracelular (Gribble y Reimann, 2002). Después de que se libera GLP-1, este péptido afecta múltiples tejidos en el organismo, acción que se ha reportado estar mediada por la unión de GLP-1 a su receptor acoplado a proteína G. En cuanto a los receptores para esta incretina se han reportado en varios tejidos, incluyendo el islote pancreático, pulmones, TGI y en el SNC, además de estos tejidos, también se han detectado receptores a nivel del hígado y músculo esquelético (Drucker, 2001; Perfetti y Merkel, 2000; Fehmann y col., 1995).

B. Efectos Fisiológicos del Péptido-1 Tipo Glucagon

Como se mencionó anteriormente, el GLP-1 se produce en las células L intestinales en respuesta a la ingestión de nutrientes, de carbohidratos principalmente. Periféricamente, el GLP-1 afecta la motilidad intestinal e inhibe la secreción de glucagon. En el SNC, GLP-1 induce saciedad, lo que conlleva a una menor ganancia de peso corporal. En el páncreas, induce expansión de la masa de las células β , además de la estimulación de secreción de insulina dependiente de glucosa (Drucker, 2006; 2005; MacDonald y col., 2002).

55

a. Efectos del péptido-1 tipo glucagon sobre la alimentación

Dentro del sistema nervioso central, GLP-1 actúa como un transmisor inhibiendo el comportamiento alimenticio, es decir, generando saciedad (Larsen y col., 1997; Turton y col., 1996).

Turton y col. (1996) evaluaron el efecto de GLP-1 en el control del sistema nervioso central de la saciedad. En ese estudio, se administró GLP-1 o un placebo de forma intracerebro-ventricular a ratas en ayunas, con una medición del consumo de alimentos a intervalos de 2 horas entre administraciones y un período experimental mínimo de 72 horas. A medida que aumentaba la concentración de GLP-1 inyectado, disminuía de manera progresiva el consumo de alimentos. Por otro lado, se demostró una falta de efecto de GLP-1 sobre el consumo de alimentos cuando se utilizó exendina, un antagonista del receptor GLP-1. Con estos resultados concluyeron que GLP-1 tiene efectos centrales significativos en la reducción del consumo de alimentos. Además, reportaron la presencia de GLP-1 y sus receptores en la amígdala y el hipotálamo.

b. Efectos del péptido-1 tipo glucagon en el páncreas

Los efectos de GLP-1 en las células de los islotes pancreáticos incluyen un aumento de la secreción de insulina de las células β , dependiente de la ingesta; un aumento de la secreción de somatostatina de las células δ y una disminución de la secreción de glucagon de las células α . Estas acciones contribuyen a la disminución de la producción de glucosa hepática (Figura 12) (Arulmozhi y Portha, 2006; Drucker, 2006).

c. Efectos del péptido-1 tipo glucagon en las células β

La acción de GLP-1 en las células β es mediada por la unión del péptido a

receptores transmembranales acoplados a proteínas G. La activación de estos receptores causa un incremento en la concentración de cAMP intracelular y la activación de protein kinasa A (PKA). GLP-1 actúa directamente a través de la ruta cAMP/PKA para aumentar y sensibilizar a las células β a la secreción de insulina estimulada por glucosa.

En estudios en animales, se ha demostrado que el tratamiento con GLP-1 aumenta la masa de las células β y mantiene su función. Los efectos de GLP-1 en las células β generalmente pueden ser agudos, subagudos y crónicos (Drucker, 2006; 2003). Entre los efectos agudos, el GLP-1 incrementa la secreción de insulina dependiente de glucosa y los efectos subagudos incluyen la estimulación de la transcripción de proinsulina y la biosíntesis de insulina. Los efectos crónicos son la estimulación de la proliferación y neogénesis de las células β a partir de células ductales precursoras, además del aumento de la expresión de los transportadores GLUT-2 y la glucocinasa, que regula la captación y el metabolismo de la glucosa pancreática (Arulmozhi y Portha, 2006; Drucker, 2006; 2003).

Diversos modelos han mostrado que el tratamiento con GLP-1 estimula la regeneración de células β y la diferenciación de células ductales pancreáticas en células secretoras de insulina (Figura 13) (Hui y col., 2001; Xu y col., 1999). Siendo esto otra ventaja sobre otros inductores de la secreción de insulina, los cuales llegan a ser ineficaces después de varios años de tratamiento (Groop y col., 1989).

Figura 12. Conformación del islote de Langerhans y efectos pancreáticos del péptido-1 tipo glucagon.
Fuente: Arulmozhi y Portha, 2006; Drucker, 2006

Page 59

Los estudios han demostrado que el tratamiento con GLP-1 esta asociado con un incremento en la neogénesis, proliferación e hipertrofia de las células β , además de la reducción de la apoptosis de las células β (Farilla y col., 2002). Utilizando como modelo de estudio ratas obesas Zucker, Farilla y col. (2002) encontraron que una vez concluido el tratamiento con GLP-1, la proliferación de las células β aumentó de forma significativa, mientras que se observó una reducción en la apoptosis. Mencionan que la combinación de estos efectos contribuyó a un aumento en la masa de las células β . Los efectos de GLP-1 en la apoptosis de las células β también se ha demostrado en células aisladas de islotes pancreáticos de humanos (Farilla y col., 2003).

Neogénesis de células β

Proliferación de células β

Célula β

Apoptosis de células β

Hipertrofia de células β

Figura. 13. Efectos del péptido-1 tipo glucagon en las células β .
Fuente: Hui y col., 2001; Xu y col., 1999.

C. Administración del Péptido-1 Tipo Glucagon

Considerando el uso antidiabético de GLP-1, han llegado a ser evidentes una serie de problemas relacionados con la forma de administración y actividad del péptido. Como un péptido, después de su ingestión oral, GLP-1 es inmediatamente desnaturalizado por el ácido gástrico y consecuentemente

Page 60

inactivado. Por lo tanto, GLP-1 debe de ser administrado de manera subcutánea o intravenosa para alcanzar la circulación. Otro problema es la vida media extremadamente corta del péptido, después de ser administrado de forma subcutánea o intravenosa, el péptido es inactivado enzimáticamente por la enzima DPPIV en el extremo amino terminal, produciendo el fragmento GLP-1 (9-36) biológicamente inactivo (Figura 14), por lo tanto, la administración subcutánea de GLP-1 nativo no es el método más apropiado para alcanzar elevadas concentraciones plasmáticas de manera constante del péptido intacto (Nauck y col., 1996; Ritzel y col., 1995).



Figura 14. Proceso de inactivación del péptido-1 tipo glucagon por la enzima dipeptidil peptidasa IV. Fuente: Nauck y col., 1996; Ritzel y col., 1995.

Actualmente, varios modos de administración están siendo considerados para resolver el problema de administración relacionado con la actividad de GLP-1, por lo que un método interesante sería el incrementar la concentración de GLP-1 endógeno.

D. Estimulación del Péptido-1 Tipo Glucagon Endógeno

El manejo dietario que se ha propuesto para el control de diversas enfermedades y el bienestar en general, es el incluir fuentes de fibra fermentables en el colon. En el caso de la diabetes, por ejemplo, el consumo de fibra ha mostrado beneficios terapéuticos como lo son los menores requerimientos de insulina exógena, menores niveles de glucosa y como consecuencia, un mejor manejo de la enfermedad. Reimer y MacBurney (1996), probaron la hipótesis de que el consumo de fibra regula la expresión y secreción de GLP-1. Estos investigadores compararon el efecto de una dieta basal (sin fibra) contra una dieta suplementada con 30% de fibra (mezcla comercial de fibra proveniente de chícharo, avena, caña de azúcar y goma de xantano) sobre los niveles de mRNA de proglucagon, así como también evaluaron el contenido de SCFA a nivel de ciego y de colon. Los niveles de mRNA de proglucagon fueron significativamente mayores en el grupo que consumió la dieta suplementada con fibra. Los niveles de SCFA también fueron significativamente mayores en la dieta con fibra. Otros parámetros adicionales que evaluaron fueron los niveles de GLP-1 plasmáticos, insulina y péptido C. Estos últimos parámetros también fueron significativamente mayores en el grupo con 30% de fibra. Por lo que concluyeron que una dieta suplementada con fibra es capaz de alterar la expresión del gen de proglucagon, así como también de modular la secreción de GLP-1 e insulina. Siguiendo con la estimulación de GLP-1 endógeno, Reimer y col. (1997) compararon los efectos de 2 fibras dietarias con diferentes propiedades fermentativas sobre los niveles de mRNA de proglucagon, así como también los niveles plasmáticos de insulina y péptido C en ratas Sprague-Dawley.

Utilizaron fibra de ruibarbo (altamente fermentable) y celulosa (de baja capacidad fermentativa). Los niveles de mRNA de proglucagon en el ileon fueron significativamente mayores en ratas alimentadas con ruibarbo que con las alimentadas con celulosa. Las concentraciones de péptido C también fueron mayores en el grupo de ruibarbo. En cuanto a los niveles de insulina, no se observaron diferencias significativa entre los dos grupos, sin embargo, se pudo observar un incremento para el grupo de ruibarbo (120 ± 9 pmol/L para celulosa vs. 160 ± 20 pmol/L para ruibarbo). Pudiendo concluir con esto que la fermentabilidad de la fibra dietaria puede estar implicada en modular la expresión intestinal de proglucagon y posiblemente en la homeostasis de glucosa.

E. Péptido-1 Tipo Glucagon y Obesidad

Aproximadamente una década después de la primera descripción de los efectos de GLP-1 sobre la regulación central del comportamiento alimenticio, varios estudios tanto en animales como en humanos han proporcionado evidencias para el efecto de saciedad que confiere este péptido. Numerosos grupos de investigación encontraron una reducción significativa en peso corporal después de la administración de GLP-1. Esos datos sugieren que la hormona puede, además de su efecto antidiabetogénico, tener un potencial para farmacoterapia de la obesidad (Cani y col., 2004; Flint y col., 1998). Flint y col. (1998) examinaron el efecto de GLP-1 intravenoso (50 pmol/Kg/h) sobre la sensación de apetito utilizando como modelo de estudio a humanos. Evaluaron la sensación de apetito después de un desayuno con contenido energético fijo o bien después de una comida *ad libitum*. Este grupo encontró

62

que después del desayuno con contenido energético fijo, la infusión de GLP-1 aumento saciedad comparada con el placebo (infusión salina). En el caso de la ingesta de energía espontánea, en la comida *ad libitum*, esta se redujo en un 12% por efecto de GLP-1. Además evaluaron los niveles de insulina, glucagon y glucosa en sangre y observaron que estos parámetros se vieron afectados de

forma significativa por el tratamiento, concluyendo con esto que GLP-1 aumenta saciedad y reduce la ingesta de alimento, jugando así un papel importante sobre la regulación fisiológica del apetito e ingesta de energía en humanos.

Cani y col. (2004) analizaron la modulación de GLP-1 (7-36) amida utilizando como modelo de estudio ratas Wistar macho. Las ratas se alimentaron con 3 tipos de fructanos, los cuales diferían en su DP y por lo tanto, en su sitio y magnitud de fermentación. Los resultados los compararon contra una dieta estándar. Después de 3 semanas de tratamiento, la ingesta dietaria fue menor en los grupos alimentados con fructanos. En el caso de los fructanos de menor DP generaron menor masa de tejido epididimal, siendo esto un indicativo de menor tendencia a la obesidad. La concentración de GLP-1 (7-36) amida en vena porta, fue mayor en los grupos de fructanos de menor DP. Tanto la concentración de GLP-1 (7-36) amida y de mRNA de proglucagon fueron significativamente mayores en el colon proximal de las ratas alimentadas con fructanos. Con esto, Cani y col. concluyeron que sus resultados concuerdan con el efecto reportado como consecuencia de modificaciones en la ingesta dietaria y desarrollo de tejido adiposo en ratas alimentadas con fructanos de bajo DP y demostraron el potencial de los fructanos en la modulación de GLP-1

63

Page 64

(7-36) amida por la ingesta de fibras fermentables tal como los fructanos, los cuales son rápida y completamente fermentados en la parte proximal del colon.

F. Péptido-1 Tipo Glucagon y Diabetes

Debido a los efectos insulíntróficos y a los efectos en la disminución de los niveles de glucosa en sangre, actualmente GLP-1 esta siendo considerado como un agente terapéutico potencial en el tratamiento de la hiperglicemia que se presenta en los pacientes con DMT2.

En cuanto al efecto de GLP-1 sobre la diabetes, Cani y col. (2005) evaluaron el efecto de los fructooligosacáridos sobre la tolerancia a la glucosa y la

producción de insulina, así como la producción de GLP-1 (7-36) amida en ratas Wistar diabéticas tratadas con estreptozotocina. Cani y col. (2005) reportaron que los fructooligosacáridos mejoraron la tolerancia a glucosa y redujeron la ingesta de alimento. Después de 6 semanas, la concentración de insulina pancreática y portal fueron el doble en las ratas alimentadas con fructooligosacáridos. Para GLP-1 (7-36) amida, el tratamiento con fructooligosacáridos incrementó su concentración a nivel portal y colónico y se duplicó el nivel de mRNA de proglucagon. Cani y col. (2005) propusieron que los fructooligosacáridos, a través de su fermentación en el colon, promueven la expresión y secreción de GLP-1 (7-36) amida con consecuencias benéficas en glicemia y secreción de insulina. Además, como resultado de los experimentos, Cani y col. (2005) observaron que el tratamiento con fructooligosacáridos tuvo el mismo efecto en ratas diabéticas que en ratas normales. Siguiendo con los efectos de GLP-1 sobre el metabolismo, Knauf y col. (2005) evaluaron el papel central de GLP-1 sobre la homeostasis de la glucosa. Este

64

Page 65

grupo de investigadores encontró que durante hiperglicemia, GLP-1 aumentó la secreción de insulina y favoreció la redistribución de glucosa del músculo hacia el hígado, donde se almacenó como glucógeno, lo que concuerda con la disposición postprandial de los carbohidratos ingeridos, preparando al organismo eficientemente para el siguiente estado de ayuno.

Con base en todo lo anteriormente expuesto, y dada la importancia del género *Agave* para México, surge la siguiente hipótesis.

VII. HIPÓTESIS

Los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyllirion* sp. tienen el potencial para ser fermentados por bacterias probióticas tales como *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* teniendo efectos sistémicos positivos en la salud, específicamente en obesidad y diabetes.

VIII. OBJETIVO GENERAL

Extraer, comparar y evaluar el efecto prebiótico *in vitro* de los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. y su papel *in vivo* sobre los niveles de glucosa, lípidos y GLP-1.

65

Page 66

IX. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener los fructanos de plantas de agave y dasyilirion.
- 2) Evaluar el efecto prebiótico de los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. utilizando *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* como probióticos.
- 3) Analizar los ácidos grasos de cadena corta producidos durante la fermentación bacteriana *in vitro* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- 4) Evaluar el efecto del consumo de fructanos de *Agave tequilana* var. azul de Guanajuato y *Dasyilirion* sp. de Chihuahua en ratones C57Bl/6J sobre los siguientes parámetros: Ingesta de alimento, peso de heces, hígado y tejido epididimal, ingesta de energía y ganancia de peso corporal.
- 5) Determinar el efecto de la dieta sobre los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en sangre de ratones C57Bl/6J.
- 6) Determinar el efecto de una dieta estándar o suplementada con fructanos de *A. tequilana* var. azul de Guanajuato y *Dasyilirion* sp. de Chihuahua sobre los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en hígado de ratones C57Bl/6J.
- 7) Realizar análisis histológicos.
- 8) Medir el efecto de la dieta sobre el peso del ciego y la concentración de

X. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de los diferentes experimentos se utilizó tanto el material vegetal como inulinas comerciales que se muestran en la Figura 15.

Material vegetal

A. tequilana Jal. (ATJ)
A. tequilana Gto. (ATG)
A. angustifolia Oax. (AAO)
A. angustifolia Son. (AAS)
A. potatorum Oax. (APO)
A. cantala Oax. (ACO)
A. fourcroydes Yuc. (AFY)
Dasyllirion sp. Chih. (DSC)

Inulinas comerciales

Achicoria Sigma (CIS)
Dalia Sigma (DVS)
Raftiline@GR (RNE)
Raftilosa@Synergy1 (RSE)
Raftilosa P₉₅ (RAF)

Figura 15. Material vegetal e inulinas comerciales utilizadas.

A. Extracción de los Fructanos de *Agave* spp. y *Dasyllirion* sp.

Los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyllirion* sp. se extrajeron de acuerdo al método reportado por López y col. (2003). Brevemente, 100 g de piña de

agaves y dasyilirion se extrajeron con solución etanol-agua al 80% y agitación continua por 1 h. Las muestras se filtraron y el material vegetal (que corresponde al pellet) se re-extrajo con H₂O por 30 min. Los sobrenadantes se mezclaron con cloroformo para eliminar así la fracción lipídica. La fase acuosa se concentró por evaporación rotatoria bajo presión reducida. Posteriormente las muestras se liofilizaron y se almacenaron en un desecador, hasta que fueran requeridas para los siguientes análisis.

B. Cromatografía de Capa Fina (TLC)

La detección y caracterización preliminar de los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. se realizó por TLC. Se aplicó 1 µL de la muestra (20 mg/mL) en placas de silica gel (10 X 10 cm). Las placas se corrieron en una cámara de TLC, usando como fase móvil propanol:agua:butanol (12:4:3). El agente revelador empleado fue difenilamina-anilina-ácido fosfórico.

C. Metodología *in vitro*

Como esquema general de trabajo para los experimentos *in vitro* se siguió el procedimiento descrito en la Figura 16.

a. Crecimiento bacteriano

Se utilizaron cepas probióticas de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* siguiendo el método reportado por Gibson y Wang (1994) con algunas modificaciones. Se

68

usó el medio de Mann Rogosa y Sharpe (MRS); en el caso de *Bifidobacteria* el medio de cultivo se suplementó con L-cisteína. Se aplicó un inóculo bacteriano de 1% en 10 mL de medio de cultivo. Las bacterias se cultivaron bajo condiciones anaeróbicas utilizando una cámara de CO₂ por 20 h a 37°C. Las 20 h de crecimiento corresponde a la parte final de la fase exponencial de la curva de crecimiento (ver apéndice). Para evaluar el efecto de los diferentes fructanos en el crecimiento bacteriano, el medio se preparó sin glucosa. Se adicionaron los fructanos como única fuente de carbono a una concentración

de 10 g/L. El crecimiento bacteriano se midió por densidad óptica a 630 nm.

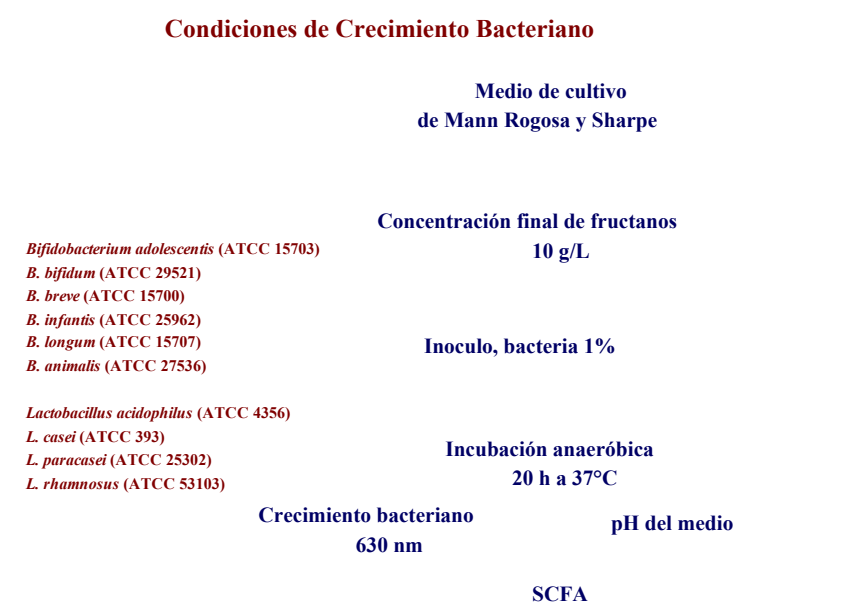


Figura 16. Esquema general de trabajo de los experimentos *in vitro*.

69

b. Fermentación de carbohidratos

Como un indicador de la producción de los ácidos grados de cadena corta (SCFA) por las bacterias probióticas, se evaluó el cambio de pH del medio de cultivo, tanto al inicio del experimento como después del período de incubación bacteriano, bajo las condiciones descritas previamente, para lo cual se utilizó un medidor de pH digital Hanna Instrument.

c. Determinación de los ácidos grasos de cadena corta por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Después del período de incubación, se tomó 1 mL del medio de cultivo para el análisis de los SCFA de acuerdo al método de Al-Tamimi y col. (2006). En breve, la muestra se centrifugó 5 min en una microcentrífuga Eppendorf para remover las células bacterianas y cualquier material no solubilizado que

pudiera interferir con el análisis de HPLC. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) y como eluyente se usó el H₂SO₄ 5mM a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min y la temperatura de operación de 50°C. Los ácidos fueron detectados por UV a una longitud de onda de 220 nm y calibrado contra el estándar correspondiente a una concentración de 10 a 100 mM. El volumen de inyección fue de 20 µL.

D. Metodología *in vivo*

En cuanto al esquema general de trabajo para los experimentos *in vivo*, se siguió el procedimiento descrito en la Figura 17.

70

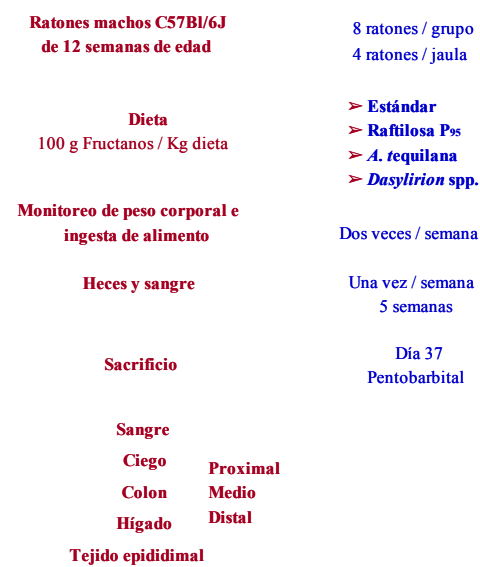


Figura 17. Esquema general de trabajo de los experimentos *in vivo*.

a. Materiales

Raftilosa P95 (Orafti, Belgium) (RAF) es una mezcla de fructanos con un DP promedio de 4.8. Los fructanos de *A. tequilana* var. azul de Gto. (ATG) fueron analizados por MALDI-TOF-MS (ver apéndice) y presentaron un intervalo de

DP de 3 hasta 22 con mayor abundancia entre 7 y 9, mientras que en el caso de los fructanos de *Dasyilirion* sp. de Chihuahua (DSC) mostraron un intervalo de DP de 3 a 20.

71

Page 72

b. Animales y dietas

Se utilizaron 32 ratones machos C57Bl/6J (Charles River, Francia) de 12 semanas de edad, los cuales se mantuvieron bajo condiciones de humedad y temperatura controladas y un ciclo de luz:oscuridad de 12 h. Los ratones se dividieron en 4 grupos, 8 ratones por grupo, 4 ratones por jaula, de acuerdo a la dieta (suplementada o no con fructanos). Antes de iniciar el experimento, los ratones se sometieron a un período de aclimatación de 6 días, después de dicho período, los ratones control (dieta STD) se alimentaron con la dieta estándar A04 (UAR, Villemoisson-sur-Orge, Francia), mientras que los ratones alimentados con las dietas suplementadas con fructanos, RAF, ATG y DSC recibieron una dieta preparada mezclando 90 g de la dieta estándar A04 con 10 g de los fructanos correspondientes (Rafilosa P₉₅, *A. tequilana* var. azul de Gto. y *Dasyilirion* sp. de Chih., respectivamente). La dieta estándar A04 contenía lo siguiente: (g/100 g peso seco) proteína 19.3 (mezcla equivalente de proteínas de soya y de pescado); carbohidratos provenientes de maíz, trigo, cebada y salvado 70.4; lípidos 3.0; mezcla mineral 6.0 y mezcla de vitaminas 1.3.

c. Ingesta de alimento, peso corporal y heces

La ingesta de alimento y el peso corporal se monitorearon tres veces por semana y la colecta de heces se realizó una vez por semana evaluando la producción de heces en 24 h. El promedio de la ingesta energética diaria (kJ/d) se calculó como sigue: ingesta de alimento (g) X valor energético de la dieta

(kJ/g). El valor energético de la dieta estándar fue de 13.86 kJ/g, mientras que para las dietas suplementadas con fructanos fue de 13.08 kJ/g.

72

Page 73

d. Muestra de sangre

Las muestras de sangre se colectaron una vez por semana, haciendo una pequeña incisión en la cola de los ratones. A partir de estas muestras se evaluaron los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados, utilizando kits acoplados a reacciones enzimáticas y detección espectrofotométrica de los productos finales de las reacciones (Elitech, Brussels, Belgium).

Al final del período experimental, en el día 37, los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de una solución de pentobarbital de sodio (60 mg/Kg de peso corporal; Nembutal®, Sanofi Santé Animale, Brussels Belgium). Se colectaron muestras de sangre de vena porta en tubos con EDTA (Sarstedt, Numbrecht, Germany), con o sin inhibidor de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (Linco Research, St Charles, MO, USA).

Las muestras de sangre se centrifugaron y el suero se almacenó a -80°C. La concentración de GLP-1 (7-36) amida se midió usando un kit ELISA específico para este péptido sin reactividad hacia GLP-1 (9-36) amida, GLP-2 o glucagon (GLP-1 active ELISA kit; Linco Research).

e. Muestra de tejidos

Los segmentos del ciego y colon (proximal, medio y distal) se extirparon inmediatamente, lavando con solución fisiológica (9 g NaCl/L), y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido almacenándolos a -80°C hasta que se requirieron para el análisis de mRNA y péptidos.

El hígado, tejido epididimal y ciego se pesaron, posteriormente el hígado se seccionó, una parte se congeló inmediatamente en N₂ y luego se almacenó a

73

-80°C para análisis de lípidos (niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados), y la otra sección del hígado se congeló en isopentano y se almacenó a -80°C para los análisis histológicos con tinción de hematoxilina/eosina.

f. Análisis de hígado

Las muestras de hígado se homogenizaron con buffer de fosfatos y la determinación de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados se realizó como previamente se describió para las muestras de sangre después de una extracción con cloroformo-metanol de acuerdo al método de Folch y col. (1957). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Bradford, 1976).

g. Extracción del péptido-1 tipo glucagon (7-36) amida intestinal

La extracción de GLP-1 (7-36) amida de segmentos intestinales se realizó con una solución de etanol: agua: ácido clorhídrico 12 N (74:2:1). Las muestras se homogenizaron y se llevaron a 4°C por 24 h. El homogenado se centrifugó y se colectó el sobrenadante para posteriormente diluirlo 100 y 250 veces en solución salina para ciego y colon, respectivamente. La concentración intestinal de GLP-1 amida (7-36) se midió como previamente se describió para las muestras de sangre.

h. Aislamiento del ácido ribonucleico

El RNA total fue aislado de cada segmento intestinal de acuerdo a Chomczynski y Sacchi (1987) usando el reactivo de aislamiento TriPure. Se

utilizaron aproximadamente de 50-100 mg de tejido intestinal para extraer el RNA total. La cantidad y pureza del RNA se determinó por espectroscopía

ultravioleta (UV) a 260 y 280 nm.

i. Reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa (RT-PCR)

Para realizar la RT-PCR se utilizó 1 µg de RNA y el kit para RT-PCR. Los iniciadores de interés para la amplificación del cDNA fueron las secuencias sentido y antisentido del gene proglucagon y β-actina. Se desarrollaron 23 ciclos (ver apéndice) para la detección de los transcritos de proglucagon y β-actina. Para verificar una posible contaminación se utilizaron tubos control sin RNA.

Los productos de RT-PCR se aplicaron en gel de agarosa al 1.8% y se visualizaron utilizando bromuro de etidio y luz UV. La cuantificación de los productos de PCR se desarrolló usando un método fluorimétrico.

75

XI. RESULTADOS Y DISCUSION

A. Análisis de Fructanos por Medio de Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Una vez que los fructanos se extrajeron y que se preparó una solución de 20 mg/mL de cada uno de ellos, se analizaron por TLC para visualizar sus diferencias en el perfil de DP (Figura 18). Los fructanos de *Dasyllirion* sp. (DSC) mostraron una mayor proporción de fructanos con bajo DP comparados con los fructanos de las otras especies, seguido por *A. tequilana* var. azul de

Guanajuato (ATG), esto únicamente basado en la intensidad de la mancha en el origen de la aplicación de la muestra, la cual fue débil para estas muestras, pudiendo asumirse que DSC muestra un perfil de fructanos con DP menor a 20. Para el caso de los fructanos comerciales, Rafilosa®Synergy1 (RSE) mostró una gran cantidad de fructanos de bajo DP comparado a Raftiline®GR (RNE). No se observaron diferencias marcadas entre los fructanos de *A. fourcroydes* de Yucatán (AFY) y *A. angustifolia* de Sonora (AAS). Un importante punto que cabe remarcar, es que en todos los casos de los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp., se pudo observar la presencia de una mancha entre DP2 y DP3, la cual corresponde a los fructanos de tipo neo reportado por Mancilla-Margalli y López (2006).

B. Efecto de lo fructanos sobre el crecimiento de bacterias probióticas

Después de observar el perfil de DP de los diferentes fructanos de *Agave* spp., se analizó su efecto prebiótico *in vitro* utilizando bacterias probióticas, tanto del género *Bifidobacterium* como de *Lactobacillus*, en donde se pudieron observar diferentes efectos en la estimulación del crecimiento de ambos géneros bacterianos (Figuras 19 y 20).

76

Xil
Glu
Fru
Sac

DP3
DP4
DP5

Std DSC ATG RSE AFY AAS RNE Std

Figura 18. Cromatografía de capa fina de los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyliirion* sp. (*DSC*), *Agave tequilana* var. azul. de Gto (*ATG*), Raftilosa®Synergy1 (*RSE*), *A. fourcroydes* Yuc (*AFY*), *A. angustifolia* Son (*AAS*) y Raftiline®GR (*RNE*). STD, estándar. Xil, xilosa; Glu, glucosa; Fru, Fructosa, Sac, sacarosa; DP3, 1-cestosa; DP4, nistosa; DP5, fructosil-nistosa.

En general, el medio suplementado con fructanos DSC mostró el mejor crecimiento de *Bifidobacteria* (Figura 19), independientemente de la especie, solamente en el caso de *B. breve* (Figura 19d), DSC no mostró diferencia significativa respecto a RSE. La segunda mejor fuente de prebióticos fue ATG, seguido por ACO en *B. adolescentis* (Figura 19a), por RSE en *B. animalis* (Figura 19b), *B. breve* (Figura 19d) y *B. longum* (Figura 19f), en el caso de *B. bifidum* (Figura 19c). ATG no mostró diferencia significativa respecto a RSE, AAS, APO, ACO y AFY y finalmente, para *B. infantis* (Figura 19e) fue similar a ACO.

77

Page 78

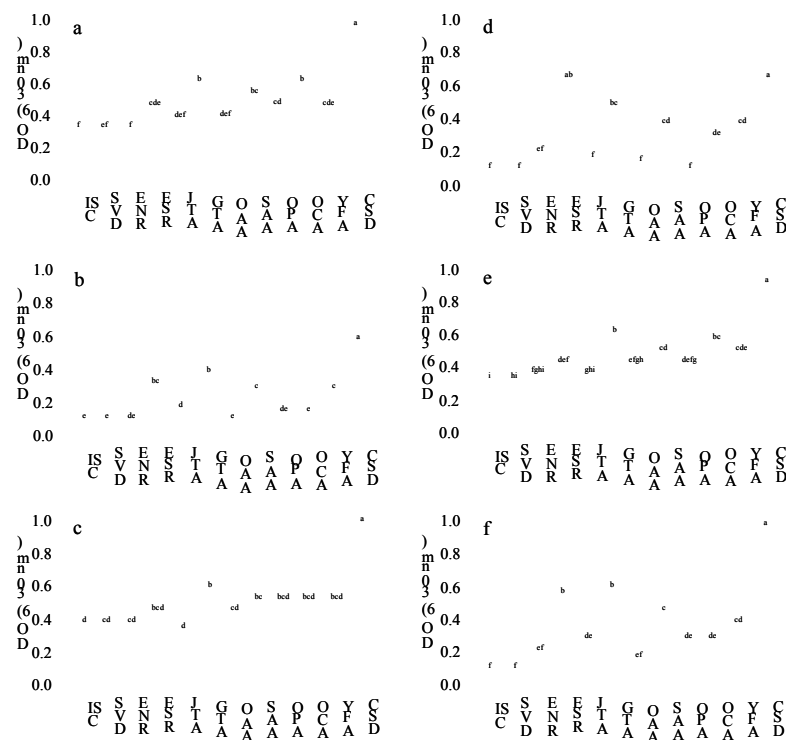


Figura 19. Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis* (a), *B. animalis* (b), *B. bifidum* (c), *B. breve* (d), *B. infantis* (e) y *B. longum* (f) incubados anaerobicamente por 20 h a 37°C en la presencia de 10 g de fructanos/L. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes \pm EEM. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$. OD, Densidad óptica;

CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyliirion* sp. Chih.

78

Page 79

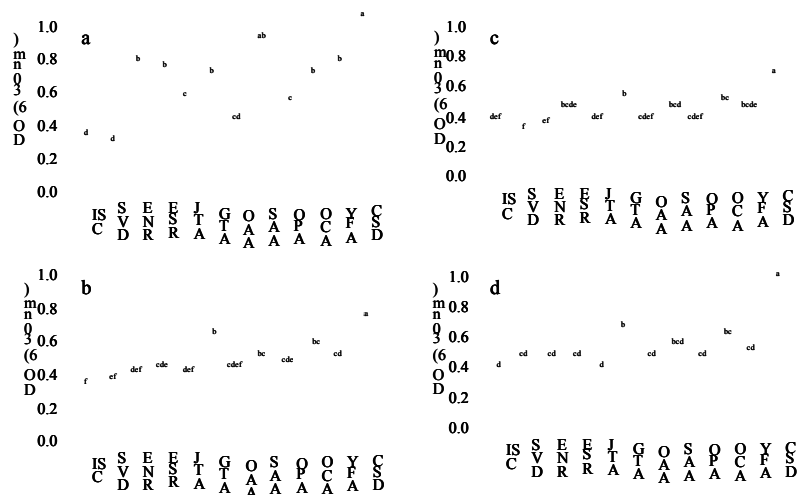


Figura 20. Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* (a), *L. casei* (b), *L. paracasei* (c) y *L. rhamnosus* (d) incubados anaerobicamente por 20 h a 37°C en la presencia de 10 g de fructanos/L. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes \pm EEM. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$. OD, Densidad óptica; CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyliirion* sp. Chih.

Para Lactobacilli (Figura 20), los fructanos de DSC fueron de nuevo mejores prebióticos, con una mayor estimulación del crecimiento de todas las especies de este género comparado con el resto de los fructanos, con la excepción de *L. acidophilus* (Figura 20a), DSC no fue significativamente diferente a AAS; además fue seguido por ATG y este no mostró alguna diferencia comparado a ACO y a AAS en *L. casei* (Figura 20b) y *L. rhamnosus* (Figura 20d). Con *L. acidophilus* (Figura 20a), ATG, AAS y ACO fueron similares a RNE, RSE y a AFY. Esos resultados concuerdan con lo reportado por McKellar y Modler (1989), donde ellos mencionan que las inulinasas de *Bifidobacterium* spp. fueron más activas contra fructanos de la serie *neo* y menos activas contra inulinas. Si la naturaleza de los carbohidratos determina la fermentabilidad de los mismos es una pregunta que rara vez se ha manejado (Cummings y Macfarlane, 2002).

En relación a este punto, van Laere y col. (1997) evaluaron el rompimiento de diferentes fructooligosacáridos, con respecto a su composición y tamaño molecular, por varias especies bacterianas incluyendo géneros de Bifidobacteria y Lactobacilli. Los autores observaron que los fructooligosacáridos fueron extensivamente fermentados por la mayoría de las bacterias, excepto por *Clostridium* spp. Por otra parte, los carbohidratos de bajo DP fueron utilizados mejor o quizás de una forma más rápida por Bifidobacteria.

Por lo tanto, la estructura de los carbohidratos y la especie bacteriana presente en el ecosistema son definitivamente factores determinantes en el control de la fermentación de prebióticos. En este trabajo, DSC con valores de DP de 3 a 20 y ATG de 3 a 22 (ver apéndice para MALDI-TOF-MS), estimularon mejor el

crecimiento de ambos géneros bacterianos. Un comportamiento similar fue observado con RSE y RNE, siendo RSE una mezcla de mayores cantidades de bajo DP comparado con RNE, tal como reportaron Al-Tamimi y col. (2006), donde el crecimiento de Bifidobacteria fue estimulado en diferente magnitud dependiendo del peso molecular de los arabinanos y arabinooligosacáridos, por ejemplo, se observó un máximo incremento en Bifidobacteria después de 48 h con las fracciones de menor peso molecular. Palframan y col. (2003) mencionaron que Bifidobacteria difirió en los perfiles de fermentación cuando se probaron en diferentes carbohidratos. Similarmente, en otros trabajos, van Der Meulen y col. (2004) evaluaron el crecimiento de *B. animalis* en diferentes fuentes de energía a través de fermentaciones a pequeña y gran escala. En general, la fermentación de los fructanos tipo inulina resultó en cambios en el crecimiento y producción metabólica, debido a la preferencia sobre ciertos fructanos, especialmente sobre los fructooligosacáridos.

En el presente trabajo, los fructanos con el DP más grande fueron las inulinas comerciales de *Cichorium intybus* (CIS) y los de *Dalia variabilis* (DVS), ambas inulinas mostraron el menor efecto en la estimulación en el crecimiento bacteriano para todas las especies evaluadas (Figuras 19 y 20).

De acuerdo a los resultados reportados por Mancilla-Margalli y López (2006), donde los fructanos de *Agave* spp. fueron clasificados en 3 grupos dependiendo de los puntos de ramificación y la presencia de moléculas α -D-glucopiranosas terminales e internas, en donde DSC pertenece al grupo II y ATG es clasificado en el grupo III. Con lo anterior, se puede decir que el mejor efecto prebiótico se encuentra en los fructanos de *Agave* spp. que pertenecen al grupo II y al III, esos grupos tienen la característica de ser fructanos con

estructuras menos ramificadas y menor DP, mientras que los fructanos del

grupo I poseen estructuras altamente ramificadas y con mayor DP.

Por otro lado, los fructanos de la misma especie de *Agave*, pero de plantas que crecieron en diferentes zonas geográficas, mostraron mayores diferencias cuando se evaluaron con la misma especie bacteriana (Figuras 19 y 20). Los fructanos de *A. tequilana* var. azul del estado de Jalisco (ATJ) muestran ser un sustrato pobre para todas las especies bacterianas cuando se comparó con la misma especie de *Agave* pero que creció en el estado de Guanajuato (ATG). El mismo comportamiento se observó para *A. angustifolia* de Sonora (AAS, grupo II) y de Oaxaca (AAO, grupo I), siendo AAS un mejor sustrato para todas las especies bacterianas (Figuras 19 y 20). Estos resultados pueden ser explicados en base a la diversidad estructural que presentan los fructanos dentro de las especies de *Agave* como lo mencionan Mancilla-Margalli y López (2006), donde reportan que la concentración y DP de los fructanos puede estar relacionado con factores ambientales, y que la estructura de estos carbohidratos podría estar relacionada a la especie.

Otro parámetro importante durante la fermentación de fructanos es el descenso del pH en el medio de crecimiento como una consecuencia de la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). En este trabajo, el mayor descenso de pH se observó en el medio de cultivo que tenía como sustrato a los fructanos de *Dasyilirion* sp. (DSC) con una relación directa entre el crecimiento bacteriano y el descenso de pH el cual se puede apreciar en las Tabla 6 y 7. De estos resultados se puede mencionar que a mayor crecimiento, mayor descenso de pH, lo cual se ha reportado tiene efectos benéficos inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas (Gibson y Wang, 1994).

82

Las concentraciones de los SCFA de 4 diferentes fructanos se enlistan en la Tabla 8, siendo acético, láctico y fórmico los ácidos detectados. Las concentraciones de los ácidos variaron dependiendo del sustrato usado por las diferentes bacterias tal como lo reportan Shene y col. (2005), observándose mayor concentración de los ácidos con los fructanos DSC, seguido por ATG. Con estos resultados se puede mencionar que en general, un mayor

crecimiento de las bacterias generó un mayor descenso de pH y consecuentemente una mayor concentración de los ácidos láctico, fórmico y acético; sin embargo, dentro de una misma especie bacteriana se pudo observar que si se presentaba una concentración alta de ácido láctico se observaba también una correspondiente baja concentración de ácido fórmico y viceversa, una baja concentración de ácido láctico corresponde a una alta concentración de ácido fórmico. En este contexto, Palframan y col. (2003) mencionaron que cuando *Bifidobacteria* se probó con diferentes fuentes de carbohidrato se observó una alta producción de lactato con una baja producción de formato y bajos niveles de lactato fueron generalmente obtenidos con una alta concentración de formato.

De los 4 fructanos utilizados en la determinación de los SCFA, RNE fue el que exhibió menor estimulación del crecimiento y menor descenso de pH, esto se puede relacionar con las menores concentraciones de dichos ácidos detectados en el medio de cultivo.

La producción de los ácidos acético y láctico son de gran interés en la inhibición de patógenos intestinales como lo son *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Siendo conocido que la propiedad inhibitoria del crecimiento de patógenos conferido por *Bifidobacteria* depende de la producción de ácidos orgánicos (van

83

Der Meulen y col., 2004; Fooks y Gibson, 2002; Ibrahim y Bezkorovainy, 1993).

En este contexto, ha sido reportado que *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* no producen ácido butírico, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Los reportes indican que el ácido butírico juega un papel particularmente importante como fuente de energía preferida por el epitelio colónico y proporciona protección contra cáncer de colon y colitis (Pool-Zobel, 2005; Archer y col., 1998; Christl y col., 1996; Csordas, 1996), sin embargo, los ácidos acético y láctico generados por esas bacterias han sido reportados como precursores butirogénicos, es decir, los ácidos acético y láctico contribuyen desde un 50 a 90% a la formación de butirato y las bacterias reportadas que utilizan estos sustratos son *Faecalibacterium prausnitzii*,

Eubacterium rectale y *Roseburia intestinalis* (Duncan y col., 2004a;b;2002).

Para concluir, se ha mostrado que los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp.

fueron capaces de estimular el crecimiento de bacterias probióticas en medio

MRS mejor que otros fructanos; pudiendo esto ser debido al tipo de enlace,

grado de polimerización y a las estructuras ramificadas que presentan los

fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. Bifidobacteria y Lactobacilli crecieron

mejor con los fructanos de menores DP. La técnica de HPLC fue útil en la

determinación de los SCFA's generados por la fermentación de los fructanos,

siendo detectados los ácidos acético, láctico y fórmico.

84

Page 85

Tabla 6. Descenso de pH debido a la fermentación de fructanos por *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*.

Fructano	Descenso de pH					
	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>
CIS	0.25 ± 0.07 _d	0.16 ± 0.04 _e	0.19 ± 0.06 _c	0.18 ± 0.05 _d	0.31 ± 0.04 _e	0.49 ± 0.13
DVS	0.26 ± 0.03 _d	0.19 ± 0.01 _e	0.14 ± 0.10 _c	0.15 ± 0.07 _d	0.30 ± 0.04 _e	0.43 ± 0.09
RNE	0.31 ± 0.05 _d	0.53 ± 0.01 _d	0.17 ± 0.07 _c	0.40 ± 0.10 _{cd}	0.36 ± 0.04 _e	0.82 ± 0.05
RSE	0.45 ± 0.08 _{cd}	1.54 ± 0.04 _{ab}	0.43 ± 0.07 _{bc}	1.54 ± 0.05 _a	0.43 ± 0.09 _{de}	1.83 ± 0.02
ATJ	0.22 ± 0.06 _d	0.39 ± 0.01 _{de}	0.21 ± 0.06 _c	0.24 ± 0.06 _d	0.27 ± 0.07 _e	0.64 ± 0.14
ATG	0.76 ± 0.07 _{bc}	1.27 ± 0.04 _{bc}	0.74 ± 0.07 _b	0.83 ± 0.08 _b	0.85 ± 0.09 _b	1.29 ± 0.09
AAO	0.44 ± 0.05 _{cd}	0.32 ± 0.02 _{de}	0.33 ± 0.12 _{bc}	0.17 ± 0.06 _d	0.46 ± 0.07 _{cde}	0.60 ± 0.02
AAS	0.82 ± 0.07 _b	1.07 ± 0.07 _c	0.70 ± 0.15 _b	0.76 ± 0.04 _b	0.88 ± 0.04 _b	1.41 ± 0.08
APO	0.48 ± 0.03 _{bcd}	0.30 ± 0.05 _{de}	0.39 ± 0.11 _{bc}	0.11 ± 0.03 _d	0.44 ± 0.04 _{cde}	0.65 ± 0.10
ACO	0.80 ± 0.14 _b	1.08 ± 0.11 _c	0.49 ± 0.04 _{bc}	0.67 ± 0.10 _{bc}	0.74 ± 0.07 _{bc}	1.21 ± 0.07
AFY	0.67 ± 0.05 _{bc}	1.30 ± 0.06 _{bc}	0.55 ± 0.12 _{bc}	0.92 ± 0.05 _b	0.73 ± 0.07 _{bcd}	1.33 ± 0.11
DSC	1.76 ± 0.04 _a	1.71 ± 0.09 _a	1.83 ± 0.10 _a	1.56 ± 0.02 _a	1.79 ± 0.02 _a	2.17 ± 0.05

El descenso de pH inducida por la fermentación de fructanos se expresa, como el pH del medio de cultivo (Valor promedio ± EEM) al final de la fermentación (20 h) en presencia de los fructanos menos el pH al inicio de la fermentación (Adaptado de Roberfroid y col., 1998). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$. El descenso de pH se midió directamente en el tubo de crecimiento. CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih.

Tabla 7. Descenso de pH debido a la fermentación de fructanos por *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*.

Fructano	Descenso de pH			
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CIS	0.65 ± 0.04 _f	0.33 ± 0.05 _e	0.35 ± 0.05 _d	0.39 ± 0.04 _e
DVS	0.52 ± 0.01 _f	0.30 ± 0.04 _e	0.31 ± 0.04 _d	0.29 ± 0.02 _e
RNE	2.10 ± 0.12 _b	0.45 ± 0.01 _{de}	0.48 ± 0.02 _{cd}	0.40 ± 0.02 _e
RSE	2.40 ± 0.03 _a	0.61 ± 0.01 _{cd}	0.52 ± 0.08 _{bcd}	0.65 ± 0.04 _{bcd}
ATJ	1.27 ± 0.02 _{de}	0.34 ± 0.02 _e	0.32 ± 0.03 _d	0.31 ± 0.04 _e
ATG	1.77 ± 0.03 _c	0.76 ± 0.03 _{bc}	0.81 ± 0.04 _b	0.68 ± 0.07 _{bc}
AAO	1.10 ± 0.03 _e	0.46 ± 0.01 _{de}	0.48 ± 0.05 _{bcd}	0.47 ± 0.04 _{cde}
AAS	2.30 ± 0.03 _{ab}	0.91 ± 0.04 _b	0.73 ± 0.05 _{bc}	0.78 ± 0.05 _b
APO	1.46 ± 0.05 _d	0.47 ± 0.03 _{de}	0.46 ± 0.05 _{cd}	0.45 ± 0.01 _{de}
ACO	2.08 ± 0.04 _b	0.77 ± 0.04 _{bc}	0.78 ± 0.09 _{bc}	0.78 ± 0.07 _b
AFY	2.11 ± 0.11 _b	0.82 ± 0.03 _b	0.76 ± 0.12 _{bc}	0.77 ± 0.03 _b
DSC	2.27 ± 0.04 _{ab}	1.81 ± 0.06 _a	1.92 ± 0.09 _a	1.82 ± 0.04 _a

El descenso de pH inducida por la fermentación de fructanos se expresa, como el pH del medio de cultivo (Valor promedio ± EEM) al final de la fermentación (20 h) en presencia de los fructanos menos el pH al inicio de la fermentación (Adaptado de Roberfroid y col., 1998). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$. El descenso de pH se midió directamente en el tubo de crecimiento. CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyliirion* sp. Chih.

Tabla 8. Concentración (mM) de los ácidos grasos de cadena corta generados a través de la fermentación de 4 diferentes fructanos.

FRUCTANO	ÁCIDO	BA	BAN	BBF	BI	BBR	BLON	LA	LCC	LPC
DSC	Láctico	38.66	8.63	43.23	45.17	5.24	6.99	63.78	33.41	54.70
	Fórmico	13.18	18.28	14.14	12.78	17.75	14.09	40.95	13.11	6.56
	Acético	10.16	17.50	12.72	11.68	23.42	19.93	14.93	12.30	12.50
RSE	Láctico	4.39	3.66	7.07	7.17	4.11	0.00	62.25	21.03	9.41
	Fórmico	3.62	7.99	2.73	4.35	13.57	5.56	14.98	10.12	0.00
	Acético	7.07	6.06	10.09	9.35	17.55	7.95	10.01	10.73	9.87

ATG	Láctico	10.64	0.00	6.64	11.15	0.00	0.00	45.33	6.75	21.32
	Fórmico	17.38	10.47	7.97	14.67	9.79	10.57	76.78	7.16	2.76
	Acético	9.79	7.72	8.02	8.58	12.15	10.26	18.43	9.04	14.24
RNE	Láctico	1.59	0.00	0.31	4.87	0.89	0.00	51.26	0.00	0.00
	Fórmico	3.22	1.55	0.08	4.06	6.70	1.33	18.26	2.66	0.00
	Acético	7.36	0.00	7.04	9.31	8.26	0.00	14.24	5.95	5.46

BA, *B. adolescentis*; BAN, *B. animalis*; BBF, *B. bifidum*; BI, *B. infantis*; BLO, *B. longum*; LA, *L. acidophilus*; LR, *L. rhamnosus*. DSC, *Dasyilirion* sp.; ATG, *Agave tequilana* var. azul Gto.; RSE, Raftilosa®Synergy1; RNE, Raftiline®GR.

La conclusión final de la parte experimental *in vitro*, es que los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. ofrecen un alto importante potencial prebiótico, abriendo nuevas alternativas como ingredientes alimenticios y/o ingredientes promotores de bienestar y salud.

C. Efecto del consumo de fructanos de *A. tequilana* y *Dasyilirion* sp. en ratones

Después de haber realizado los experimentos *in vitro* se seleccionaron los dos fructanos con mejores características prebióticas, con los cuales se diseñaron los experimentos *in vivo*, donde se evaluó por primera vez el efecto del consumo de fructanos de *A. tequilana* var. azul de Gto. (ATG) y de *Dasyilirion* sp. de Chih. (DSC) sobre los niveles de glucosa y lípidos en un ensayo *in vivo* utilizando como modelo de estudio ratones macho C57Bl/6J. Los ratones se alimentaron con una dieta estándar, o suplementada o no con fructanos (DSC, ATG y RAF) al 10%. Los tratamientos con fructanos fueron bien tolerados por los ratones. En general, el suplementar la dieta con fructanos disminuyó la ingesta de alimento (Tabla 9), así como también, la ganancia de peso corporal (Figura 21) y excreción de heces (Tabla 9), comparado con la dieta sin fructanos. En relación a la ingesta de alimento (Tabla 9), los ratones con la dieta suplementada con RAF o ATG comieron un 11% y 10% menos alimento que las que se alimentaron con la dieta estándar, respectivamente. La ingesta de energía total (Figura 22) fue significativamente menor en todos los grupos

alimentados con fructanos que en el grupo estándar. Los ratones que recibieron las dietas suplementadas con fructanos, ATG, DSC y RAF mostraron una ganancia de peso corporal significativamente menor ($\approx 2\%$ del total del peso corporal contra $\approx 8\%$ para el grupo sin fructanos) durante todo el período

88

Page 89

experimental (Figura 21). Sólo la dieta ATG incrementó significativamente la excreción de heces comparado con el grupo STD (17% más, en base seca), no siendo significativo el incremento para los otros grupos de fructanos, DSC y RAF (Tabla 9).

Los efectos en comportamiento alimenticio y de desarrollo fueron similares al comparar a los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. con los comerciales, es decir, con RAF. El efecto de los fructanos sobre la ingesta de energía no es debida a un efecto directo de esos fructanos, sino que realmente se puede atribuir al efecto metabólico en el ciego-colon, debido a la fermentación de dichos carbohidratos.

a. Peso y contenido de lípidos de hígado y tejido epididimal

Solamente la dieta suplementada con ATG disminuyó significativamente tanto el peso de tejido adiposo como el de hígado (Tabla 9), mostrando una disminución no significativa en los niveles de colesterol hepático en este grupo (Tabla 10), siendo ésta, la única modificación bioquímica observada.

b. Niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en sangre

En el estado postprandial, las concentraciones de glucosa en sangre se vieron disminuidas en 19, 15 y 14% en ratones alimentados con RAF, ATG y DSC, respectivamente, cuando se comparó contra la dieta STD (Tabla 11). Las concentraciones de triglicéridos (TAG) comparado contra la dieta STD se vieron reducidas en un 31%, 11% y 7% en ratones alimentados con RAF, ATG y DSC, respectivamente. La reducción en las concentraciones de colesterol fue

89

de aproximadamente 20% en animales que recibieron la dieta suplementada con fructanos independientemente del grupo, comparado con la dieta STD. Los ácidos grasos no esterificados (NEFA) no se vieron significativamente modificados por ninguno de los tratamientos con fructanos. Los niveles de glucosa y colesterol plasmáticos se correlacionaron positivamente con la ganancia de peso corporal (Datos no mostrados).

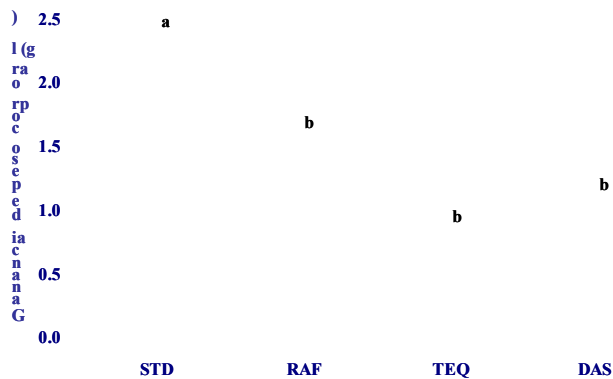


Figura 21. Ganancia de peso corporal. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto. DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio (n = 8) con EEM. Valores con letra diferente fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Tabla 9. Efecto de la dieta sobre la ingesta de alimento, producción de heces, peso de hígado y tejido epididimal.

	STD		RAF		ATG		DSC	
	Prom EEM		Prom EEM		Prom EEM		Prom EEM	
Ingesta de alimento, g/d/ratón	3.034	^a 0.08	2.702	^b 0.08	2.718	^b 0.09	2.814	^{ab} 0.11
Heces, peso seco, g/jaula	2.730	^a 0.08	2.890	^{ab} 0.24	3.200	^b 0.14	2.910	^{ab} 0.13
Peso de hígado, g	4.213	^a 0.07	4.183	^a 0.12	3.654	^b 0.15	4.011	^{ab} 0.11
Peso de tejido epididimal, g	1.502	^a 0.11	1.320	^{ab} 0.07	1.098	^b 0.10	1.346	^{ab} 0.07

STD, estándar; RAF, raftilosa P95; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio con EEM. Valores con letra diferente fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). n = 11 para ingesta de alimento; n = 4 para heces; Peso de hígado: n = 7 para RSE y ATG y n = 8 para STD y DSC; Tejido epididimal: n = 7 para STD y ATG y n = 8 para RSE y DSC.

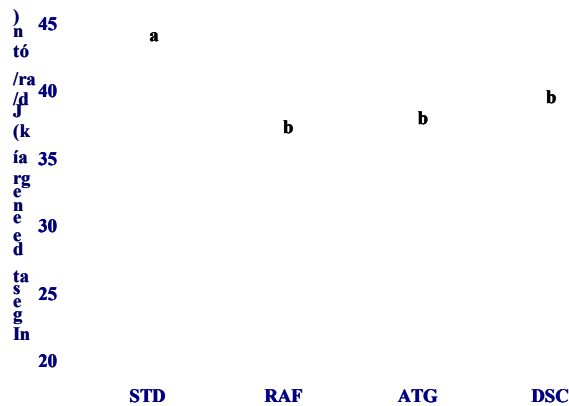


Figura 22. Ingesta de energía total. STD, Estándar; RAF, raftilosa P95; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio (n = 11) con EEM. Valores con letra diferente fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Tabla 10. Efecto de la dieta sobre los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en hígado.

STD	RAF	ATG	DSC
Prom* EEM	Prom* EEM	Prom* EEM	Prom* EEM

Triglicéridos	0.127 ^a	0.01	0.125 ^a	0.01	0.114 ^a	0.01	0.127 ^a	0.02
Colesterol	0.082 ^{ab}	0.00	0.102 ^a	0.01	0.076 ^b	0.00	0.090 ^{ab}	0.01
NEFA	0.109 ^a	0.01	0.122 ^a	0.01	0.097 ^a	0.01	0.096 ^a	0.01

*[mmol/mg proteína]. STD, estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyliirion* sp. Chih. NEFA, ácidos grasos no esterificados; Valores promedio (n = 8) para cada parámetro evaluado con EEM. Valores con letra diferente fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

92

Page 93

Tabla 11. Concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en sangre.

	Glucosa*		Triglicéridos*		Colesterol*		NEFA*	
	Dieta	Prom	EEM	Prom	EEM	Prom	EEM	Prom
STD	10.36 ^a	0.27	1.40 ^a	0.11	2.88 ^a	0.12	1.22 ^a	0.12
RAF	8.44 ^b	0.38	0.97 ^b	0.08	2.40 ^b	0.04	1.12 ^a	0.11
ATG	8.76 ^b	0.31	1.24 ^{ab}	0.09	2.40 ^b	0.14	1.36 ^a	0.11
DSC	8.91 ^b	0.39	1.31 ^{ab}	0.08	2.30 ^b	0.10	1.32 ^a	0.11

* [mM]; NEFA, Ácidos grasos no esterificados; STD, estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyliirion* sp. Chih. Valores promedio (n = 8) para cada parámetro evaluado con EEM. Valores con letra diferente fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

c. Análisis histológicos

Los análisis histológicos del hígado no revelaron ninguna diferencia entre grupos. Se observó una estructura normal de los hepatocitos en todos los grupos de dietas. La tinción de grasa con aceite rojo "oil red" dio reacción negativa.

d. Peso del ciego

Los fructanos mostraron un efecto más pronunciado en el peso del ciego total (Figura 23). Se observó un alargamiento significativo del ciego en los ratones alimentados con ATG a casi el doble comparado contra la dieta STD; las dietas DSC y RAF incrementaron el peso del ciego total en aproximadamente un 65%.

Los incrementos observados en este estudio del peso del ciego y producción de heces, concuerdan con otros trabajos previamente publicados, y son atribuibles al consumo de fructanos por ratas y hámsteres (Trautwein y col., 1998; Campbell y col., 1997; Delzenne y col., 1995).

El efecto sobre el incremento en tejido del ciego, refleja hipertrofia como consecuencia de la fermentación de fructanos por bacterias colónicas (Trautwein y col., 1998; Campbell y col., 1997).

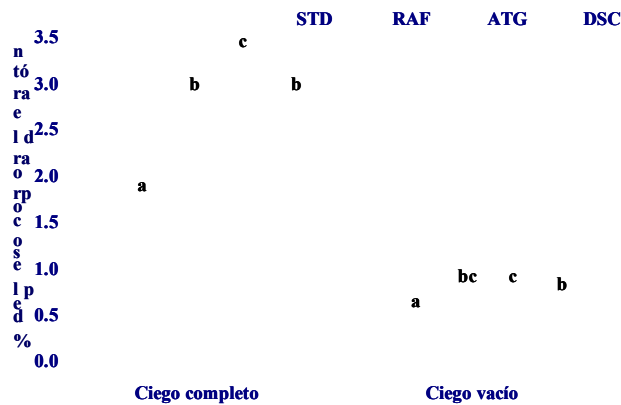


Figura 23. Efecto de la dieta sobre el peso del ciego en ratones. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio (n = 8) para cada parámetro evaluado con EEM. Valores con letra diferente fueron estadísticamente diferentes (*P* ≤ 0.05).

e. mRNA de proglucagon intestinal (precursor) y niveles de péptido-1 tipo glucagon en intestino y vena porta

Los niveles de mRNA de proglucagon en el ciego (Tabla 12) se incrementaron por más del 30% en las dietas RAF y ATG, comparado contra la dieta STD, sin embargo, no se observó efecto significativo para el grupo de DSC. La concentración de GLP-1 en el ciego fue mayor en las dietas suplementadas con fructanos. Las dietas de ATG, RAF y DSC mostraron concentraciones equivalentes (expresadas como pmol/ciego) a 12.92 ± 1.20, 11.65 ± 1.19 y 9.34 ± 0.62, respectivamente, mientras que en el caso de la dieta STD, la concentración fue de 6.79 ± 0.70.

Tabla 12. Niveles de mRNA de proglucagon en el ciego.

Dieta	Ciego*		Colon proximal*	Colon medio*	Colon distal*
	Prom	EEM Prom	EEM	Prom	EEM Prom EEM
STD	0.44 ^a	0.03 0.65 ^a	0.03	0.49 ^a	0.03 0.86 ^a 0.13
RAF	0.60 ^c	0.01 0.77 ^a	0.05	0.51 ^{ab}	0.03 1.15 ^a 0.02
ATG	0.58 ^{bc}	0.02 0.73 ^a	0.04	0.59 ^b	0.02 0.84 ^a 0.12
DSC	0.48 ^{ab}	0.04 0.69 ^a	0.04	0.50 ^{ab}	0.02 0.96 ^a 0.11

*Valores en RFU (Unidades de fluorescencia relativa, mRNA proglucagon/mRNA β-actina). STD, Estándar; RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio (n = 7) con EEM para cada parámetro evaluado. Resultados con diferente letra fueron significativamente diferentes (*P* ≤ 0.05).

Los niveles de mRNA de proglucagon medidos en el colon no fueron significativamente diferentes entre grupos (Tabla 12), excepto por un incremento moderado pero significativo en el grupo ATG comparado con el control en el colon medio. La cuantificación del contenido del péptido GLP-1 en los diferentes segmentos del colon (Figura 24), reveló que los ratones alimentados con la dieta suplementada con diferentes fructanos exhibieron una mayor concentración de GLP-1 que la dieta STD. Este incremento fue sólo significativo en el colon proximal nuevamente para la dieta ATG, en el colon medio para la dieta DSC y en el colon distal para RAF. Finalmente, cuando las concentraciones de GLP-1 se midieron en la vena porta (Figura 25), estas fueron mayores en los ratones alimentados con las dietas suplementadas con fructanos, independientemente del tipo de éste, comparado con la dieta STD; siendo casi el doble en el grupo RAF contra el control.

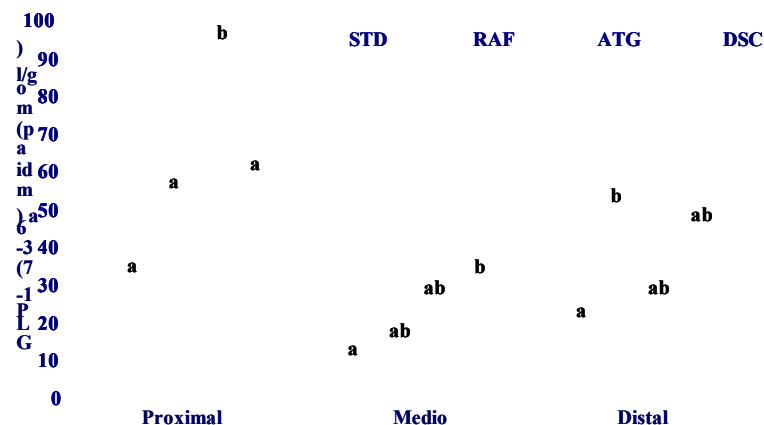


Figura 24. Concentración intestinal de GLP-1 (7-36) amida. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio con EEM. Resultados con diferente letra fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). Ciego: n = 8 para STD, RSE y DSC y n = 6 para ATG; Colon proximal: n = 7 para STD, DSC y ATG y n = 6 para RAF; Colon medio y distal: n = 7 para todos los grupos.

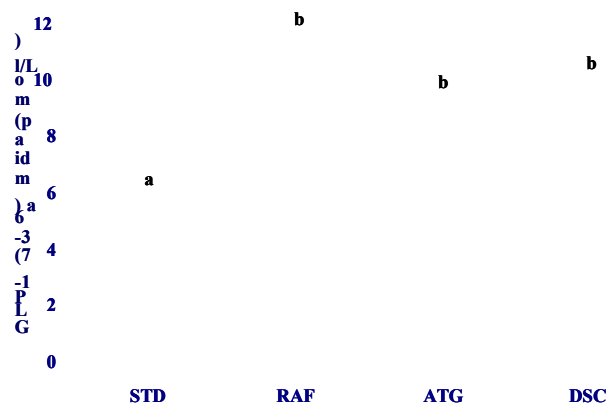


Figura 25. Concentración de GLP-1 (7-36) amida en vena porta. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio con EEM. Resultados con diferente letra fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). n = 5 para STD, n = 6 para RSE y DSC y n = 8 para ATG.

Para concluir de los resultados *in vivo*, como se ha reportado previamente, el suplementar la dieta con fibras solubles tiene efectos benéficos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ya que ayuda a mejorar el control glicémico, disminuye la hiperinsulinemia y disminuye las concentraciones de lípidos

plasmáticos (Chen y col., 2003; Chandalia y col., 2000; Vuksan y col., 2000; Anderson y col., 1999; Groop y col., 1993). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la fibra puede ejercer algunos de esos efectos, aún no están completamente entendidos. La viscosidad de las fibras se ha propuesto como una importante propiedad (Vuksan y col., 2000). Sin embargo, algunas fibras tales como los oligosacáridos no digeribles, pueden mostrar sus efectos a pesar de que no tienen propiedades gelificantes y no modifican la viscosidad al encontrarse en solución.

La fermentación de fibras genera ácidos grasos de cadena corta (SCFA), pudiendo esto estar implicado en la modulación de la expresión del gen proglucagon a nivel intestinal y subsecuentemente, secretar los péptidos derivados de proglucagon como el GLP-1 (Tappenden y col., 2003; Massimino y col., 1998; Reimer y McBurney, 1996).

Como se mencionó en la introducción, el GLP-1 actúa como una hormona incretina y es conocido como un agente antidiabético que combina efectos insulínotropicos y anorécticos (Meier y col., 2002). El péptido-1 tipo glucagon juega un importante papel en disminuir los niveles de glucosa en sangre, principalmente a través de su habilidad de potenciar el efecto estimulante de la glucosa sobre la secreción de insulina en las células β -pancreáticas (Holz y col., 1993). También afecta los niveles de glucosa en sangre a través de su efecto inhibitorio de vaciado gástrico (Nauck y col., 1997), supresión del apetito

97

(Turton y col., 1996) y por medio de la inhibición en la secreción de glucagon de las células α (Komatsu y col., 1989).

Como parte del trabajo de doctorado, se ha evaluado por primera vez el efecto del consumo de fructanos de *A. tequilana* var. azul de Gto. y de *Dasyilirion* sp. de Chih. sobre el metabolismo de glucosa y lípidos en un ensayo *in vivo* utilizando como modelo de estudio ratones macho C57Bl/6J. Los tratamientos con fructanos fueron bien tolerados por los ratones, siendo el tratamiento ATG el único responsable de un incremento en la excreción fecal. Algunos de los efectos positivos similares a los ya descritos para los fructanos tipo inulina se

observaron con los fructanos ATG y DSC, los cuales son, una disminución en la ingesta de energía y ganancia de peso corporal, junto con una disminución en glicemia y trigliceridemia. La trigliceridemia ha sido considerada como un factor implicado en la obesidad de roedores (Ji y Friedman, 2003). Sin embargo, tomando en consideración los datos obtenidos de animales en todos los grupos evaluados en este trabajo, no se observó una correlación significativa entre la ganancia de peso corporal y la trigliceridemia (Prueba de Pearson $p > 0.05$) contrario a los que se ha reportado en animales alimentados con isoflavonas de soya (Demonty y col., 2002). Por lo tanto, parece improbable que la disminución en la ingesta de energía, por sí sola, pueda ser responsable de la mejora en trigliceridemia en animales alimentados con fructanos. Por otro lado, en este estudio se observó una correlación positiva entre los niveles de glucosa, colesterol en sangre y la ganancia de peso corporal, sugiriendo que estos parámetros están más relacionados a la ingesta de energía y al desarrollo de la masa grasa o tejido adiposo.

98

De los fructanos evaluados en este trabajo, ATG fue el más eficiente en cuanto a la disminución de ganancia de peso corporal, mientras que su efecto en glicemia y en trigliceridemia fue menos pronunciado que el observado con RAF. Esto sugiere que la disminución en peso corporal no es la única manera por la cual los fructanos probados en este trabajo pueden modular la homeostasis de glucosa y lípidos. Delzenne y Kok (1999) mencionaron que el principal efecto sistémico de alimentar ratas con RAF, es una disminución en los niveles de triglicérido en sangre. Kok y col. reportaron que la ingesta de RAF reduce glicemia postprandial e insulinemia en un 17% y 26% respectivamente, pudiendo esto estar implicado en una menor lipogénesis y consecuentemente en la menor producción de triglicéridos hepáticos (Kok y col., 1996; Hillgartner y col., 1995). Este estudio confirma este aspecto, en cuanto a la disminución de trigliceridemia debido a RAF; mientras que los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyllirion* sp. no mostraron efecto en este parámetro. Sin embargo, todos los

tipos de fructanos disminuyeron significativamente la glicemia. Esto sugiere, que una disminución de trigliceridemia por efecto de la fermentación de los fructanos, no es necesariamente atribuible a una disminución en la disponibilidad de glucosa.

La fermentación intestinal ha sido tomada en consideración en la interpretación de los efectos metabólicos de los fructanos dietarios. La fermentación de fructanos en el ciego-colon conduce a la producción de SCFA, de los cuales el propionato ha sido reportado como un inhibidor de la síntesis de lípidos hepáticos (Delzenne, 2003; Demigné y col., 1999; Kok y col., 1998; 1996). Demigné y col. (1999) reportaron que el propionato disminuye la síntesis de colesterol. Interesantemente, se observó en este estudio, una disminución

99

Page 100

significativa en los niveles de colesterol en sangre, así como una disminución significativa en colesterol hepático únicamente con el tratamiento de ATG. La fermentación es un punto clave, ya que en ratas obesas Zucker, la administración de celulosa, la cual no es fermentable, en lugar de fructooligosacáridos, no permitió observar alguna mejora en parámetros relacionados a tejido adiposo, peso corporal y/o metabolismo de lípidos (Daubioul y col., 2002). Sin embargo, y para apoyar la falta de un efecto directo debido al tratamiento con fructanos, ratones con el receptor de GLP-1 bloqueado (ratones knockout o ratones tratados crónicamente con antagonistas al receptor GLP-1) y sometidos a un tratamiento con fructanos tipo inulina, no exhibieron ningún efecto en saciedad, peso corporal y tejido adiposo, comparados a ratones que recibieron la dieta basal correspondiente, mostrando con esto, que el efecto de los fructanos en saciedad (y consecuentemente en peso corporal) son debido a la interacción con la producción de GLP-1 y puede no ocurrir a través de los fructanos *per se* (Cani y col., 2006a).

El péptido-1 tipo glucagon puede jugar un papel en la modulación de la ingesta de alimento y de la glicemia, ya que todos los tipos de fructanos incrementaron su concentración en la vena porta. Un incremento en el contenido de GLP-1 en

el ciego y de su mRNA precursor (proglucagon) en diferentes secciones del colon están de acuerdo con la hipótesis de que la mayor secreción de GLP-1 en la vena porta, es resultado de un incremento en la expresión de proglucagon en las células L dependiente de la fermentación, estando presentes dichas células en la parte inferior del intestino, es decir, ciego y colon (Reimer y col., 1997). Sin embargo, datos recientes sugieren que *Rafilosa* puede incrementar

100

Page 101

el contenido colónico de GLP-1, promoviendo la diferenciación de las células L (Cani y col., 2007). Se ha reportado que los SCFA estimulan la secreción de péptidos derivados de proglucagon, siendo el butirato el principal ácido implicado en este aspecto (Tappenden y col., 1998; Tappenden y McBurney 1998). Recientemente, Zhou y col. (2006) por medio de análisis *in vitro* encontraron que el butirato incrementó la expresión del gen proglucagon en una manera dependiente de la dosis (Zhou y col., 2006). En este estudio, se observó que el incremento del nivel de mRNA de proglucagon y de GLP-1 en los diferentes segmentos intestinales fue diferente dependiente de la fuente de fructanos evaluada.

Interesantemente, entre los fructanos evaluados, los de *A. tequilana* var. azul fueron los más eficaces en la disminución de tejido adiposo, peso corporal y de tejido hepático, por lo cual se propone que esta nueva fuente de fructanos puede ser de gran interés en estudios enfocados a relacionar la modulación específica de la flora microbiana colónica y el riesgo de enfermedades asociadas con obesidad.

De esto surge la pregunta, ¿Son esos estudios relevantes para la salud y el comportamiento humano?, Flint y col. (1998) examinaron el efecto de una infusión intravenosa de GLP-1 sobre el apetito, ellos reportaron que GLP-1 aumentó la saciedad y redujo la ingesta energética, pudiendo entonces GLP-1 jugar un papel importante en la regulación fisiológica del apetito y de la ingesta energética en humanos. Por otro lado, en el 2003, Piche y col. mostraron que los fructanos fueron capaces de incrementar la producción de GLP-1 por varias horas después de la ingesta de alimento. En este contexto, Cani y col. (2006b)

normales. La puerta está abierta para iniciar estudios con otro tipo de fructanos, de diferente origen botánico y geográfico. Finalmente, los resultados de este estudio enfatizan el potencial de los fructanos de *A. tequilana* var. azul y *Dasyilirion* sp. en la modulación de la homeostasis de glucosa y lípidos, así como también sobre los niveles de GLP-1 y en la expresión de proglucagon. Además, estos resultados mostraron una influencia positiva de los fructanos, sobre el control del peso corporal, lo cual puede ser de interés en el control de la obesidad.

XII. CONCLUSIONES

- ❖ Los fructanos de *Agave* spp. y *Dasyilirion* sp. mostraron buenos efectos prebióticos, en general.
- ❖ Los fructanos de menor grado de polimerización estimularon mejor el crecimiento de las bacterias probióticas, siendo DSC el que mejores resultados dio, seguido por ATG en la mayoría de las especies bacterianas evaluadas.
- ❖ El mejor efecto prebiótico se encuentra en los fructanos de *Agave* spp. que pertenecen al grupo II y al III. Esos grupos tienen la característica de ser fructanos con estructuras menos ramificadas y menor DP, mientras que los fructanos del grupo I poseen estructuras altamente ramificadas y con mayores DP.
- ❖ Los fructanos de la misma especie de *Agave*, pero de plantas que crecieron en diferentes zonas geográficas, mostraron mayores diferencias en el efecto prebiótico cuando se evaluaron con la misma especie bacteriana, pudiendo esto ser explicado en base a la diversidad estructural de los fructanos dentro de las especies de *Agave*, tal como es el caso de los fructanos de ATG comparados contra ATJ.
- ❖ Se pudo correlacionar el crecimiento bacteriano con el descenso de pH y la mayor producción de los ácidos grasos de cadena corta.
- ❖ Se detectaron los ácidos láctico, fórmico y acético en el medio de cultivo.
- ❖ En general, el suplementar la dieta con fructanos disminuyó la ingesta de alimento y energía, así como también se observó una menor ganancia de peso corporal y mayor excreción de heces.

103

- ❖ Con respecto a la ingesta de alimento, los ratones alimentados con la dieta suplementada con fructanos ATG consumieron aproximadamente un 10% menos alimento comparada con la dieta STD.

- ❖ La ingesta de energía fue significativamente menor en todos los grupos alimentados con fructanos comparada al grupo STD.
- ❖ Los ratones que recibieron las dietas ATG y DSC tuvieron una menor ganancia de peso corporal.
- ❖ En el caso del tejido epididimal, solamente la dieta ATG disminuyó significativamente el peso de dicho tejido comparado con la dieta STD.
- ❖ En estado postprandial, las concentraciones de glucosa disminuyeron significativamente por 15 y 24% comparado con la dieta STD en ratones alimentados con ATG y DSC, respectivamente.
- ❖ Las concentraciones de triglicéridos se redujeron en un 11 y 7% en ratones alimentados con ATG y DSC, respectivamente, comparadas a la dieta STD.
- ❖ La reducción en los niveles de colesterol alcanzó cerca del 20% para el grupo de dietas suplementadas con fructanos.
- ❖ Los niveles de glucosa y colesterol en sangre se correlacionaron positivamente con la ganancia de peso corporal.
- ❖ Los ratones alimentados con la dieta suplementada con los diferentes fructanos exhibieron una mayor concentración de GLP-1 que con la dieta STD.
- ❖ En vena porta, la concentración de GLP-1 en los ratones alimentados con fructanos fue significativamente mayor comparada a la concentración STD.
- ❖ Finalmente, los resultados obtenidos muestran una influencia positiva del consumo de fructanos sobre el control del peso corporal y los niveles de

104

glucosa en sangre de los ratones; lo cual puede ser de interés en el control y manejo de obesidad y diabetes en humanos.

XIII. ABREVIATURAS

CAM	Metabolismo ácido de las Crasuláceas
d	Día
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DO	Densidad óptica
DP	Grado de polimerización
DPPIV	Dipeptidil peptidasa IV
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
EEM	Error estándar de la media
°C	Grado centígrado
g	Gramos
GLP-1	Péptido-1 tipo glucagon
h	Hora
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Kcal	Kilocaloría
Kg	Kilogramo

KJ	Kilo joule
L	Litro
m²	Metro cuadrado
MALDI-TOF-MS	Desorción/Ionización mediante láser asistida por matriz- tiempo de vuelo-espectrometría de masas
min	Minuto
μL	Micro litro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribobucleico mensajero
MRS	Mann Rogosa y Sharpe
SCFA	Ácido grasos de cadena corta
SNC	Sistema nervioso central
TGI	Tracto gastrointestinal
TLC	Cromatografía de capa fina
ufc	Unidades formadoras de colonias

106

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Tamimi**, M. A., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. 2006. *in vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 407-414.
- Anderson**, J. y Hanna, T. 1999. Impact of nondigestible carbohydrate on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *J. Nutr.*, 129, 1457-1466.
- Anderson**, J.W., Allgood, L. D., Turner, J., Oeltgen, P. R. y Daggy, B. P. 1999. Effects of psyllium on glucose and serum lipid responses in men with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 466-473.
- Archer**, S., Meng, S., Wu, J., Johnson, J., Tang, R. y Hodin, R. 1998. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinctive path-ways. *Surgery*, 124, 248-253.
- Arulmozhi**, D. K. y Portha, B. 2006. GLP-1 based therapy for type 2 diabetes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 28, 96-108.
- Barbany**, M. y Foz, M. 2002. Obesity: concept, classification and diagnosis. *Anal. Sis. San. Navarra*, 25, 7-16.
- Baird**, G. D., Lomax, M. A., Symonds, H. W. y Shaw, D. R. 1980. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, piruvate and propionate in dairy cows *in vivo* in relation to lactation and nutrient supply. *Biochem. J.*, 186, 47-57.
- Bathia**, I. S. y Nandra, K. S. 1979. Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*. *Phytochemistry*, 18, 923-927.
- Bell**, G.I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P. J. y Najarian, R. C. 1983. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*, 304, 368-371.

- Beysen, C.**, Karpe, F., Fielding, B. A., Clark, A., Levy, J.C. y Frayn, K. N. 2002. Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans. *Diabetologia*, 45, 1533-1541.
- Boeckner, L. S.**, Schnepf, M. I. y Tungland, B. C. 2001. Inulin: a review of nutritional and health implications. *Adv. Food Nutr. Res.*, 43, 1-63.
- Boillot, J.**, Alamowitch, C., Berger, A. M., Luo, J. y Bruzzo, F. 1995. Effect of dietary propionate on hepatic glucose production, whole body glucose utilization, carbohydrate and lipid metabolism in normal rats. *Brit. J. Nutr.*, 73, 241-255.

107

Page 108

- Bonnett, G. D.**, Sims, I. M., Simpson, R. J. y Cairns, A. J. 1997. Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytol.*, 136, 11-17.
- Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brubaker, P. L.** y Anini, Y. 2003. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagons-like peptide-2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 83, 1005-1012.
- Campbell, J. M.**, Fahey, G. C. y Wolf, B. W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.*, 127, 130-136.
- Campfield, L. A.**, Smith, F. J. y Burn, P. 1998. Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science*, 280, 1383-1387.
- Cani, P. D.**, Hoste, S., Guiot, Y. y Delzenne, N. M. 2007. Dietary non digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Brit. J. Nutr.*, en prensa.
- Cani, P. D.**, Knauf, C., Iglesias, M. A., Drucker, D. J., Delzenne, N. M. y Burcelin, R. 2006a. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*, 55, 1484-90.
- Cani, P. D.**, Joly, E., Horsmans, Y. y Delzenne, N., M. 2006b. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 60, 567-72.
- Cani, P. D.**, Daubioul, C. A., Reusens, B., Remacle, C., Catillo, G. y Delzenne, N. M. 2005. Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J. Endocr.*, 185, 457-465
- Cani, P. D.**, Dewever, C. y Delzenne, N. M. 2004. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Brit. J. Nutr.*, 92, 521-526.
- Carabin, I. G.** y Flamm, W. G. 1999. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 268-282.

Chandalia, M., Abhimanyu, G., Lutjohann, D., von Bergmann, K., Grundy, S. M. y Brinkley, L. J. 2000. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *New Eng. J. Med.*, 342, 1392-1398 (Abstr).

108

Page 109

- Chen, H. -L.**, Sheu, W. H. -H., Tai, T. -S., Liaw, Y. -P. y Chen, Y. -C. 2003. Konjac supplement alleviated hypercholesterolemia and hyperglycemia in type 2 diabetic subjects-a randomized double-blind trial. *J. Am. Coll. Nutr.*, 22, 36-42.
- Cherbut, C.**, Blottiere, H., Kaefler, B. y Galmiche, J. P. 1996. Short-chain fatty acids: a luminal modulatory signal for gastrointestinal motility. En: *Dietary Fibre and Fermentation in the Colon* (ed. Y. Malkki y J. H. Cummings), pp. 203-208. European Commission, Brussels.
- Chomczynski, P.**, y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Christl, S. U.**, Eisner, H. D., Dusel, G., Kasper, H. y Scheppach, W. 1996. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.*, 41, 2477-2481.
- Csordas, A.** 1996. Butyrate, aspirin, and colorectal cancer. *Eur. J. Can. Prevent.*, 5, 221-231.
- Coudray, C.**, Bellanger, J., Castiglia-Delavaud, C., Remesy, C., Vermorel, M. y Rayssiguier, Y. 1997. effects of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51, 375-380.
- Crittenden, R. G.** y Playne, M. J. 1996. Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 353-361.
- Cummings, J. H.** y Macfarlane, G. T. 2002. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Brit. J. Nutr.*, 87, 145-151.
- Cummings, J. H.**, Macfarlane, G. y Englyst, H. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 415-420.
- Cummings, J. H.** 1995. Short chain fatty acids. En: *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology* (ed. G. R. Gibson y G. T. Macfarlane), pp. 101-130. CRC Press, Boca Ratón.
- Cummings, J. H.** y Macfarlane, G. T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 443-459.
- Cummings, J. H.** y Englyst, H. N. 1987. Fermentation in the large intestine and the available substrates. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1243-1255.

109

- Cummings, J. H.**, Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. E. y Macfarlane, G. T. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28, 1221-1227.
- Dahlgren, R. T. M.**, Clifford, H. T. y Jeo, P. F. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Editorial Springer-Verlag. Berlín.
- Daubioul, C.**, Rousseau, N., Demeure, R., Gallez, B., Taper, H., Declercq, B. y Delzenne, N. 2002. Dietary Fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa rats. *J Nutr.*, 132, 967-973.
- Debruyne, A.**, Álvarez, A. P., Sandra, P. y De Leenheer, L. 1992. Isolation and identification of β -D-fructofuranosyl-(2,1)-D-fructose, a product of the enzymatic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. *Carbohydr. Res.*, 235, 303-308.
- deFazio, A.**, Chiew, Y. -E., Donoghue, C., Lee, C. S. L. y Sutherland, R. L. 1992. Effect of sodium butyrate on estrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in human breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.*, 267, 18008-18012.
- Deguchi, Y.**, Morishita, T. y Mutai, M. 1985. Comparative studies on sintesis of water soluble vitamins among human species of *Bifidobacteria*. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 13-19.
- del Castillo, J. R.**, Muniz, R., Sulbaran-Carrasco, M. C. y Pekerar, S. 1994. Cellular metabolim of colonocytes. En: Short Chain Fatty Acids (ed. H. J. Binder, J. H. Cummings y K. H. Soergel), pp. 180-191. Kluwer Academic Publishers, London.
- Delzenne, N. M.** 2003. Oligosaccharides: state of the art. *Proc. Nutr. Soc.*, 62, 177-182.
- Delzenne, N. M.** 1999. The hypolipidaemic effect of inulin: when animal studies help to approach the human problem. *Brit. J. Nutr.*, 82, 3-4.
- Delzenne, N. M.** y Kok, N. N. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J. Nutr.*, 129, 1467-1470.
- Delzenne, N. M.**, Aertssens, J., Verplaetse, H., Roccero, M. y Roberfroid, M. 1995. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen, and energy digestive balance in the rat. *Life Sci.*, 57, 1579-1587.
- Demigné, C.**, Révész, C. y Morand, C. 1999. Short chain fatty acids. En: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. pp. 55-69. Eds. G. Gibson and M. Roberfroid. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.

- Demigné, C.** y Remesey, C. 1994. Short chain fatty acids and hepatic metabolism. En: Short Chain Fatty Acids (ed. H. J. Binder, J. H. Cummings y K. H. Soergel), pp. 272-282. Kluwer Academic Publishers, London.

- Demonty, I.**, Lamarche, B., Deshaies, Y. y Jacques, H. 2002. Role of soy isoflavones in the hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 671-677.
- Drucker, D. J.** 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metabol.*, 3, 153-165.
- Drucker, D. J.** 2005. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metabol.*, 1, 22-31.
- Drucker, D. J.** 2003. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol. Endocrinol.*, 17, 161-171.
- Drucker, D. J.** 2001. Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology*, 142, 521-527.
- Duncan, S. H.**, Holtrop, G., Lobley, G. E., Calder, A. G., Stewart, C. S. y Flint, H. J. 2004a. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Brit. J. Nutr.*, 91, 915-923.
- Duncan, S. H.**, Louis, P. y Flint, H. J. 2004b. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5810-5817.
- Duncan, S. H.**, Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E. y Flint, H. J. 2002. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5186-5190.
- Englyst, H. N.**, Hay, S. y Macfarlane, G. T. 1987. Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 95, 163-171.
- Erlanson-Albertsson, C.** 2005. Appetite regulation and energy balance. *Acta Paediatr. Suppl.*, 94, 40-1.
- Farilla, L.**, Bulotta, A., Hirshberg, B., Li Calzi, S., Khoury, N., Noushmehr, H., Berlotto, C., Di Mario, U., Harlan, D. M. y Perfetti, R. 2003. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*, 144, 5149-5158.
- Farilla, L.**, Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A. y Di Mario, U. 2002. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*, 143, 4397-4408.

- Fehmann, H. C.**, Goke, R. y Goke, B. 1995. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and glucose dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrinol. Rev.*, 16, 390-410.
- Fernández, F.** y Collins, M. D. 1987. Vitamin K composition of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Letters*, 41, 175-180.
- Finke, B.**, Stahl, B., Pritschet, M., Facius, D., Wolfgang, J. y Boehm, G. 2002. Preparative continuous annular chromatography (P-CAC) enables the large-scale fractionation of fructans. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4643-4748.
- Fitch, M. D.** y Fleming, S. E. 1999. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa in vivo. *Am. J. Physiol.*, 277, 31-40.

- Flint, A., Raben, A., Astrup, A. y Holst, J. J.** 1998. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J. Clin. Invest.*, 101, 515-520.
- Fooks, L. y Gibson, G. R.** 2002. *in vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 39, 67-75.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Frank, A.** 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Brit. J. Nutr.*, 87, 287-291.
- García-Mendoza, A. y Galván, V. R.** 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Bol. Soc. Bot. México*, 56, 7-24.
- Gibson, G. R., Rastall, R. A. y Fuller, R.** 2003. The health benefits of probiotics and prebiotics. En: *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health* (ed. R. Fuller y G. Perdigón). pp. 52-76.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. y Cummings, J. H.** 1995. Selective stimulation of Bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108, 975-982.
- Gibson, G. R., y Wang, X.** 1994. Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol.*, 11, 491-498.
- Granados, S. D.** 1993. Los Agaves en México. Editorial Universidad Autónoma de Chapingo, 91-97.
- Gribble, F. M. y Reimann, F.** 2002. Pharmacological modulation of K(ATP) channels. *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 333-339.

112

- Groop, P. -H., Aro, A., Stenman, S. y Groop, L.** 1993. Long-term effects of guar gum in subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.*, 58, 513-518.
- Groop, L., Schalin, C., Franssila-Kallunki, A., Widen, E., Erstrand, A. y Eriksson, J.,** 1989. Characteristic of non-insulin-dependent diabetic patients with secondary failure to oral antidiabetic therapy. *Am. J. Med.*, 87, 183-190.
- Guarner, F. y Schaafsma, G.** 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 39, 237-238.
- Gutzwiller, J. P., Drewe, J., Goke, B., Schmidt, H., Rohrer, B., Lareida, J. y Beglinger, C.** 1999. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am. J. Physiol.*, 276, 1541-1544.
- Herrmann, C., Goke, R., Richter, G., Fehmann, H. C., Arnold, R. y Goke, B.** 1995. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*, 56, 117-126.
- Hillgartner, F. D., Salati, L. M. y Goodridge, A. G.** 1995. Physiological and molecular mechanism involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.*, 75, 47-76.

- Holz**, G. G., Kuhtreiber, W. M. y Habener, J. F. 1993. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulintropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37). *Nature*, 361, 362-365.
- Hui**, H., Wright, C. y Perfetti, R. 2001. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1 positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes*, 50, 785-796.
- Ibrahim**, S. y Bezkorovainy, A. 1993. Inhibition of *Escherichia coli* by Bifidobacteria. *J. Food Prot.*, 56, 713-715.
- Hume**, I. D. 1995. Flow dynamics of digesta and colonic fermentation. En: Physiological and Clinical Aspects of Short Chain Fatty Acid Metabolism (ed. J. H. Cummings, J. L. Rombeau y T. Sakata), pp. 119-132. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ji**, H. y Friedman, M. I. 2003. Fasting plasma triglyceride levels and fat oxidation predicts dietary obesity in rats. *Physiol. Behaviour*, 78, 767-772.
- Kaur**, N. y Gupta, A. K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.*, 27, 703-714.

113

- Kieffer**, T. J. y Habener, J. G. 1999. The glucagon-like peptides. *Endocr. Rev.*, 20, 876-913.
- King**, H., Aubert, R. y Herman, W. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diab. Care*, 21, 1414-1431.
- Knauf**, C., Cani, P. D., Perrin, C., Iglesias, M. A., Maury, J. F., Bernard, E., Benhamed, F., Grémeaux, T., Drucker, D. J., Kahn, C. R., Girard, J., Tanti, J. F., Delzenne, N. M., Postic, C. y Burcelin, R. 2005. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin. Invest.*, 115, 3554-3563.
- Kok**, N., Taper, H. y Delzenne, N. 1998. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 18, 47-53.
- Kok**, N., Roberfroid, M., Robert, A. y Delzenne, N. 1996. Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Brit. J. Nutr.* 76, 881-890.
- Komatsu**, R., Matsuyama, T., Namba, M., Watanabe, N., Itoh, H., Kono, N. y Tarui, S. 1989. Glucagonostatic and insulintropic action of glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide. *Diabetes*, 38, 902-905.
- Konturek**, S. J., Konturek, J. W. y Pawlik, T. 2004. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J. Physiol. Pharmacol.*, 55, 137-54.
- Kopelman**, P. G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 635-643.
- Kruh**, J., Defer, N. y Tichonicky, L. 1995. Effects of butyrate on cell proliferation and gene expression. En: Physiological and clinical Aspects of Short Chain Fatty Acids (ed. J. H. Cummings, J. L. Rombeau y T. Sakata). Cambridge University

- Larsen, P. J.**, Tang-Christensen, M. y Jessop, D. 1997. Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, 138, 4445-4455.
- López, M. G.**, Mancilla-Margalli, N. A. y Mendoza-Díaz, G. 2003. Molecular structure of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7835-7840.
- Luo, J.**, Rizkalla, S. W., Alamovitch, C., Boussairi, A. y Blayo, A. 1996. Chronic consumption of short chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 639-645.

114

Page 115

- MacDonald, P. E.**, El-Kholy, W., Riedel, M. J., Salapatek, A. M. F., Light, P. E. y Wheeler, M. B. 2002. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, 51, 434-442.
- Macfarlane, S.** y Macfarlane, G. T. 2003. Food and the large intestine. En: Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health (ed. R. Fuller y G. Perdígón). pp. 24-51. Blackell Publishing.
- Macfarlane, G. T.** y Macfarlane, S. 1997. Human colonic microbiota: Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol.*, 32, 3 (Abstr.).
- Macfarlane, G. T.** y Gibson, G. R. 1995. Microbiological aspects of short chain fatty acid production in the large bowel. En: Physiological and Clinical Aspects of Short Chain Fatty Acid Metabolism (ed. J. H. Cummings, J. L. Rombeau y T. Sakata), pp. 87-105. Cambridge University Press, Cambridge.
- Macfarlane, G. T.**, Gibson, G. R., Beatty, E. R. y Cummings, J. H. 1992a. Estimation of short chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria, based on branched chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiol., Ecol.*, 101, 81-88.
- Macfarlane, G. T.**, Gibson, G. R. y Cummings, J. H. 1992b. Comparison of fermentation reactions in different regions of the colon. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 57-64.
- Macfarlane, G. T.** y Cummings, J. H. 1991. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. En: The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease (ed. S. F. Phillips, J. H. Pemberton y R. G. Shorter), pp. 51-92. Raven Press, New York.
- MacIntosh, C. G.**, Horowitz, M., Verhagen, M. A., Smout, A. J., Wishart, J., Morris, H., Goble, E., Moreley, J. E. y Chapman, I. M. 2001. Effect of small intestinal nutrient infusion on appetite gastrointestinal hormone release, and gastric myoelectrical activity in young and older men. *Am. J. Gastroenterol.*, 96, 997-1007.

Majsov, S., Henrich, G., Wilson, I. B., Ravazzola, M., Orci, L. y Habner, J. F. 1986. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J. Biol. Chem.*, 261, 11880-11889.

115

Page 116

- Mancilla-Margalli, N. A.** y López, M. G. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7832-7839.
- Marti, A.**, Moreno-Aliaga, M. J. y Hebebrand, J. 2004. Genes, lifestyles and obesity. *Int. J. Obes. Relat. Meta. Disord.*, 28, 29-36.
- Massimino, S. P.**, McBurney, M. I., Field, C. J., Thomson, A. B. R., Keelan, M., Hayek, M. C. y Sunvold, G. D. 1998. Fermentable dietary fiber increases GLP-1 secretion and improves glucose homeostasis despite increased intestinal glucose transport capacity in healthy dogs. *J. Nutr.*, 128, 1786-1793.
- McKellar, R.** y Modler, H. 1989. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium spp.* *Appl. Microbiol., Biotechnol.*, 31, 537-541.
- Meier, J. J.**, Gallwitz, B., Schmidt, W. E. y Nauck, M. A. 2002. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur. J. Pharmacol.*, 440, 269-279.
- Moller, D. E.** 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 414, 821-827.
- Morris, E. R.** 1992. Physico-chemical properties of food polysaccharides. En: Dietary Fibre - a component of food (ed. T. F. Schweizer y C. A. Edwards). pp. 41-56. Springer-Verlag, Berlin.
- Nauck, M. A.**, Niedereichholz, U., Ettler, R., Holst, J. J., Orskov, C., Ritzel, R. y Schmiegel, W. H. 1997. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Met.*, 273, 981-988.
- Nauck, M. A.**, Wollschlager, D., Werner, J., Holst, J. J., Orskov, C., Creutzfeldt, W. y Willms, B. 1996. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1[7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia*, 39, 1546-1553.
- Nauck, M. A.**, Kleine, N., Orskov, C., Holst, J. J., Willms, B. y Creutzfeldt, W. 1993. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 36, 741-744.
- Nauck, M. A.**, Homberger, E., Siegel, E. G., Allen, R. C., Eaton, R. P., Ebert, R. y Creutzfeldt, W. 1986. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63, 492-498.

116

- Nilsson**, U. y Bjorck, I. 1988. Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract. *J. Nutr.*, 118, 1482-1486.
- Nobel**, P. S. 1998. Los incomparables Agaves y Cactus. Editorial Trillas. México. 121-125.
- OECD Factbook**, 2006. Estadística económica ambiental y social.
- Ohta**, A., Ohtsuki, M., Takizawa, T., Inaba, H., Adachi, T. y Kimura, S. 1994. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 64, 316-323.
- Oku**, T., Tokunaga, T. y Hosoya, H. 1984. Non-digestibility of a new sweetener, "Neosugars" in the rat. *J. Nutr.*, 114, 1574-1581.
- Orskov**, C., Rabenhøj, L., Wettergren, A., Kofod, H., y Holst, J. J. 1994. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycineextended glucagon-like peptide 1 in humans. *Diabetes*, 43, 535-539,
- Orskov**, C., Wettergren, A. y Holst, J. J. 1993. Biological effects and metabolic rates of glucagon-like peptide 1(7-36) amide and glucagon-like peptide 1(7-37) in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes*, 42, 658-661.
- Palframan**, R. J., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. 2003. Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. *Curr. Is. Intest. Microbiol.*, 4, 71-75.
- Pérez-Chaia**, A. y Oliver, G. 2003. Intestinal microflora and metabolic activity. En: Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health (ed. R. Fuller y G. Perdígón). pp. 77-98. Blackell Publishing.
- Perfetti**, R. y Merkel, P. 2000. Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic β -cell function. *Eur. J. Endocrinol.*, 143, 717-725.
- Philippe**, J., Drucker, D., Chick, W. L. y Habener, J. F. 1987. Transcriptional regulation of genes encoding insulin, glucagon, and angiotensinogen by sodium butyrate in a rat islet cell line. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 560-563.
- Piche**, T., des Varannes, S. B., Sacher-Huvelin, S., Holst, J. J., Cuber, J. C. y Galmiche, J. P. 2003. Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*, 124, 894-902.
- Pompei**, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zaroni, S., Matteuzzi, D. y Rossi, M. 2007. Folate production by Bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl. Environment. Microbiol.*, 73, 179-185.

- Pool-Zobel**, B. L. 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Brit. J. Nutr.*, 93, 73-90.

- Rao, C. V., Chou, D., Simi, B., Ku, H. y Reddy, B. S.** 1998. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffe fiber, inulin, and pectin. *Carcinogenesis*, 10, 1815-1819.
- Reddy, B. S.** 1998. Prevention of colon cancer by pre- and pro-biotics: evidence from laboratory studies. *Brit. J. Nutr.*, 80, 219-223.
- Reddy, B., Hamid, R. y Rao, C.** 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt formation. *Carcinogenesis*, 19, 1371-1374.
- Reimer, R. A., Thomson, A. B. R., Rajotte, R. V., Basu, T. K., Ooraikul, B. y McBurney, M. I.** 1997. A physiological level of rhubarb fiber increases proglucagon gene expression and modulates intestinal glucose uptake in rats. *J. Nutr.*, 127, 1923-1928.
- Reimer, R. A. y McBurney, M. I.** 1996. Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and post-prandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats. *Endocrinology*, 137, 3948-3956.
- Ritzel, R., Orskov, C., Holst, J. J. y Nauck, M. A.** 1995. Pharmacokinetic, insulinotropic, and glucagonostatic properties of GLP-1 (7-36) amide after subcutaneous injection in healthy volunteers. Dose-response-relationships. *Diabetologia*, 38, 720-725.
- Roberfroid, M. B.** 2001. Prebiotics: preferential substrate for specific germs?. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 406-409.
- Roberfroid, M., Van Loo, J. y Gibson, G.** 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolisis products. *J. Nutr.*, 128, 11-19.
- Roediger, W. E. W.** 1989. Short chain fatty acids as metabolic regulators of ion absorption in the colon. *Acta Vet. Scand.*, 86, 116-125.
- Roediger, W. E. W.** 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa of man. *Gut*, 21, 793-798.
- Rowland, I. R., Rumney, C. J., Coutts, J. T. y Lievense, L. C.** 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19, 281-285.
- Salminen, S., Bouley, C. y Boutron-Ruault, M. -C.** 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.*, 89, 147-171.
- Sánchez-Marroquín, A. y Hope, P.** 1953. Agave juice: Fermentation and chemical

composition studies of some species. *J. Agric. Food Chem.*, 1, 246-249.

- Santamaría, J. M., Herrera, J. L. y Robert, M. L.** 1995. Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant, *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regul.*, 16, 211-214.
- Shene, C., Mardones, M., Zamora, P. y Bravo, S.** 2005. Kinetics of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 fermentations: effect of the dilution rate and carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 623-630.
- Smith, J. P.** 2007. Nature and causes of trends in male diabetes prevalence,

undiagnosed diabetes, and the socioeconomic status health gradient. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 104, 13225-13231.

- Solomon, A.** y Martínez, J. A. 2006. Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 50, 27-37.
- SSA**, México, 2005. Instituto de Estadística e Informática y Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud, México. <http://www.salud.gob.mx>.
- SSA**, México, 2003. Instituto de Estadística e Informática y Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud, México. <http://www.salud.gob.mx>.
- Stanley, S.**, Wynne, K. y McGowan, B. 2005. Hormonal regulation of food intake. *Physiol. Rev.*, 85, 1131-58.
- Stephen, A. M.**, Wiggins, H. S. y Cummings, J. H. 1987. Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man. *Gut*, 28, 601-609.
- Tanaka, Y.**, Bush, K. K. y Klauck, T. M. 1989. Enhancement of butyrate-induced differentiation of HT-29 human colon carcinoma cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochem. Pharmacol.*, 38, 3859-65.
- Tappenden, K. A.**, Albin, D. M., Bartholome, A. L. y Mangian, H. F. 2003. Glucagon-like peptide-2 and short chain fatty acids: a new twist to an old story. *J. Nutr.*, 133, 3717-3720.
- Tappenden, K. A.**, Drozdowski, L. A., Thomson, A. B. R. y McBurney, M. I. 1998. Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition alters intestinal structure, glucose transporter 2 (GLUT2) mRNA and protein, and proglucagon mRNA abundance in normal rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 118-125.
- Tappenden, K. A.** y McBurney, M. I. 1998. Systemic short-chain fatty acids rapidly alter gastrointestinal structure, function, and expression of early response genes. *Did. Dis. Sci.*, 43, 1526-1536.

119

- Tisch, R.** y McDevitt, H. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*, 85, 291-297.
- Trautwein, E. A.**, Rieckhoff, D. y Erbersdobler, H. F. 1998. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in Hamsters. *J. Nutr.*, 128, 1937-1943.
- Turton, M. D.**, O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., Wilding, J. P., Smith, D. M., Ghatei, M. A., Herbert, J. y Bloom, S. R. 1996. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379, 69-72.
- USDA Plants Data Base.** <http://plants.usda.gov>
- Valenzuela-Zapata, A. G.** 1997. El Agave tequilero, su cultivo e industria. Segunda Edición. 1-24.
- van der Meulen, R.**, Avonts, L. y de Vuyst, L. 2004. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1923-1930.
- van Laere, K. M. J.**, Bosveld, M., Schols, H. A., Beldman, G. y Voragen, A. G. J. 1997.

Fermentative degradation of plant cell wall derived oligosaccharides by intestinal bacteria En: *Non-digestible oligosaccharides: Healthy food for the colon?*, Hartemink, R. (Ed.); Proceedings of the International Symposium, Wageningen Graduate School VLAG. pp. 37-46. Wageningen, Netherlands.

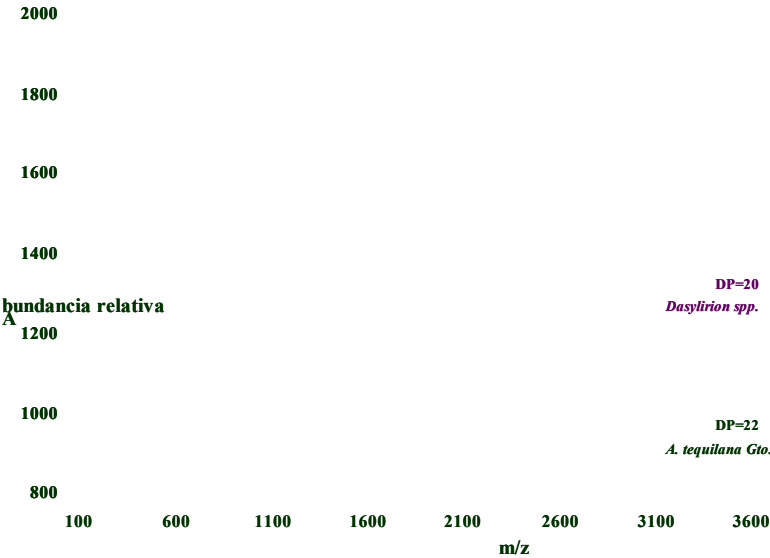
- van Laere**, A. y van den Ende, W. 2002. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell Environ.*, 25, 803-813.
- van Loo**, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H. y Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 525-552.
- Vijn**, I. y Smeeckens, S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.*, 120, 351-359.
- Vuksan**, V., Sievenpiper, J. L. y Owen, R. 2000. Beneficial effects of viscous dietary fiber from Konjac-mannan in subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*, 23, 9-14.
- Wang**, J., Sporns, P. y Low, N. 1999. Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1549-1557.
- Wang**, N. y Nobel, P. 1998. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol.*, 116, 709-714.

120

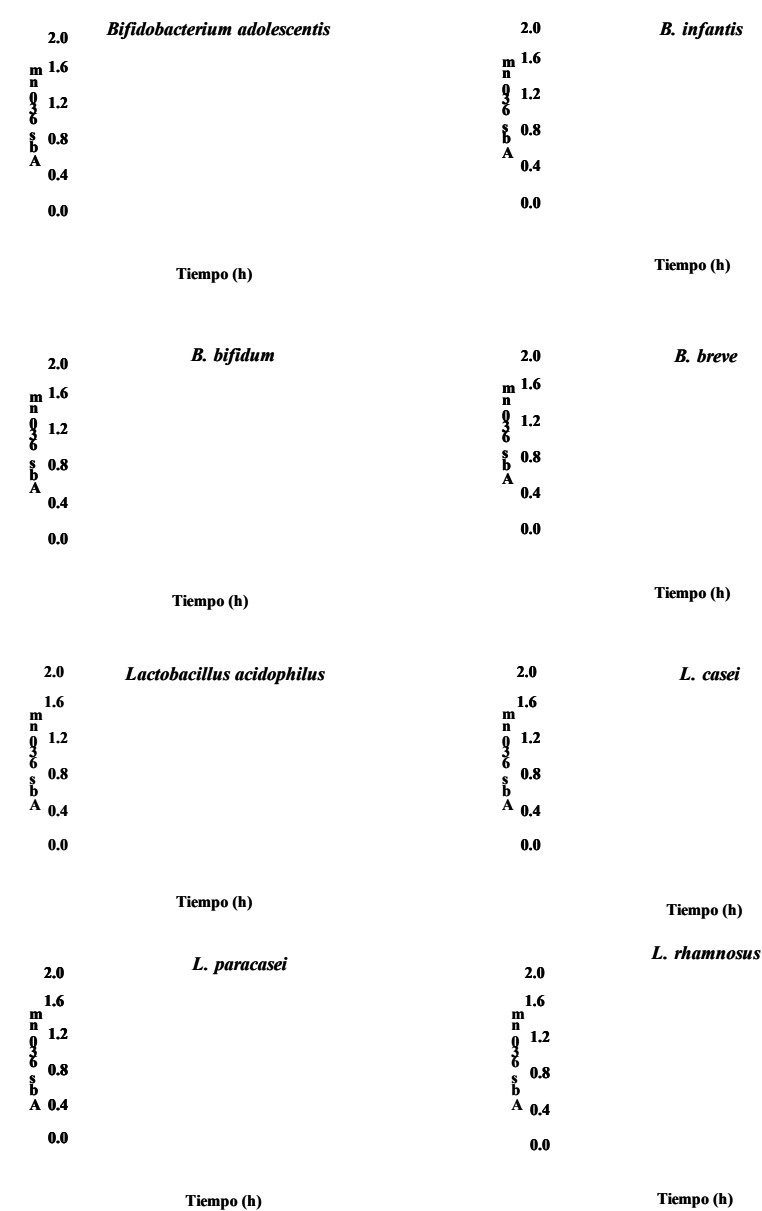
- Wargovich**, M. H., Chen, D. D., Jimenez, A., Steele, V. E., Velasco, M., Stephens, C., Price, R., Gray, K. y Kelloff, G. J. 1996. Aberrant crypt as a biomarker for colon cancer, evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol. Biom. Prevent.*, 5, 355-360.
- Wilson**, J. R. y Weiser, M. M. 1992. Colonic cancer cell (HT29) adhesion to laminin is altered by differentiation: adhesion may involve galactosyltransferase. *Exp. Cell Res.*, 201, 330-334.
- Woods**, S. C. 2004. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 286, 7-13.
- Xu**, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F. y Bonner-Weir, S. 1999. Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 48, 2270-2276.
- Yamashita**, K., Kawai, K. y Itakura, K. 1984. Effect of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr. Res.*, 4, 961-966.
- Zander**, M., Madsbad, S. y Holst, J. J. 2001. GLP-1 for six weeks reduces body weight and improves insulin sensitivity and glycemic control in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes*, 50, 31-37.
- Zhou**, J., Hegsted, M. y McCutcheon, K. L. 2006. Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. *Obesity*, 14, 683-689.

XV. APENDICE

A. Análisis tipo MALDI-TOF-MS de los fructanos de *Agave tequilana* y *Dasyilirion* sp.



B. Curvas de crecimiento para *Bifidobacteria* spp y *Lactobacillus* spp.



C. Programa de la reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa (RT-PCR).

Ciclos Temperatura Tiempo			Reacción
1	48°C	45 min	Transcripción inversa
1	94°C	2 min	Desnaturalización del híbrido RNA/cDNA
23 (22 + 1)	94°C	30 seg	Desnaturalización
	60°C	1 min	Hibridación de los iniciadores
	68°C	2 min	Elongación
1	68°C	7 min	Elongación final
1	4°C	∞	Conservación de la muestra

D. Artículo aceptado

