



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE ALGAS MARINAS SOBRE LA MICROBIOTA
INTESTINAL Y EL SISTEMA INMUNE DE RATONES
BALB/c.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

Mauricio Salvador Rodríguez Ojeda

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2008

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 22 del Mes de Agosto del 2007, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

EFFECTO DE ALGAS MARINAS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL SISTEMA INMUNE DE RATONES BALB/c.

Presentada por el alumno:

Mauricio Salvador Rodríguez Ojeda

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DR. FELIPE DE JESÚS ASCENCIO VALLE
DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA ANTONIA GUZMÁN MURILLO
CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS
CERVANTES CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Director de Tesis

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Co-Tutora

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Co-Tutora

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez †

Co-Tutor

COMITÉ REVISOR

Felipe de Jesús Ascencio Valle

Director de Tesis

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Co-Tutora

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Co-Tutora

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Director de Tesis: Felipe de Jesús Ascencio Valle

Co-Tutora: Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Co-Tutor: Dra. Thelma Rosa Castellanos

SUPLENTE

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

RESUMEN

Las infecciones gastrointestinales causadas por virus, bacterias y parásitos provocan una gran variedad de enfermedades, tales como gastritis, úlceras pépticas, apendicitis, o colitis ulcerosa. La microbiota intestinal es la colección de organismos microscópicos que viven dentro de nuestro intestino, y esta lleva a cabo muchas funciones importantes para la salud del hospedador, como la absorción de nutrientes, soporte para el sistema inmunológico, y la habilidad de luchar contra los organismos causantes de enfermedades. Los factores que controlan la composición de la microbiota intestinal pueden ser fisicoquímicos, interacciones hospedador-bacteria e interacciones microbio-microbio. Un factor fisicoquímico importante son los nutrientes y dentro de estos están los prebióticos, ingrediente selectivamente fermentado que proporcionan cambios específicos, tanto en la composición y/o actividad en la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios a la salud del hospedador. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de algas marinas en la modulación de la microbiota bacteriana asociada a mucosa intestinal, actividad hidrolítica intestinal y determinar si con ello se estimula la respuesta inmune inespecífica mediada por la microbiota intestinal de ratones BALB/c. En este trabajo, ratones BALB/c se trataron diariamente (6 semanas) por vía oral con una suspensión de algas marinas (*Eisenea arborea*, *Sargasum horridum*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Dunalliella tertiolecta*, *Opuntia ficus-indica* y Control), se sacrificaron cada 2 semanas 3 ratones por tratamiento y se tomaron muestras de sangre y placas de Peyer para análisis de expresión de interleucinas, así como de intestino para análisis microbiológico y enzimáticos. *O. ficus-indica* y *E. arborea* estimularon el crecimiento de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, *P. tricorutum* y *E. arborea* estimularon el crecimiento de especies de *Enterobacterias* y *O. ficus-indica* las inhibió. *E. arborea*, *S. horridum* y *P. tricorutum* estimularon el crecimiento de especies de Mesófilos aerobios. Solamente *P. tricorutum* no influyo en la diversidad de la microbiota. Además, se presentaron diferencias en los perfiles microbianos dependiendo del tipo de alga y en el tiempo. Las diferentes algas marinas influyeron en las actividades hidrolíticas del tipo fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, β -glucosidasa, fosfatasa acida, valina arilamidasa, esterasa C4. *E. arborea* y *P. tricorutum* presentaron una tendencia a aumentar la producción de IL-10 antiinflamatoria y *P. tricorutum*, *D. tertiolecta* y *O. ficus-indica* a la producción de TNF- α proinflamatoria del sistema inespecífico. Las algas marinas influyeron tanto en la microbiota intestinal bacteriana, así como en la actividad hidrolítica intestinal. En este trabajo no se presentaron claras diferencias en la expresión de citocinas intestinales.

Palabras claves: Algas marinas, prebióticos, microbiota asociada a mucosa, enzimas hidrolíticas, citocinas, ratón.

ABSTRACT

Gastrointestinal infections caused by virus, bacteria and parasites cause a great variety of diseases, such as gastritis, peptic ulcers, appendicitis, or ulcerous colitis. The intestinal microbiota is the collection of microscopic organisms that they live inside our intestine, and this it carries out many important functions for the health of the host, as the absorption of nutritious, support for the immunologic system, and the ability of fighting against the causing organisms of illnesses. The factors that control the composition of the intestinal microbiota can be physiochemical, interactions host-bacteria and interactions microbe-microbe. An important physiochemical factor is the nutrients like prebiotics, that are ingredient selectively fermented that they provide specific changes, so much in the composition and/or activity in the gastrointestinal microbiota that confers benefits to the health of the host. The aim of this work is to evaluate the effect of marine algae in the modulation of the bacterial mucosa-associated microbiota, intestinal hydrolytic activity and to determine if is stimulated the immune innate response mediated by the intestinal microbiota of mice BALB/c. In this work the mice BALB/c was daily (6 weeks) for via oral with a suspension of marine algae (*Eisenea arborea*, *Sargasum horridum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunalliella tertiolecta*, *Opuntia ficus-indica*), every 2 weeks they were sacrificed and took samples of blood and Peyer's patches for analysis of cytokine expression, as well as of intestinal mucosa tissue for microbiologic and enzymatic assay. *O. ficus-indica* and *E. arborea* stimulated the growth of species of *Lactobacilli* and *Bifidobacterium*, *P. tricornutum* and *E. arborea* the growth of species of *Enterobacteria* and *O. ficus-indica* inhibited them. *E. arborea*, *S. horridum* and *P. tricornutum* stimulated the growth of species of aerobic mesófilis. Only *P. tricornutum* doesn't influence in the diversity of the microbiota. Differences were also presented in the microbial profiles depending on the alga type and in the time. Did the algae modulate the activity intestinal hidrolítica with main action in the stimulation of the activity alkaline phosphatase, β -galactosidase, esterase (C 4) and esterase lipase (C 8) and the decrease activity of β -glucosidasa, acid phosphatase, leucin arilamidase and valin arilamidasa. *E. arborea* and *P. tricornutum* presented a tendency to increase the production of IL-10 anti-inflammatory cytokine and *P. tricornutum*, *D. tertiolecta* and *O. ficus-indica* to the production of TNF- α pro-inflammatory cytokine of the innate immune system. The marine algae modulated the intestinal microbiota in enterobacteria and aerobic mesófilis counts, but they stimulated the metabolism of the lactic acid bacteria (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*).

Key words: Marine algae, prebiotics, mucosal associate microbiota, hydrolytic enzymes, cytokines, mouse.

DEDICATORIA

Dedico este logro a mis padres

Maria Eufemia Ojeda de la Rosa †

y

Miguel de Jesús Rodríguez Cortes

A mis Hermanos

Miguel Sostenes Rodríguez Ojeda

y

Mario Gildardo Rodríguez Ojeda

A mis Sobrinos

Alberto y Maria Guadalupe

Al Ángel que llevo a mi vida.

Eva Maria Reyes Flores

y a la Baja

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme estar aquí compartiendo este logro con todos mis seres queridos.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización del posgrado.

Al CIBNOR por darme la oportunidad de formarme como estudiante de excelencia.

Al Dr Felipe De Jesús Ascencio Valle (mi papi Felipe) por darme las facilidades y la oportunidad de participar en su gran grupo de investigación y confiar en mi la construcción de un pequeño ladrillo de conocimiento.

A la Dra. María Antonia Guzmán Murillo (tony) por estar al pendiente y tratar de formarnos no solo como estudiantes, si no como persona.

Al Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez † (el Doc) por su espíritu de lucha cotidiana y mas que todo por su manera de mejorar nuestras opiniones sin llegar a cambiarla, respetando nuestros puntos de vista, Gracias Doc, al cabo que mañana es dominguito.

A la Dra. Thelma Rosa Castellanos, aun que poco la conozco, ha demostrado mucho interés por los estudiantes, no solo suyos, y con una manera amigable.

A la cDra Maria de Jesús Romero Geraldo (mi mami chula), a la Dra Gracia y al Dr. Angel Campa (angelito) por sus grandes ayudas en el laboratorio.

A mis queridos compañeros del laboratorio de Patogénesis Microbiana que sin ellos no hubiera podido lograrlo, Kalin, Maria Esther, Claus, Normiux, Pepe, Flavio, Perlita, Esther (Adriana), Diana, Wences, Rosario, Sergio (Mazatleco) y Jessi gracias por su gran amistad y los quiero mucho.

A mis compañeros de Maestría por brindarme su amistad y mis Profesores por brindarme sus conocimientos sin esperar nada a cambio.

A los compañeros y técnicos de Biotoxinas, Biotecnología Marina, Genética Molecular, Biología Molecular de Plantas, Microalgas, Cepario y Bioterio por permitirme hacer mi cochinerio en sus laboratorios.

A posgrado por ayudarme en los trámites, aunque estuvieran fuera de tiempo, Dra Thelma, Osvelia, Lety, Claudia, Bety, a Horacio por su gran ayuda en el centro de cómputo.

A toda mi familia por apoyarme moralmente y económicamente, y por ser el tronco de toda mi fuerza.

Y a todos que me ayudaron de alguna manera a lograr esta etapa de mi vida, gracia.

“Es vital para una educación fecunda, que se desarrolle en el joven una capacidad de pensamiento crítico independiente. La enseñanza para los jóvenes debe ser de naturaleza tal, que lo que se ofrezca, se reciba como un don valioso... y no como un penoso deber.”

Albert Einstein.

INDICE

ACTA DE LIBERACION DE TESIS	<i>i</i>
COMITÉ TUTORIAL	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
DEDICATORIA	<i>v</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>vi</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>x</i>
LISTA DE TABLAS	<i>xiv</i>
ABREVIATURAS	<i>xv</i>
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- Microbiota Intestinal.....	1
2.- Sistema Inmune de la Mucosa.....	2
3.- Prebióticos.	3
4.- Enfermedades gastrointestinales.....	4
5.- Algas Marinas.	5
II.- ANTECEDENTES	8
III.- JUSTIFICACIÓN	10
IV.- HIPÓTESIS	11
V.- OBJETIVOS	12
1.- Objetivo General	12
2.- Objetivos Específicos	12
VI.- MATERIALES Y METODOS	13
1.- Preparación de las algas marinas.	13
2.- Análisis químico proximal de las algas marinas.....	14
3.- Diseño Experimental.....	14
4.- Análisis de comunidad microbiana mediante técnicas de cultivo.....	15
5.- Análisis de comunidad microbiana mediante la técnica de SSCP.	16
6.- PCR semi-cuantitativo de citocinas.....	19
7.- Análisis estadístico.....	21
VII.- RESULTADOS	22
1.- Cinética de crecimiento del cultivo de microalgas.....	22

2.- Análisis químico proximal de las algas marinas.....	22
3.- Análisis comunidad microbiana mediante técnicas de cultivo.....	23
4.- Análisis comunidad microbiana mediante SSCP.....	24
5.- Análisis de actividad enzimática mediante APIzym.....	37
6.- PCR semi-cuantitativo de citocinas.....	41
VIII.- DISCUSIÓN	44
IX.- CONCLUSIONES	52
X.- REFERENCIAS	53
XI.- ANEXO	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Cinética de crecimiento de las microalgas *P. tricornutum* y *D. tertiolecta* en medio F/2 a 28° C iluminadas con lámparas fluorescentes blancas en bolsas de polipropileno de 40 litros con aireación a saturación y a 3.6 % de NaCl.....**22**
- Figura 2.- Efecto de las algas en el conteo de: A).- Lactobacilos, B).- Enterobacterias y C).- Mesófilas aerobias asociados a mucosa intestinal de ratones. Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas con letras sobre las barras. EA.- *Eisenea arborea*, SH.- *Sargasum horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricornutum*, DUT.- *Dunalliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.**24**
- Figura 3.- Electroforesis en geles al 2 % de agarosa en TAE 1X de: A).- Extracción de ADN de muestras intestinales de ratón de los diferentes tratamientos; B).- Evaluación de la concentración de MgCl₂ a 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 y 2.0 mM; C).- Amplificación de las regiones variables V4 y V5 del gen ribosomal 16S de las muestras intestinales de los ratones; D).- PCR de evaluación de la T_m desde 50° hasta 60° C; E).- PCR de evaluación de la T_m desde 60° hasta 68° C.....**25**
- Figura 4.- Electroforesis de los productos amplificados por PCR de las regiones V4 y V5 del gen 16S comparando los diferentes tratamientos a las: A).- 2; B).- 4 y C).- 6 semanas de tratamiento; E1-3.- *E. arborea*, S1-3.- *S. horridum*, P1-3.- *P. tricornutum*, D1-3.- *D. tertiolecta*, N1-3.- *O. ficus-indica*. A las 2 semanas de tratamiento.**26**
- Figura 5.- Electroforesis en geles al 2 % de agarosa-TAE 1X de los productos de PCR de las bandas eluidas de los geles poli(acrilamida) de SSCP.....**26**
- Figura 6.- Numero de bandas (OTUs) obtenido de los perfiles individuales de polimorfismo conformacional de cadena sencilla de los diferentes tratamientos a las: A).- 2, B).- 4 y C.-) 6 semanas. D).- Análisis de las bandas con respecto al tiempo (semanas). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas con letras sobre las barras. EA.- *Eisenea arborea*, SH.- *Sargasum horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricornutum*, DUT.- *Dunalliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.....**27**
- Figura 7.- Índices de diversidad de Shannon-Weaver obtenidos de los perfiles individuales de polimorfismo conformacional de cadena sencilla de los diferentes tratamientos a las: A).- 2, B).- 4 y C.-) 6 semanas. D).- Análisis de los índices con respecto al tiempo (semanas). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas con letras sobre las barras. EA.- *Eisenea arborea*, SH.- *Sargasum horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricornutum*, DUT.- *Dunalliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.....**28**
- Figura 8.- Homogeneidad obtenidos de los perfiles individuales de polimorfismo conformacional de cadena sencilla de los diferentes tratamientos a las: A).- 2, B).- 4 y C.-) 6 semanas. D).- Análisis de las Homogeneidad con respecto al tiempo (semanas). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicados con letras sobre las barras. EA.- *Eisenea*

arborea, SH.- *Sargasum horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricornutum*, DUT.- *Dunalliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.....**29**

Figura 9.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de los diferentes tratamientos a las 2 semanas.....**36**

Figura 10.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de los diferentes tratamientos a las 4 semanas.....**36**

Figura 11.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de los diferentes tratamientos a las 6 semanas.....**31**

Figura 12.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos controles con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.....**31**

Figura 13.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *E. arborea* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.....**32**

Figura 14.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *S. horridum* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.....**32**

Figura 15.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *P. tricornutum* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.....**33**

Figura 16.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *D. tertiolecta* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.....**33**

Figura 17.- Dendograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *O. ficus-indica* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.....**34**

Figura 18.- Grafica de resultados del Análisis de Componentes Principales de los perfiles de polimorfismo conformacional de cadena sencilla basado en ADN bacteriano de las regiones V4 y V5 del gen 16S a las A).- 2 semanas para macroalgas, factor 1 es 27,7 % y el factor 2 es 20,9 %. Eigenvalores de 9,7 y 7,3., B).- 2 semanas para microalgas, factor 1 es 34,8 % y el factor 2 es 25,0 %. Eigenvalores de 14,6 y 10,5; C.-) 2 semanas para Nopal, factor 1 es 34,8 % y el factor 2 es 25,0 %. Eigenvalores de 14,6 y

10,5; D).- 4 semanas para macroalgas, factor 1 es 22,6 % y el factor 2 es 20,3 %. Eigenvalores de 13,4 y 12,0; E).- 4 semanas para microalgas, factor 1 es 23,6 % y el factor 2 es 20,6 %. Eigenvalores de 12,0 y 10,5; F.-) 4 semanas para Nopal 2 semanas de tratamiento, factor 1 es 23,0 % y el factor 2 es 20,1 %. Eigenvalores de 12,2 y 10,6.....**35**

Figura 19.- Árbol filogenético de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) identificados en los perfiles de polimorfismo conformacional de cadena sencilla. La escala representa distancia genética (1 sustitución por 100 nucleótidos).....**36**

Figura 20.- Actividad enzimática total intestinal a las: A).- 2, B).- 4 y C.-) 6 semanas. D).- Análisis con respecto al tiempo (semanas). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas con letras sobre las barras. EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica.....**37**

Figura 21.- Gráfica de resultados del Análisis de Componentes Principales de los perfiles enzimáticos basados en análisis con APIZYM de homogenizados de la mucosa gástrica a las: A).- 2 semanas, Factor 1.- 46,8 y Factor 2.- 15,7 y Eigenvalores de 5,2 y 1,7; B).- 4 semanas, Factor 1.- 60,8 y Factor 2.- 14,2 y Eigenvalores de 9,1 y 2,1; C.-) 6 semanas Factor 1.- 25,8 y Factor 2.- 21,1 y Eigenvalores de 3,6 y 2,9. EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica, C.- Control.....**39**

Figura 22.- Actividad enzimática por enzima en base a los resultados de ACP. 2 semanas de tratamiento. EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica, C.- Control. Los datos representan la media ($n=3$). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los grupos control y algas son indicados con letras sobre las barras.....**40**

Figura 23.- Actividad enzimática por enzima en base a los resultados de ACP. 4 semanas de tratamiento. Los datos representan la media ($n=3$). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los grupos control y algas son indicados con letras sobre las barras. EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica, C.- Control.....**40**

Figura 24.- Actividad enzimática por enzima en base a los resultados de ACP. 6 semanas de tratamiento. EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica, C.- Control. Los datos representan la media ($n=3$). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los grupos control y algas son indicados con letras sobre las barras.....**41**

Figura 25.- Análisis de integridad del ADNc mediante la expresión del gen GAPDH de muestras individuales.....**41**

Figura 26.- Determinación del número de ciclos óptimo para: A).- IL-10 y B).- TNF- α ...
42

Figura 27.- Expresión de TNF- α en tejido intestinal de ratones por tratamiento. Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicados con * sobre las barras. EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica...**43**

Figura 28.- Expresión de IL-10 en tejido intestinal de ratones por tratamiento. Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicados con * sobre las barras. + sin desviación ($n=1$). EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica.....**43**

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Descripción de los tratamientos.....	13
Tabla II.- Arreglo de los ratones por tratamiento.....	14
Tabla III.- Diluciones y condiciones de cultivo para cada medio de cultivo.....	16
Tabla IV.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de segmentos específicos de las regiones variables del gen ribosomal 16S.....	16
Tabla V.- Programa de PCR para la amplificación de regiones variables del gen 16S...	16
Tabla VI.- Preparación del monómero para el gel de poliacrilamida para SSCP.....	17
Tabla VII.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes evaluados..	20
Tabla VIII.- Resultado de los análisis químicos proximales de las algas marinas.....	23
Tabla IX.- Suministro de Biomasa y aporte energético (Kcal) de cada uno de los tratamientos.....	23
Tabla X.- Resumen de amplificación para cada citosina a partir de ADNc de pools de muestras intestinales por tratamiento; EA.- E. arborea, SH.- S. horridum, PHT.- P. tricornutum, DUT.- D. tertiolecta, NO.- O. ficus-indica, C.- Control. (+).- Presencia de amplicon específico, (-).- Ausencia de amplicon específico y (±) Baja concentración del amplicon específico.....	42

ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxiribonucleico
ANOVA	Analisis de Varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón gama
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Th1	Respuesta inmune celular
Th2	Respuesta inmune humoral
Tm	Temperatura de alineamiento
CICIMAR	Centro de Interdisciplinario de Ciencias del Mar
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ELN	Extracto Libre de Nitrógeno
ARN	Acido Ribonucleico
cDNA	ADN complementario
GAPDH	Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa
UV	Ultra Violeta
OTU	Operacional Taxonomic Unit
CP	Componente Principal
RT-PCR	Retro-trascricpción

I.- INTRODUCCION

1.- La microbiota intestinal

La microbiota intestinal es la colección de organismos microscópicos que habitan dentro de nuestro intestino, y que está conformado predominantemente por bacterias (10^{11} – 10^{12} CFU/ml) (Kleessen *et al.*, 2000) y que se estima, alberga a más de 800 especies microbianas diferentes (Backhed *et al.*, 2005). Dicha microbiota lleva a cabo muchas funciones importantes para nuestra salud, entre ellas se encuentran la absorción de nutrientes, soporte para el sistema inmunológico y la habilidad de inhibir tanto el establecimiento como el desarrollo de microorganismos causantes de enfermedades. Los mecanismos mediante los cuales se alcanza un equilibrio dinámico entre la microbiota gastrointestinal y el hospedador, comprenden tanto factores fisiológicos propios del hospedador como factores microbianos que pueden diferir en los diferentes niveles del intestino. Los factores que controlan la composición de la flora bacteriana intestinal pueden ser de tres tipos: i).- Factores fisicoquímicos como el pH, potencial de reducción-oxidación, tensión de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes; ii).- Interacciones hospedador-bacteria como son la saliva, secreciones gástricas y pancreáticas, sales biliares y el sistema inmune; iii).- Interacciones microbio-microbio como son los bacteriófagos, bacteriocinas y metabolitos tóxicos (Havenaar *et al.*, 1992).

La colonización del intestino por bacterias indígenas influye fuertemente sobre la fisiología intestinal del hospedador por modulación de genes implicados en la absorción de nutrientes, defensa de la mucosa y el metabolismo xenobiótico (Hooper *et al.*, 2001; Wehkamp *et al.*, 2005). Esta microbiota gastrointestinal puede dividirse en dos tipos, la planctónica, que vive en el lumen del intestino y la asociada a la mucosa. La microbiota planctónica juega un papel importante en la digestión de los alimentos a través de la fermentación, síntesis de vitaminas y metabolismo de xenobióticos (Rowland *et al.*, 1995; Houghton *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2001; Macfarlane *et al.*, 2002). La microbiota asociada a la mucosa ayuda a la integridad del epitelio ya que ayuda a excluir patógenos, estimular el desarrollo del sistema inmune y moderar las respuestas inflamatorias (Gibson *et al.*, 1994; Schultsz *et al.*, 1999; Pathmakanthan *et al.*, 1999; Swidsinski *et al.*, 2002). Tanto la composición de la microbiota planctónica

como la asociada a la mucosa puede ser afectada por la dieta y sustancias que no son digeridas por el hospedador y sí por la microbiota (prebióticos), estas sustancias pueden ser purificados e incluidos como un ingrediente en los alimentos produciendo la modulación de la microbiota intestinal (Stephen *et al.*, 1980; Hooper *et al.*, 2002; Macfarlane *et al.*, 2002; Langlands *et al.*, 2004; Tannock *et al.*, 2004). Además, la adherencia de bacterias ácido lácticas a células del epitelio o a la mucosa intestinal juega un papel importante en el establecimiento de estas (Salminen *et al.*, 1996; Felley *et al.*, 2003; Rinkinen *et al.*, 2003) y los prebióticos juegan un papel importante en la adherencia (Topping *et al.*, 2003, Brink *et al.*, 2005).

2.- El sistema inmune de la mucosa intestinal

El epitelio intestinal participa en la respuesta inmune local a través de una diversidad de funciones constitutivas e inducibles del sistema inmune innato. Además, las células del epitelio intestinal pueden participar en los eventos iniciales de la respuesta inmune adaptativa, como la presentación del antígeno (Hershberg *et al.*, 2000). Las células del epitelio intestinal modulan la respuesta inmune innata y adaptativa de la mucosa a través de productos secretorios que promueven la activación o inhibición de las células inmunes específicas. Las bacterias ácido lácticas (BAL) tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son componentes principales de la microbiota intestinal normal en humanos y animales. Estas bacterias actúan como inmunomoduladores participando en la generación y mantenimiento de al menos tres actividades importantes del sistema inmune de la mucosa: i) acción antimicrobiana y proinflamatoria mediada por citocinas Th1, como son la IL-12, TNF- α e INF- γ ; ii) actividades antiinflamatorias y tolerancia oral, inducida y mantenida mediante citocinas tipo Th2, principalmente IL-10 y TGF- β ; iii) estimulando la respuesta inmune adaptativa incluyendo la síntesis local y sistémica de IgG e IgA siendo esto debido principalmente a IL-4 e IL-5 (Brandtzaeg 2002).

3.- Prebióticos.

Los prebióticos son ingredientes selectivamente fermentados que proporcionan cambios específicos tanto en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal y que le confieren beneficios a la salud del hospedador (Roberfroid

2007). Los prebióticos afectan de manera benéfica muchos procesos del hospedador, como son la absorción de minerales (Abrams *et al.*, 2005), la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), la estimulación específica del crecimiento de grupos de poblaciones microbianas endógenas tales como bifidobacterias y lactobacilos, los cuales son considerados benéficos para la salud humana (Gibson and Roberfroid 1995; Kleessen *et al.*, 2001; Blaut, 2002), el metabolismo de lípidos y un efecto preventivo contra el cáncer de colon (Van Loo *et al.*, 1999).

Los prebióticos son oligosacáridos y polisacáridos no digeribles entre los que se observa una gran variedad de estructuras debido a sus diferentes monómeros (monosacáridos) y tipos de enlaces que los unen (α , β y carbonos participantes), todas estas diferencias hacen que los prebióticos tengan influencia sobre diferentes tipos de microorganismos, así cada tipo de microorganismos serán estimulados selectivamente en el intestino (Licht *et al* 2006).

El estudio de los polisacáridos representa una nueva frontera en la elucidación de procesos biológicos fundamentales y en la identificación de nuevas sustancias de interés farmacéutico (Jelinek y Kolusheva, 2004). Además de los polisacáridos de reserva como el almidón y glucógeno y estructurales como la celulosa y quitina, existen otra clase de polisacáridos del tipo sulfatados, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos polisacáridos sulfatados poseen una variedad de funciones biológicas (Toida *et al.*, 2003). Los polisacáridos sulfatados son polímeros de que contienen en su estructura azúcares esterificados con grupos sulfatos. Estos se encuentran principalmente en algas, animales y bacterias (Shanmugam y Mody, 2000; Giroldo y Vieira, 2002). Los animales sintetizan glucosaminoglicanos (mucopolisacáridos) constituidos por aminoácidos unidos a azúcares y ácidos urónicos (Figura 2). Entre ellos se encuentran la heparina, condroitin sulfato, keratan sulfato y hialuronan sulfato (Yalpani, 1988; Toida *et al.*, 2003). En las bacterias, la variedad estructural de los polisacáridos sulfatados y sus propiedades es muy amplia y generalmente, se encuentran involucrados en los procesos de adhesión celular (Yalpani, 1988). En las algas marinas, la estructura primaria de los polisacáridos sulfatados varía

ampliamente en composición, secuencia monomérica, peso molecular, configuración anomérica, posición del enlace glucosídico y densidad de cargas. Estas variaciones estructurales dependen del tipo de alga que los produce y de la manera en que ellas responden al medio ambiente o a las condiciones de cultivo en laboratorio (Yalpani, 1988).

4.- Enfermedades gastrointestinales.

La actividad de la comunidad microbiana intestinal juega un papel importante en el mantenimiento de la salud y etiología de las enfermedades intestinales en humanos. Se ha estimado que menos del 25% de las enfermedades intestinales tiene una base genética obvia, sugiriendo que la nutrición juega un papel mayor y por lo cual se piensa que es mediada por muchas vías por el efecto en la microbiota intestinal. La incidencia de las infecciones gastrointestinales agudas es muy variable y estas pueden estar causadas por una gran variedad de patógenos bacterianos, víricos o protozoarios. Su significación clínica varía desde trastornos funcionales relativamente leves, poco molestos y autolimitados, hasta convertirse en un proceso potencialmente grave, en relación con cuadros de deshidratación y desnutrición severos e importantes desequilibrios hidroelectrolíticos que pueden tener un curso fulminante y poner en peligro la vida del enfermo (Gill *et al.*, 2002).

Las enfermedades intestinales bacterianas son causa importante de morbilidad y mortalidad mundial. Uno de cada cinco adultos en países industrializados las sufren y los infantes al menos 5 veces la padecen en los primeros 2 años de vida. Las diarreas causadas por bacterias son las que potencialmente suponen un mayor riesgo vital para el paciente. Existen múltiples tipos de patógenos entéricos bacterianos invasivos (*Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* spp., *Campylobacter*, *Vibrio* spp. y *Escherichia coli* invasiva) y no invasivos (*E. coli* enterotoxigenica, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* y *Enterobacter*) (Edgeworth 2005). La gastroenteritis viral aguda es más frecuente y más peligrosa en niños pequeños que en adultos. Los virus asociados con gastroenteritis representan un gran número de grupos taxonómicos, aunque la mayor parte de los casos en todo el mundo están producidos por Rotavirus, virus de Norwalk y pequeños virus redondos afines. (Denis *et al.*, 1998). Las infecciones parasitarias en el

ser humano constituyen un importante problema sanitario causando aproximadamente el 10% de las diarreas, variando su clínica de cuadros asintomáticos a casos graves que en raras ocasiones causan la muerte. Destacan las infestaciones por protozoos (*Entamoeba histolytica*, *dispar*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, y *Blastocystis hominis*) y los gusanos o helmintos (*Oxyuros* y *Ascaris*) y los platelmintos (*Hymenolepsis*, *Tenias* y *Echinococcus*) (Cox, 2002).

Por todo esto, la manipulación de la microflora del hospedador ha representado una nueva posibilidad en la prevención o manejo de los desórdenes fisiológicos gastrointestinales (Fuller, 1992; Donohue *et al.*, 1996; Saxelin *et al.*, 1996).

5.- Algas marinas

El uso de algas marinas como alimento humano y como fertilizante en agricultura data de muchos siglos atrás. Las algas han sido explotadas desde hace ya más de un siglo como fuente de coloides que son utilizados exitosamente y con un amplio espectro de posibilidades como espesantes, gelificantes y estabilizantes en la industria alimentaria. Sin embargo, es desde hace aproximadamente 40 años que las algas marinas han sido reconocidas como fuentes potenciales de sustancias en biomedicina, así como en la biorremediación y como productoras de metabolitos como vitaminas, enzimas, ácidos grasos poliinsaturados y otros más. (De la Noue y de Paw, 1988; Arredondo-Vega y Vazquez-Duhalt, 1991).

Las algas son un grupo muy grande, que constituye de veinticinco a treinta mil especies, son seres eucariotas que contienen clorofila y que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica y están presentes en ambientes marinos, dulceacuícolas y terrestres. Aunque la mayoría de las algas son microscópicas, algunas formas marinas crecen hasta unos 30 metros de largo, sin un sistema vascular ni raíces y cuentan con estructuras reproductoras simples. Las algas son o bien unicelulares o coloniales, estas últimas, formando agregados celulares. Cuando las células están una al lado de la otra, se dice que son filamentosas. La mayoría de las algas contienen clorofila y son de color verde, sin embargo algunas de ellas aparecen de color rojo o marrón, por que poseen otros pigmentos, como pueden ser carotenoides que enmascaran la clorofila. Las algas

muestran una considerable diversidad en estructura y química de sus paredes celulares. En muchos casos la pared celular esta compuesta de fibrillas de celulosa, modificada por la adición de otros polisacáridos, tales como pectina (ácido poligalacturónico altamente hidratado y con pequeñas cantidades de rhamnosa), xilanos, mananos, ácidos algínicos y ácido fucínico. También en algunas algas está presente la quitina, un polímero de N-acetilglucosamina. Otras presentan en su pared celular sílice el cual está en complejo con proteínas y polisacáridos, estas son las diatomeas (Madigan, 1999).

Las algas marinas contienen grandes cantidades de polisacáridos, los cuales son importantes constituyentes de la pared celular, son extraídos por la industria de hidrocoloides: alginato de las algas pardas, carragenanos y agar de las algas rojas. También se encuentran otros polisacáridos en la pared celular, como es el fucoídano (algas pardas), xilanos (algas rojas y verdes), ulvanos (algas verdes). Las algas marinas también contienen polisacáridos de almacenamiento, notablemente el laminaran (β -1,3 - el glucan) en las algas pardas y floridean almidone (el amylopectin - como el glucan) en las algas marinas rojas. Cuando se enfrentan con las enzimas intestinales humanas, la mayoría de estos polisacáridos (agar, carragenanos, ulvanos y fucoídanos), no se digieren y por consiguiente puede considerarse como fibras dietéticas (Lahaye *et al* 1991). Las fibras solubles e insolubles han sido asociadas con efectos fisiológicos diferentes, muchos polisacáridos solubles viscosos (pectina, goma guar, etc.) se han puesto en correlación con el hipocolesterolemia y la hipoglucemia, los polisacáridos insolubles (celulosa) están principalmente asociados con una disminución en el tiempo de tránsito del tracto digestivo (Southgate, 1990).

Otros polisacáridos que se han estudiado son los fucoídanos que han mostrado actividades biológicas interesantes (anti-trombótico, anti-coagulante, anticancerígeno, anti-proliferativos, anti-viral, y anti-complementario, antiinflamatorio). Estas propiedades abren un amplio campo de aplicaciones de las algas como terapéuticos potenciales, algunos de las cuales ya son asunto de patentes (Charreau *et al.* 1995, Nasu *et al.* 1997, Angstwurm *et al.* 1997). En lo que concierne a los xilanos y laminaranos, son rápidamente y completamente degradados por las bacterias intestinales, los

alginatos son parcialmente degradados y estimulan una substancial producción de ácidos grasos cadena corta.

Como se ha visto, las investigaciones científicas y el desarrollo tecnológico sobre el uso farmacológico de las algas en el mundo van en ascenso. No sólo se identifican especies algales con propiedades farmacológicas, sino que se tienen caracterizados una gran cantidad de compuestos, que inclusive se pueden llegar a sintetizar en el laboratorio.

II.- ANTECEDENTES

Actualmente se sabe que la microbiota intestinal puede modularse con la dieta y con la adición de prebióticos y además, esta modulación puede variar dependiendo de la composición y estructura de los prebióticos (Licht *et al* 2006). Los prebióticos han demostrado su aplicación en la disminución de la colitis en ratas, además que se demostró que su efecto está relacionado con la disminución de citocinas proinflamatorias, cambios en la microbiota intestinal y particularmente con las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Hoentjen *et al.*, 2005). Por otro lado la inulina del nopal ha sido probada en la prevención de la inflamación de la mucosa en animales y pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal con buenos resultados (Guarner *et al.*, 2007). Actualmente las fuentes tradicionales de prebióticos incluyen la soya, fuentes de inulina (como la alcachofa y raíz de la achicoria), avena integral, trigo integral, cebada integral, agave, dasyliirion (Sotol), nopal y el yacón. (López *et al.*, 2007; Guarner *et al.*, 2007). Se cree que algunos oligosacáridos que naturalmente se encuentran en la leche materna juegan un papel importante en el desarrollo del sistema inmunológico en los infantes, pero éstos no son considerados prebióticos, ya que no actúan a través de la microbiota. Por lo cual los prebióticos se agregan cada vez más a los alimentos para beneficios en la salud. Algunos oligosacáridos que se usan de esta manera son los fructooligosacáridos (FOS), xylooligosacáridos (XOS), polidextrosa y galactooligosacáridos (GOS) (Sako *et al.*, 1999; Van Loo *et al.*, 1999).

Las algas marinas tienen un gran potencial en la producción de servicios y metabolitos de interés industrial, así como nutricionales y en la salud. Se ha demostrado en análisis *in vivo*, que la harina fabricada a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* tiene un efecto inhibitorio en el grado de infección que produce el patógeno gastrointestinal *Helicobacter pylori* cuando ratones BALB/c son infectados con este patógeno (Wang *et al* 2000). Además productos de microalgas marinas como los polisacáridos sulfatados, han dado resultados prometedores mostrando un efecto anti-adhesivo contra patógenos gastrointestinales, como son *H. pylori* en humanos y algunas especies de vibrios en peces (Guzmán-Murillo y Ascencio, 2000). Los oligosacáridos obtenidos de algas marinas tienen un gran potencial en la inhibición de patógenos

gastrointestinales, además que posiblemente también tengan un efecto en la microbiota intestinal de mamíferos, ya que ciertos galactooligosacáridos prebióticos han mostrado actividad anti-adhesiva sobre *E. coli* enteropatógena cuando fueron analizadas *in vitro* con líneas celulares de epitelio humano (Shoaf *et al* 2006). La adición de algas marinas productora de polisacáridos sulfatados han tenido efecto inhibitorio de la adhesión de patógenos gastrointestinales y que son potencialmente fermentables por la microbiota intestinal autóctona, ya que la estructura de estos polisacáridos son poco hidrolizables por las enzimas gástricas de mamíferos, podrían ser un buen candidato en la prevención de patologías gástricas mediante la modulación del sistema inmune de la mucosa mediado por la microbiota intestinal.

III.- JUSTIFICACION

La incidencia de las infecciones gastrointestinales agudas es muy variable y pueden estar causadas por una gran variedad de patógenos bacterianos, víricos o protozoarios. La atención hacia la microbiota intestinal autóctona enfocada al mantenimiento de la misma, es parte de las recientes tendencias enfocadas al bienestar general y las condiciones saludables de vida, en las que la alimentación sana y bien equilibrada ocupa un lugar central. Por lo cual la atención a la modificación de la composición de la microbiota intestinal benéfica por medio de suplementos alimenticios actualmente es una de los desarrollos científicos que han dado resultados en promover la salud (Gibson *et al* 1995; Goldin 1992; Roberfroid *et al* 1998). La comparación de métodos basados en cultivo y métodos moleculares han revelado que solo del 20–50% de los microbiota intestinal puede ser detectada por métodos de cultivo (Wilson *et al.*, 1996; Suau *et al.*, 1999). Por lo tanto, métodos moleculares para el estudio de las complejas comunidades microbianas han sido empleados, muchos de los cuales utilizan la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de genes del ARN ribosomal 16S del ADN microbiano extraído (Tannock, 2001; Zoetendal *et al.*, 2004). La mayoría de los fármacos que el hombre usa actualmente tienen su origen en la naturaleza, siendo las plantas terrestres la principal fuente de estos productos. Aunque aproximadamente el 70% de nuestro planeta está cubierto por los océanos, los organismos marinos permanecen todavía inexplorados como fuentes potenciales de nuevos fármacos y los pocos estudios que se han realizado al respecto han estado enfocados a organismos animales, olvidando a las algas pese a su gran diversidad y abundancia (Yalpani, 1988).

HIPOTESIS DE TRABAJO

Las dietas suplementadas con algas marinas tendrán un efecto en la microbiota intestinal bacteriana asociada a mucosa y en la actividad hidrolítica de la misma, así como en la expresión de citocinas del sistema inmune inespecífico intestinal y sistémico mediado por la microbiota intestinal en ratones BALB/c.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de algas marinas, suministradas como suplemento en la dieta, sobre la microbiota intestinal bacteriana, la actividad hidrolítica y así como en el sistema inmune local mediado por la microbiota y a nivel sistémico en células mononucleares sanguíneas de ratones BALB/c

OBJETIVOS PARTICULARES

Medir el efecto de cuatro algas marinas, *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Eisenia arborea* y *Sargassum horridum*, sobre:

1. La microbiota intestinal bacteriana asociada a mucosa mediante el análisis de los perfiles microbianos mediante la técnica de SSCP y técnicas dependientes de cultivo.
2. La actividad hidrolítica presente en la mucosa del intestino delgado.
3. La expresión de citocinas en la mucosa intestinal y placas de Peyer, y en células mononucleares sanguíneas mediante la técnica de PCR semicuantitativo.

4. MATERIALES Y METODOS

1.- Preparación de las algas marinas

En este trabajo se utilizaron 2 microalgas, 2 macroalgas y una planta terrestre.

Tabla I.- Descripción de los tratamientos

<i>Eisenea arborea</i>	Macroalga	EA
<i>Sargasum horridum</i>	Macroalga	SH
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Microalga	PHT
<i>Dunalliella tertiolecta</i>	Microalga	DUT
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Nopal	NO
Buffer bicarbonato pH 6.36	Control	C

Microalgas: Las microalgas fueron obtenidas del cepario del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Se realizó un cultivo de microalgas en medio F/2 (Guillard Ryther, 1962) en matraces Erlenmeyer de 1 L, iluminadas con lámparas fluorescentes blancas y aireación a saturación. En la fase exponencial los cultivos se escalaron a bolsas de polipropileno de 40 L y se mantuvieron en las mismas condiciones hasta la fase estacionaria (10-11 días). Las células se cosecharon mediante centrifugación en flujo continuo. El paquete celular fue liofilizado (Virtis) y almacenado a -20° C en porciones de 100 mg.

Macroalgas: Macroalgas colectadas en las costas de Baja California Sur, *Eisenea arborea* de Punta Eugenia y *Sargasum horridum* de San Juan De La Costa fueron donadas por el Doctor Iván Murillo del CICIMAR. Las macroalgas fueron secadas al sol y pulverizadas mediante un molino y almacenadas a -20° C en porciones de 100 mg.

Nopal: Como control comercial se utilizó Nopal, *Opuntia Picus-indica*, liofilizado. Las tabletas fueron maceradas en mortero y almacenadas a -20° C en porciones de 100 mg.

2.- Análisis químico proximal de las algas marinas

Los análisis químicos proximales de las algas marinas se realizaron en el laboratorio de análisis químico proximal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC. 1996. Las variables analizadas fueron:

Humedad:	Determinación por diferencia de peso a 70° C/ 24 hrs.
Proteína:	Método de microkjeldahl (% N x 6.25).
Extracto Etéreo:	Método Soxtec-Avanti, TECATOR .
Fibra Cruda:	Método de hidrólisis sucesiva (ácido / base).
Cenizas:	Determinación de diferencia de peso. Calcinación 500° C/24 hrs.
E.L.N.:	Calculado por diferencia: 100 - (% Proteínas + % Lípidos + % F. Cruda, + % Cenizas).
Energía:	Determinación por calorimetría.

3.- Diseño Experimental:

54 ratones, cepa BALB/c, de 4 semanas de edad con peso promedio de 12 g, fueron separados en 6 grupos de 9 organismos cada uno; los cuales se dividieron por sexo (Tabla II).

Tabla II.- Arreglo de los ratones por tratamiento.

	EA	SH	PHT	DUT	NO	C
Hembras	6	6	6	6	6	6
Machos	3	3	3	3	3	3

Los ratones fueron alimentados con alimento autoclaveable para roedor NIH-31 (Ristmar) *ad libitum*, el agua fue acidificada con HCl a un pH de 3.0 para prevenir el crecimiento de bacterias, la temperatura fue mantenida a 20° C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

A cada ratón se le suministró diariamente durante 6 semanas por vía intragástrica, 10 mg de cada alga (resuspendida en 100 µL de buffer de bicarbonatos pH 6.36) de su respectivo tratamiento con jeringa con aguja de alimentación forzada.

Toma de muestra: Se tomaron 3 ratones de cada tratamiento (2 hembras y 1 macho) cada 2 semanas a las 2, 4, y 6 semanas, para los respectivos análisis.

Sangre: Los ratones fueron anestesiados con éter, se tomó sangre por punción cardiaca con jeringa conteniendo anticoagulante para evitar coagulación, posteriormente se separaron las células mononucleares sanguíneas mediante centrifugación con HISTOPAQUE®-1083, y las células fueron resuspendidas en RNeasy lysis buffer (Qiagen) y fueron congelados a -70° C para su posterior extracción de ARN (ácido ribonucleico) con el reactivo RNeasy spin column (Qiagen).

Intestino delgado. Las placas de Peyer presentes en el intestino delgado fueron separadas, almacenadas en RNeasy lysis buffer (Qiagen) y congeladas a -70°C para la posterior extracción del ARN con el reactivo RNeasy spin column (Qiagen). El resto del intestino delgado fue separado, lavado con PBS estéril y posteriormente homogenizado en 500 µL de buffer HEPES-Hanks (8 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.185 g CaCl₂·2H₂O, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.05g Na₂PO₄, 0.35 g NaHPO₄, 2.6 g HEPES) para disolver la mucosa gástrica y poder obtener los microorganismos asociados a la mucosa. Se destinaron 100 µL para los análisis microbiológicos, 200 µL para análisis de actividad hidrolítica intestinal y el resto para la extracción de ADN (ácido deoxirribonucleico) de las bacterias asociadas a mucosa para el análisis de la microbiota mediante SSCP.

4.- Análisis de comunidad microbiana mediante técnicas de cultivo

Se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶ de las muestras intestinales y estas fueron sembradas en placas con agar Rogosa (Difco), MacConkey (DB Bioxon) y Agar para Métodos Estándar (Difco). Las placas fueron incubadas de acuerdo con las condiciones específicas descritas para cada medio.

Tabla III.- Diluciones y condiciones de cultivo para cada medio de cultivo.

Medio	-3	-4	-5	-6	Selectivo	Condiciones	O ₂
McConkey			x	x	Enterobacterias	37°C	Si
AME			x	x	Coliformes totales	37°C	Si
Rogosa	x	x			Lactobacilos	37°C	No

5.- Análisis de comunidad microbiana mediante la técnica de SSCP.

Amplificación por PCR: La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) siguiendo la metodología del fabricante. Mediante PCR se amplificaron segmentos de las regiones variables del gen 16S, utilizando oligonucleótidos reportados para análisis de poblaciones bacterianas (Tabla IV). Cada reacción contenía 100 ng de ADN, 0,5 µM de cada oligonucleótido, 5µL de 10X buffer PCR, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq polimerasa (ROCHE) y agua mili-Q estéril para tener un volumen final de 50µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GenAmp PCR System 27000 (Applied Biosystem), con el programa citado en la tabla 3.

Tabla IV.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de segmentos específicos de las regiones variables del gen ribosomal 16S (Tebbe *et al.*, 2001).

Oligonucleótidos	Secuencia	Región	Tamaño del Producto
COM1F	5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3'	V4 y V5	407 pb
COM2R	5' CCG TCA ATT CCT TGG AGT TT 3' *		

* Oligonucleótido fosforilado

Tabla V.- Programa de PCR para la amplificación de regiones variables del gen 16S (Tebbe *et al.*, 2001).

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	5	1
94	1	
63	1	35
72	1,5	
72	5	1

Los productos de PCR obtenidos, se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR safe (Molecular Probes, Inc) y buffer TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). De cada reacción se tomó 5 μ L y se mezclaron con 1 μ L de Loading Buffer. Como estándar se usaron 2 μ L de marcador 1Kb DNA Ladder (INVITROGEN). La electroforesis se corrió a 70 V durante 60 min. Los geles fueron visualizados bajo luz UV y documentados en un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc)

Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla: Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit PCR Purification Kit (QIAGEN). Los productos purificados fueron tratados con lambda exonucleasa (BioLabs) para eliminar la hebra conteniendo al primer fosforilado: la reacción contenía 2.5 μ g del producto de PCR, 2,5 U de Lambda exonucleasa y 4 μ L de buffer 10X y 11 μ L de agua mili-Q para tener un volumen final de 16 μ L. Los tubos conteniendo la mezcla de reacción se agitaron en vortex por 10 s y se incubaron a 37° C por 45 min más. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo la purificación del ADN de cadena sencilla mediante el kit de purificación MINIELUTE (QIAGEN). El ADN de cadena sencilla fue mezclado con un volumen igual de solución desnaturalizante (formamida 95%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol 0,25 %, cianol-xileno 0,25 %) (Tebbe *et al.*, 2001). Las muestras fueron desnaturalizadas a 95° C por 2 min y posteriormente se transfirieron a un baño con hielo por 5 minutos antes de ser cargadas en geles de acrilamida.

Tabla VI.- Preparación del monómero para el gel de acrilamida para SSCP.

Reactivo	Volumen (mL)
MDE	7,8
TBE 10X	2,5
Persulfato de amonio 10%	0,025
TEMED	0,01
H ₂ O mili-Q	14,7

La electroforesis se llevó a cabo en un sistema PROTEAN II Xi Cell (BIO RAD) conectado a un enfriador (VWR-Scientific, Modelo 1166) que contiene como anticongelante etilenglicol para mantener frío el buffer TBE 1X (TBE 10X; Tris base 108 g, ácido bórico 55 g y 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8) de la cámara. La electroforesis se ajustó al tiempo y voltaje que proporcionó la mejor resolución de las bandas y fue de

300 V por 15 h a 18° C. Al término del programa de corrida los geles fueron visualizados mediante tinción con plata.

Tinción de geles de SSCP con plata: Los geles fueron fijados con solución fijadora (ácido acético al 10 %) por 30 min y 3 lavados durante 5 min cada uno con agua mili-Q. Posteriormente, los geles se sumergieron en la solución de teñido (AgNO_3 0.1 %, formaldehído 0.05 %) por 30 min y se lavaron con agua mili-Q por 2 min. Las bandas fueron visualizadas en solución de revelado (Na_2CO_3 2.3 %, formaldehído 0,075 %, NaS_2O_4 0,002 %) hasta tener la mejor resolución (+/- 4 min) y se realizó un último lavado por 30 min en agua mili-Q. Finalmente, los geles se secaron en horno a 45° C por 2 h. Los geles fueron documentados en un scanner Power Look 2100XL (UMAX) en formato TIFF con una resolución de 300 dpi necesarios para el análisis de datos con el software GelCompare II (Applied. Maths. Inc.).

Elusión y reamplificación de bandas seleccionadas: Las bandas fueron cortadas con bisturí y separadas del gel de acrilamida, para extraer el ADN, mediante el método “Crush and Soak (Sambrook *et al.*, 1989). Cada fragmento de gel, se colocó en un tubo y se hidrató por un minuto en agua mili-Q estéril descartando al final el agua. Se adicionó a las bandas 50 μL de solución de elusión (acetato de amonio 0.5 M, acetato de magnesio 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0 y SDS 0.1 %) fragmentando la acrilamida con una punta de micropipeta estéril. Los tubos se incubaron por 3 h a 37° C, se centrifugaron a 12,000 g por 1 min a temperatura ambiente y a partir de este, 40 μL del sobrenadante fueron transferidos a un tubo nuevo. A este tubo, se le adicionó 2 volúmenes de alcohol etílico absoluto para precipitar el ADN y se centrifugó a 12,000 g, por 30 min y a 4° C, para finalmente eliminar el sobrenadante y secar al vacío por 5 min a 30° C. El pellet se resuspendió en 10 μL de Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) y este fue utilizado como templado para re-amplificar dichos fragmentos, utilizando los mismos oligonucleótidos y programas citados anteriormente (Schwieger y Tebbe, 2000). Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2% en TAE teñidos con SYBRsafe y fueron posteriormente secuenciados por el método de Sanger (Sambrook *et al.*, 1989) en un equipo ABI3730XL por la empresa MACROGEN (<http://www.macrogen.com>).

6.- PCR semi-cuantitativo de citocinas.

Extracción de ARN: Las muestras de intestino almacenadas a -70°C en RNAlater fueron centrifugadas a 12,000 g por 5 min y se eliminó de las mismas, el RNAlater. El ARN se extrajo con el Kit comercial FastRNA Pro Green (MP Biomedicals, LLC). El ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (BIO RAD) a 260 y 280 nm de absorbancia y se visualizó en geles de agarosa al 1 % en TBE teñidos con SYBR safe, y fueron fotodocumentados. El ARN fue tratado con DNAsa, deoxiribonucleasa I (INVITROGEN), por cada μg de ARN se adicionó 1 μL de buffer 10X, 1 U de DNAsa y se llevó la reacción a 10 μL con agua-DEPC. El ARN se incubó a 25°C por 15 min para posteriormente inactivar la enzima con 1 μL de EDTA 25 mM, calentándola a 65°C por 10 min. Posteriormente se purificó el ARN con el método de precipitación con cloruro de litio, el cual consistió en adicionar 1 μL de LiCl 4 M y 30 μL de etanol absoluto incubando a -70°C toda la noche. Para recuperar el pellet, se centrifugó a 12,000 g por 30 min a 4°C , se hizo un lavado con etanol al 70 % y se secó en centrifuga al vacío por 5 min. El ARN se resuspendió en 12 μL de agua-DEPC. Se cuantificó el ARN en espectrofotómetro.

Síntesis de cDNA: La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante ImProm-II™ Reverse Transcription System, donde se tomaron 5 μL de RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se le adiciono 1 μL de primer Oligo (dT)₁₅ y se incubó por 5 min a 70°C y se enfrió en hielo. Por otra parte se preparó la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA que consistió en; 4 μL de Buffer ImProm-II 5X, 2.4 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de dNTPs 10 mM, 0.5 μL de RNasin® inhibidor de Ribonucleasas, 1 μL ImProm-II Transcriptasa Reversa (PROMEGA) y la reacción se aforó a 14 μL con agua-DEPC. A cada tubo con ARN y Primer Oligo (dT)₁₅ se le adicionó 14 μL de esta mezcla y se incubo a 25°C por 10 min (alineación de Oligo (dT)₁₅). Para la síntesis del cDNA se incubó a 45°C por 60 min y posteriormente se inactivó la enzima a 70°C por 15 min y se almacenaron a -20°C . La integridad del cDNA sintetizado fue evaluada mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla VII.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes evaluados.

Oligonucleótidos	Secuencia	T _m (° C)	Tamaño del Producto
GAPDHF	5' GCT GGA TCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC 3'	67	900 pb
GAPDHR	5' CGA GAA TTC ATA CCA GGA AAT GAG C 3'		
IL-1 alfa F	5' TCG TCT TCA TTT TGA GCA CTC 3'	62	599 pb
IL-1 alfa R	5' TGG CCA AAG TCC CTG ACC T 3'		
IL-4 F	5' ATG GGT CTC AAC CCC CAG TAG T 3'	64	398 pb
IL-4 R	5' GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC 3'		
IL-6 F	5' CCA GCT ACT TCA TCC GAA TA 3'	59	628 pb
IL-6 R	5' GAA CTC CCG CTT CAC AAG 3'		
IL-8 F	5' TTC ACA GCA CTC GGA ATC CT 3'	62	643 pb
IL-8 R	5' ATG ACT TCC AAA CTG GCT GTT 3'		
IL-10 F	5' CTG GAA GAC CAA GGT GTC TAC 3'	60	600 pb
IL-10 R	5' GAG CTG CTG CAG GAA TGA TGA 3'		
TNF-alfa F	5' TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC 3'	78	353 pb
TNF-alfa R	5' GTA TGA GAT AGCA AAT CGGC TGA CCGT GTG GG 3'		
INF-gama F	5' TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC 3'	80	364 pb
INF-gama R	5' TGG ACC TGT GGGT TGT T GAC CTC AAA CTT GGC 3'		

Además de analizar la integridad del cDNA, se determinó el número óptimo de ciclos para la PCR donde se evaluaron los ciclos 20, 25, 27, 28, 30 y 35, esto para encontrar la amplificación exponencial y normalizarlos respecto al gen constitutivo, además se evaluó la T_m para cada gen y poder ser utilizada junto con el gen constitutivo.

PCR de las citocinas: El PCR de las citocinas se llevó a cabo de acuerdo con el número de ciclos óptimo, evaluado en el punto anterior, con una T_m ajustada a 58 °C, quedando el programa de la siguiente manera. Desnaturalización previa a 94° C por 3 min, iniciando el ciclo en la desnaturalización a 94° C por 1 min, alineamiento a 58° C por 1 min, extensión a 72 min por 1 min, esto repetido 28 veces y una extensión final a 72° C por 5 min y un paso final de 4° C por 5 min. Terminado el programa las muestras fueron almacenadas a 4° C (refrigeración) hasta la realización de la electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

Electroforesis de productos de PCR de las citocinas: La electroforesis para la lectura de los productos de PCR se llevó a cabo como anteriormente se mencionó pero analizando todas las muestras en el mismo gel y ajustando en cada línea tanto el gen

constitutivo como el evaluado (citocinas). La electroforesis se corrió a 70V durante 60 min. Los resultados fueron visualizados bajo luz UV y documentados en un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc), capturando la imagen en formato TIFF para su análisis con el programa Kodak Digital Science 1D Software.

Análisis de actividad enzimática mediante APIzym: La actividad enzimática intestinal fue evaluada mediante el sistema API ZYM, el cual es un micrométodo semicuantitativo que permite estudiar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas de pequeñas muestras. Las muestras obtenidas del intestino fueron homogenizadas en buffer HEPES-Hanks y se preparó una dilución de 1:40 en H₂O mili-Q como recomienda el kit. Se colocaron 65 µl de la muestra en cada pozo de la galería (las galerías contienen pozos para adicionar agua que mantienen las condiciones húmedas para evitar la deshidratación de los mismos), se incubaron por 4 h a 37° C, al término de la incubación se adicionan los reactivos ZYM A y B incluidos en el análisis, se dejó que se desarrollara el color durante 5 min como mínimo. Posteriormente se irradió la galería con luz solar por un tiempo prolongado y se efectuó la lectura. El valor de 0 corresponde a una reacción negativa, el valor de 5 a una reacción de intensidad de color, las reacciones intermedias se anotan como 1, 2, 3 ó 4 según su intensidad (3, 4, y 5 siendo consideradas como positivas). Para poder hacer un análisis más detallado los colores fueron leídos en un lector de placas 3550-UV (BIORAD) de acuerdo al color de cada reacción.

7.- Análisis estadístico.

Todos los datos fueron analizados para distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos obtenidos en cada caso se analizaron con una prueba de homogeneidad y normalidad de datos y fueron analizados por ANOVA de una vía. Para los datos no paramétricos se utilizó la prueba de Mann-Whitney U para comparar entre tratamientos. Una $P \leq 0.05$ fue tomada como indicativa de significancia estadística. La comparación de múltiples medias se realizó por medio de la prueba de SHD Tukey, utilizando el software Statistica 6.1 y SPSS 15.0 para Windows.

RESULTADOS

1.- Cinética de crecimiento del cultivo de microalgas: Se contruyó la curva que representa la cinética de crecimiento de las microalgas *P. tricornutum* y *D. tertiolecta* (Figura 1) obteniendo una velocidad de crecimiento (μ) de 1,07 y 1,34 respectivamente, con constantes de crecimiento (k) para un cultivo cerrado (divisiones por hora) de 1,55 y 1,94 y con tiempos de generación (tiempo en el cual la población se duplica) de 0,64 y 0,51, la biomasa recuperada fue de 0,283 y 0,268 g/L.

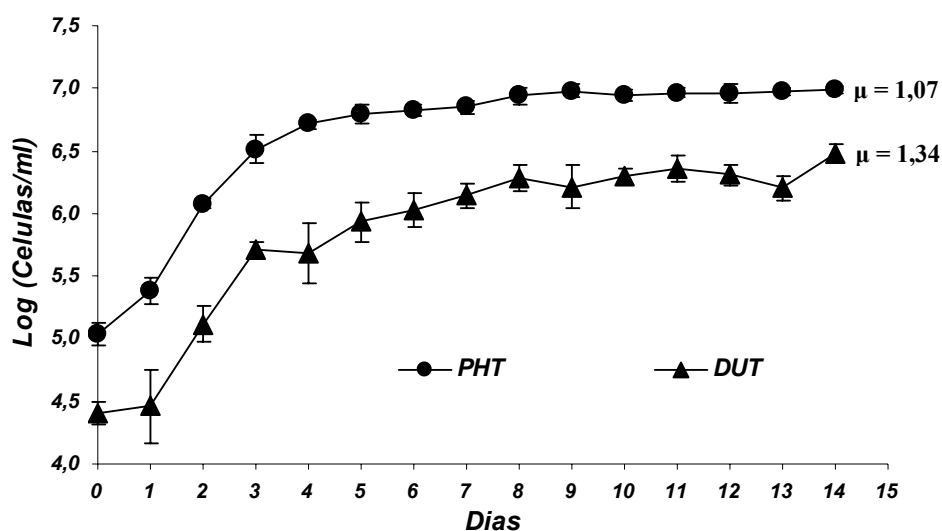


Figura 1.- Cinética de crecimiento de las microalgas *P. tricornutum* y *D. tertiolecta* en medio F/2 a 28° C iluminadas con lámparas fluorescentes blancas en bolsas de polipropileno de 40 litros con aireación a saturación y a 3.6 % de NaCl. Los datos representan la media \pm EE (n=3).

2.- Análisis químico proximal de las algas marinas: Se realizó el análisis químico proximal de las algas marinas para así poder ajustar la biomasa a suministrar en base a la cantidad de carbohidratos (ELN) tratando de suministrar una cantidad igual de 100 mg diarios (Tabla VIII).

Tabla VIII.- Resultados de los análisis químicos proximales de las algas marinas (expresados en base seca).

Alga	Humedad (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Fibra Cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
<i>Eisenea arborea</i>	11,2	9,8	0,1	5,1	25,6	59,4	2877,1
<i>Sargasum horridum</i>	7,3	8,9	0,1	6,4	37,0	47,7	2186,8
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2,6	15,6	3,4	0,1	4,7	76,1	4393,2
<i>Dunalliella tertiolecta</i>	0,5	15,6	7,5	0,1	4,7	72,2	4362,6
<i>Opuntia ficus-indica</i>	5,6	11,9	0,4	13,5	12,5	61,8	3588,8

En base a los resultados obtenidos de los análisis químicos proximales de las algas marinas se ajustaron las dosis diarias a un volumen de 200 μ L para cada tratamiento (Tabla IX).

Tabla IX.- Suministro de Biomasa y aporte energético (Kcal) de cada uno de los tratamientos.

Alga	Biomasa (mg)	Kcal/Dosis
<i>E. arborea</i>	189,6	0,5
<i>S. horridum</i>	226,2	0,5
<i>P. tricornutum</i>	134,9	0,6
<i>D. tertiolecta</i>	139,2	0,6
<i>O. ficus-indica</i>	171,4	0,6

3.- Análisis de la comunidad microbiana mediante técnicas de cultivo: En el análisis de la microbiota intestinal de los ratones mediante técnicas de cultivo dependientes, para el caso de los Lactobacilos el tratamiento con *O. ficus-indica* presentó los mayores conteos con diferencias significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al control, los tratados con *E. arborea* presentaron también mayores conteos pero sin diferencias significativas (Figura 2A). Para el caso de Enterobacterias, los tratamientos con *E. arborea* y *P. tricornutum* presentaron los más altos conteos pero sin presentar diferencias significativas, y caso contrario los tratados con *O. ficus-indica* presentaron menores conteos pero sin diferencias significativas (Figura 2B). Para el caso de mesófilos aerobios los ratones tratados con *P. tricornutum* presentaron mayores conteos y los tratados con *O. ficus-indica* los menores, pero para cualquier caso no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Figura 2C).

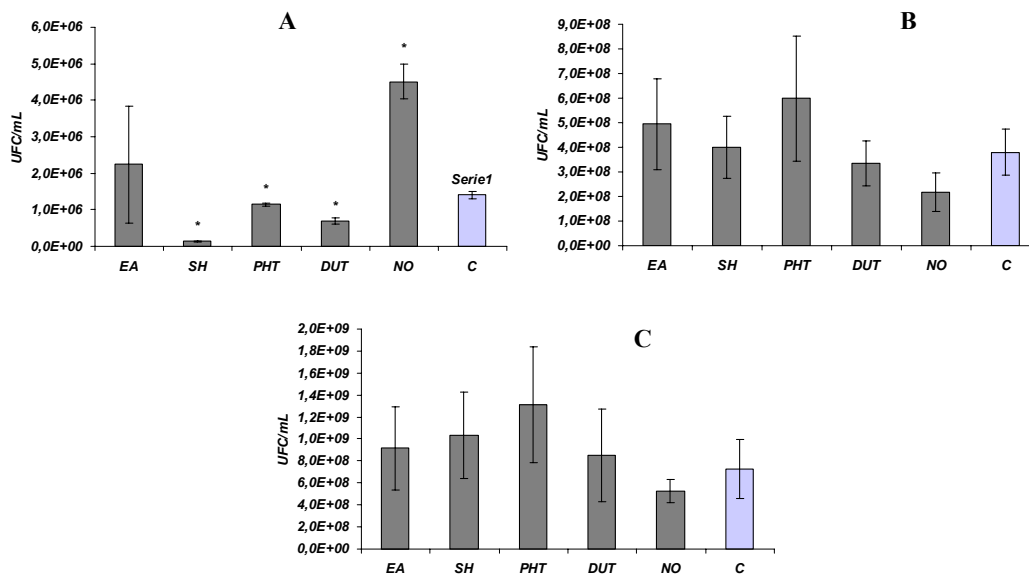


Figura 2.- Efecto de las algas en el conteo de: A).- Lactobacilos, B).- Enterobacterias y C.- Mesófilas aerobias asociadas a mucosa intestinal de ratones. Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas con * sobre las barras. EA.- *Eisenea arborea*, SH.- *Sargasum <horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricorutum*, DUT.- *Dunalliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.

4.- Análisis comunidad microbiana mediante SSCP: Durante la extracción de ADN de bacterias intestinales no fue posible observar el mismo en geles de agarosa debido al bajo rendimiento (Figura 3 A) sin embargo éste fue suficiente para llevar a cabo la amplificación de las regiones variables del gen ribosomal 16S (V₄-V₅). Mediante PCR se amplificaron regiones específicas del gen 16S utilizando oligonucleótidos para el análisis de poblaciones bacterianas (Tebbe *et al.*, 2001) (Figura 3 C), para tal fin la concentración de las muestras de ADN se ajustó para obtener los mejores resultados. Al visualizar los productos de amplificación en geles de agarosa, se observó que para algunas muestras se amplificaron una o más bandas adicionales a la esperada. Para poder eliminar estas bandas, se evaluó el efecto de la adición de diferentes concentraciones de MgCl₂ (0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 y 2.0 mM) sin embargo los resultados no mejoraron (Figura 3 B). Además, se evaluaron diferentes temperaturas de alineamiento con el fin de hacer más específica la reacción de PCR. Para esto, se corrió una reacción fijando un gradiente de temperatura de 58° C hasta 60° C, con las cuales se eliminó una banda pero otra persistió (Figura 3 D). Posteriormente se evaluó un gradiente mucho más amplio de temperatura (de 60° C hasta 68° C),

observando que con una temperatura de alineamiento de 63° C se eliminó a ambas bandas (Figura 3 E).

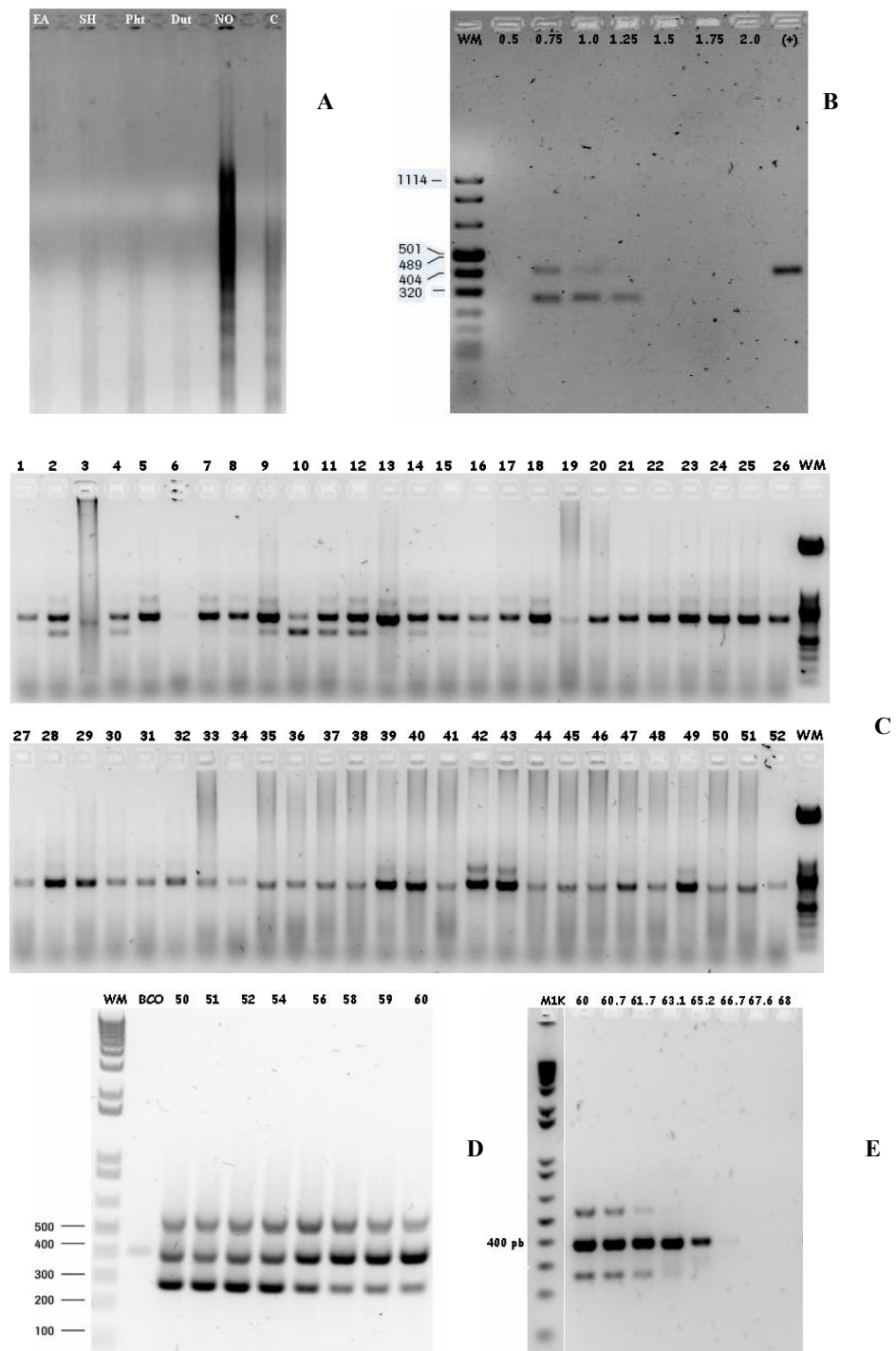


Figura 3.- Electroforesis en gels al 2 % de agarosa en TAE 1X de: A).- Extracción de ADN de muestras intestinales de ratón de los diferentes tratamientos; B).- Evaluación de la concentración de MgCl₂ a 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 y 2.0 mM; C).- Amplificación de las regiones variables V₄ y V₅ del gen

ribosomal 16S de las muestras intestinales de los ratones; D).- PCR de evaluación de la Tm desde 50° hasta 60° C; E).- PCR de evaluación de la Tm desde 60° hasta 68° C.

Las muestras que mostraban varias bandas fueron amplificadas con las nuevas condiciones de PCR, en algunas muestras no se obtuvieron amplificaciones idóneas por lo cual se realizaron varias amplificaciones y se juntaron para obtener suficiente, pero algunas muestras no se pudieron amplificar. Los amplicones fueron purificados, digeridos con lambda exonucleasa, nuevamente purificados, se desnaturalizaron y enfriaron en hielo para ser cargadas en los geles de poliacrilamida. Los productos amplificados de todas las muestras fueron agrupadas por muestreos (1er, 2do y 3er) y fueron resueltas en geles de poliacrilamida bajo las condiciones antes mencionadas (Figuras 10,11 y 12).

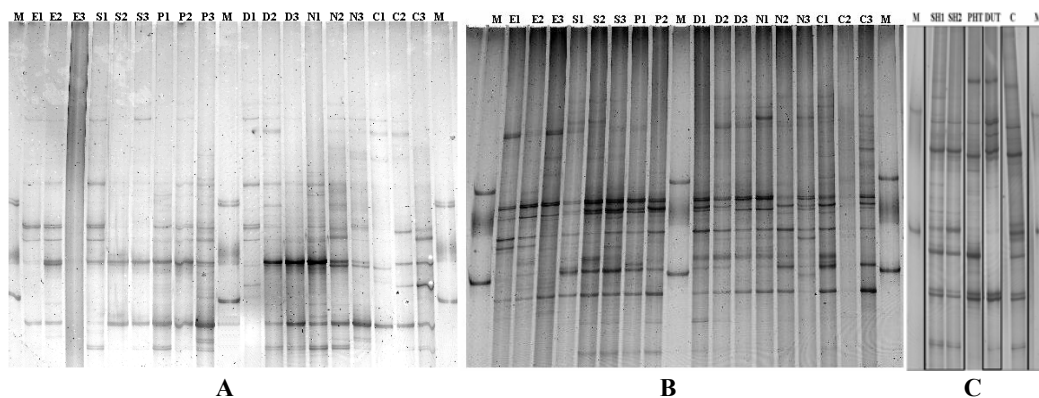


Figura 4.- Electroforesis de los productos amplificados por PCR de las regiones V₄ y V₅ del gen 16S comparando los diferentes tratamientos a las: A).- 2; B).- 4 y C).- 6 semanas de tratamiento; E1-3.- *E. arborea*, S1-3.- *S. horridum*, P1-3.- *P. tricorntutum*, D1-3.- *D. tertiolecta*, N1-3.- *O. ficus-indica*. A las 2 semanas de tratamiento.

Después de la electroforesis los geles fueron documentados y las bandas fueron cortadas y eluidas para su reamplificación con los mismos oligonucleótidos pero a una Tm de 58° C la cual es la óptima para estos oligonucleótidos (Figura 13).

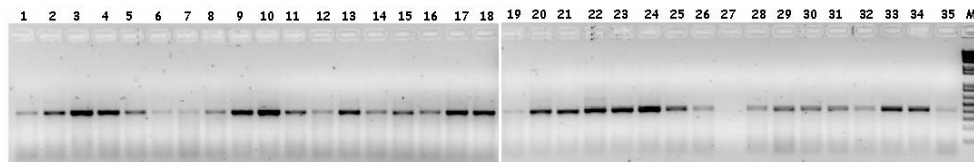


Figura 5.- Electroforesis en geles al 2 % de agarosa-TAE 1X de los productos de PCR de las bandas eluidas de los geles poliacrilamida de SSCP.

Los productos fueron purificados y mandados secuenciar a la empresa MACROGEN.

De acuerdo con los geles obtenidos, el número de bandas (OTUs) que refleja la diversidad o riqueza de la comunidad asociada a la mucosa intestinal de los ratones (Seksik *et al.*, 2003), para las 2 semanas presentaron un aumento significativo ($P \leq 0.05$) para todos los tratamientos con respecto del control (Figura 6 A). Para el caso de la diversidad a las 4 semanas, no se presentaron diferencias significativas de ningún tratamiento con respecto al control, pero el número de bandas aumentó (Figura 6 B). Para las muestras tomadas a las 6 semanas no se pudieron hacer análisis estadísticos por lo cual no se obtuvieron datos confiables al no presentar réplicas (Figura 6 C). Al comparar los datos del número de bandas a las 2 y 4 semanas, aunque se encontró un aumento para todos los tratamientos con respecto al control, solo en los tratamientos de *E. arborea*, *S. horridum*, *D. tertiolecta* se encontró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) (Figura 6 D).

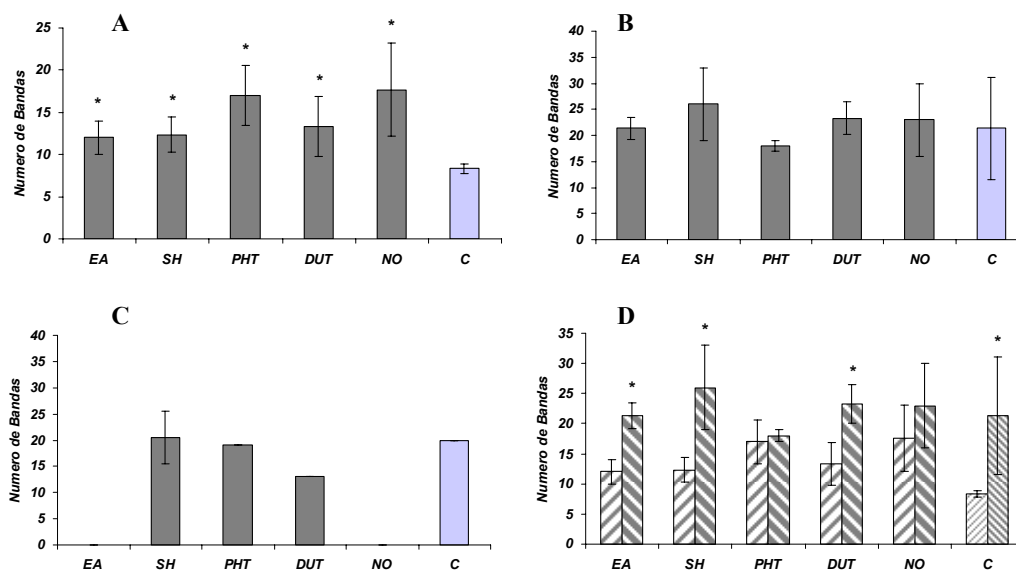


Figura 6.- Número de bandas (OTUs) obtenido de los perfiles individuales de polimorfismo conformacional de cadena sencilla de los diferentes tratamientos a las: A).- 2, B).- 4 y C).- 6 semanas. D).- Análisis de las bandas con respecto al tiempo (semanas). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas con * sobre las barras. EA.- *Eisenea arborea*, SH.- *Sargasum horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricornutum*, DUT.- *Dunalliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.

El índice de Shannon–Weaver (Shannon *et al*, 1963) es un índice de diversidad que nos ayuda a estudiar la dinámica de las comunidades bacterianas y éste es calculado en base a las bandas de los perfiles obtenidos por SSCP. Dicho índice toma en consideración el número y la intensidad relativa de las bandas en una línea individual. Se calcula con la siguiente ecuación: donde P_i es la intensidad relativa de las bandas en un perfil.

$$H' = -\sum P_i * (\ln(P_i))$$

Los resultados de diversidad mediante el índice de Shannon–Weaver de los perfiles bacterianos de los geles de SSCP a las 2 semanas no son homocedásticos, por lo cual se realizó una prueba de Kruskal-Wallis por Rangos y no se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) significativas. Además se realizó un análisis para comparar cada tratamiento con el control, donde si se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) significativas de los tratamientos con *E. arborea* y *O. ficus-indica* con respecto al control (Figura 18). Para los tratamientos a las 4 semanas no se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) significativas (Figura 19). Al comparar los índices de diversidad de Shannon-Weaver a las 2 y 4 semanas aunque se encontraron aumentos para todos los tratamientos y el control, solo en los caso de *E. arborea*, *S. horridum*, *D. tertiolecta*, y *O. ficus-indica* se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) significativas (Figura 20).

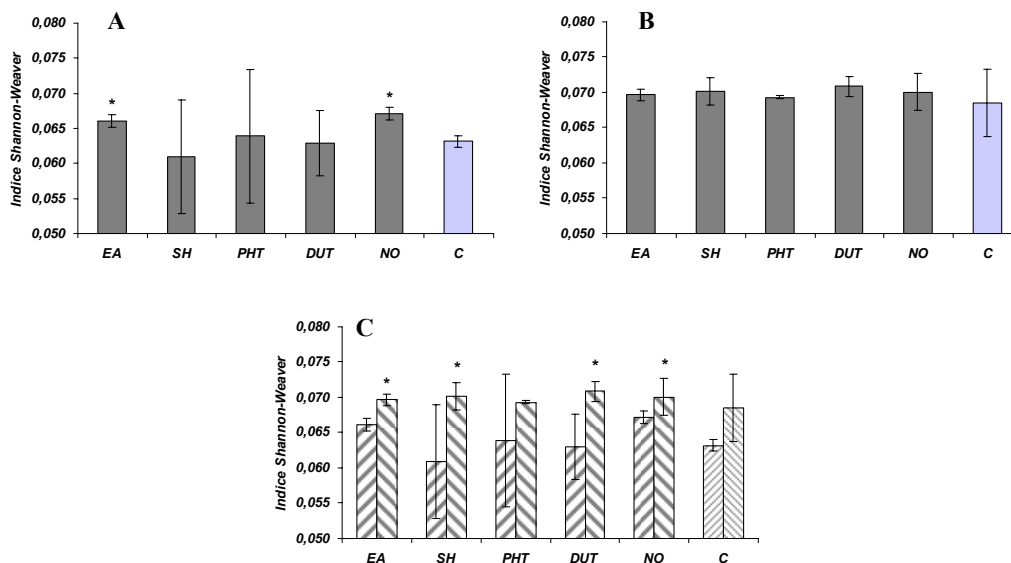


Figura 7.- Índices de diversidad de Shannon-Weaver obtenidos de los perfiles individuales de polimorfismo conformacional de cadena sencilla de los diferentes tratamientos a las: A).- 2, B).- 4 y C).- 6 semanas. D).- Análisis de los índices con respecto al tiempo (semanas). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas

con letras sobre las barras. EA.- *Eisenea arborea*, SH.- *Sargasum horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricornutum*, DUT.- *Dunalliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.

Con respecto a la homogeneidad (E) la cual se define como una medida que expresa que tan similar es la abundancia de diferentes especies, se calculó a partir del índice de riqueza de especies (S) y el índice de Shannon-Weaver (H) y se calcula con la siguiente ecuación:

$$E = H' * (\ln(S))^{-1}$$

Para el caso de la homogeneidad de los perfiles generados por SSCP de la comunidad intestinal de los ratones, para las 2 semanas de tratamiento se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) significativas de todos los tratamiento contra el control pero no entre tratamientos (Figura 8 A). A las 4 semanas no se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) significativas entre los tratamientos y el control. Sin embargo, se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) de los tratamientos *E. arborea* y *D. tertiolecta* comparados con el tratamiento de *P. tricornutum* (Figura 8 B). Al analizar la homogeneidad con respecto al tiempo los casos de *P. tricornutum* y *Opuntia ficus-indica* no presentaron diferencias, y en todos los demás casos si hubo una disminución significativa ($P \leq 0.05$) en la homogeneidad (Figura 8 C).

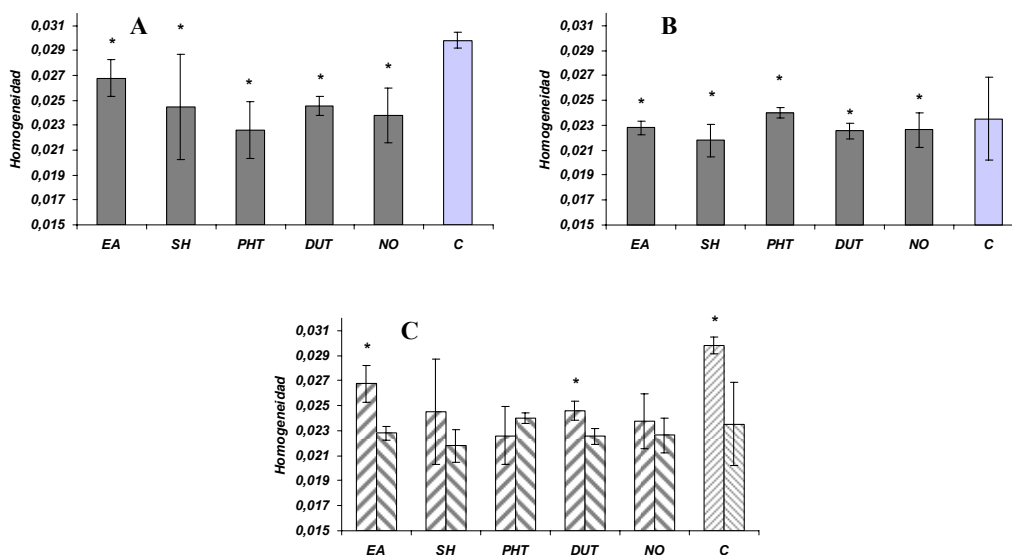


Figura 8.- Homogeneidad obtenidos de los perfiles individuales de polimorfismo conformacional de cadena sencilla de los diferentes tratamientos a las: A).- 2, B).- 4 y C).- 6 semanas. D).- Análisis de las Homogeneidad con respecto al tiempo (semanas). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicados con letras sobre las

barras. EA.- *Eisenea arborea*, SH.- *Sargasum horridum*, PHT.- *Phaeodactylum tricornutum*, DUT.- *Dunaliella tertiolecta*, NO.- *Opuntia ficus-indica*.

Se realizó un análisis de las imágenes obtenidas de los geles de acrilamida, mediante el software GelCompar realizando análisis de agrupamiento, número de bandas y diversidad bacteriana de los diferentes tratamientos. Las muestras obtenidas a las 2 semanas (1er muestreo) presentaron una homogeneidad en los perfiles (Figura 9), ya que no se formaron grupos definidos por los tratamientos o por el tipo de microalga (macro o microalgas).

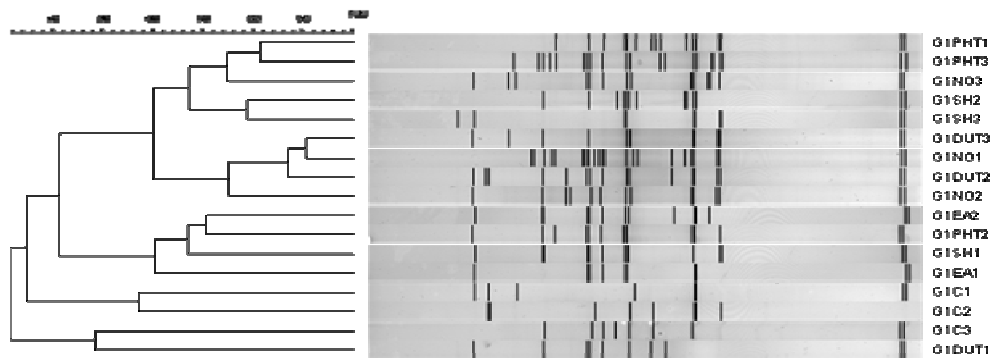


Figura 9.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de los diferentes tratamientos a las 2 semanas.

Para las 4 semanas (2do muestreo) los perfiles (Figura 10) se agrupan por el tipo de alga (micro y macro) y el tratamiento con *O. ficus-indica* presenta perfiles similares a los generados por las microalgas (*P. tricornutum* y *D. tertiolecta*).

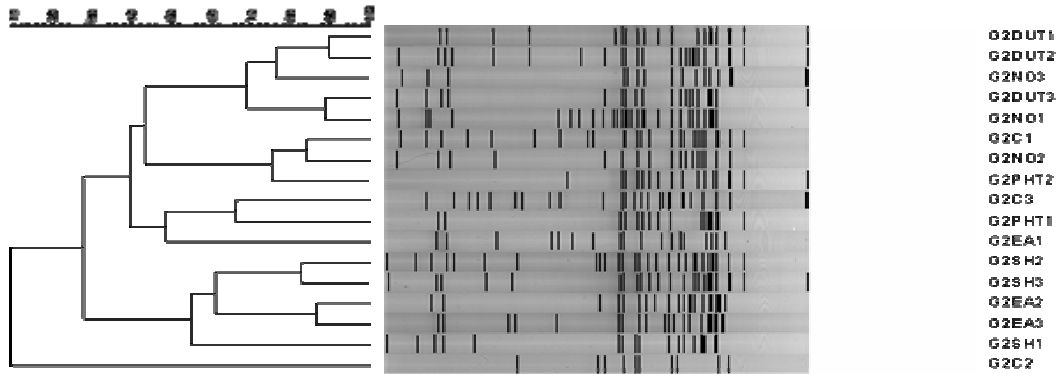


Figura 10.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de los diferentes tratamientos a las 4 semanas.

De las muestras a las 6 semanas (3er muestreo) solo se pudieron amplificar 5 de un total de 18, y estas fueron resueltas (Figura 11) sin obtener datos confiables al no presentar replicas.

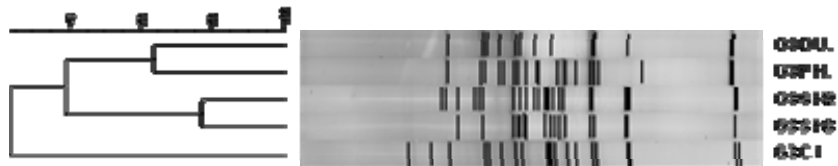


Figura 11.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de los diferentes tratamientos a las 6 semanas.

Se realizaron análisis de agrupamiento de acuerdo con el tiempo, 2, 4 y 6 semanas, por tratamiento. Para el caso de los organismos controles los perfiles se agruparon en 2 grupos principales, los de 2 semanas y los de 4 y 6 semanas (Figura 12).

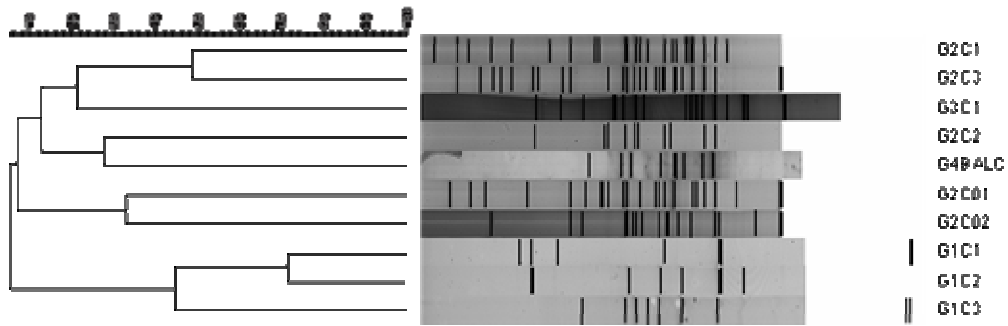


Figura 12.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos controles con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.

Para el caso de los organismos tratados con *E. arborea* los perfiles se agruparon de igual manera que para los controles en 2 grupos principales, los de 2 semanas y los de 4 y 6 semanas (Figura 13).

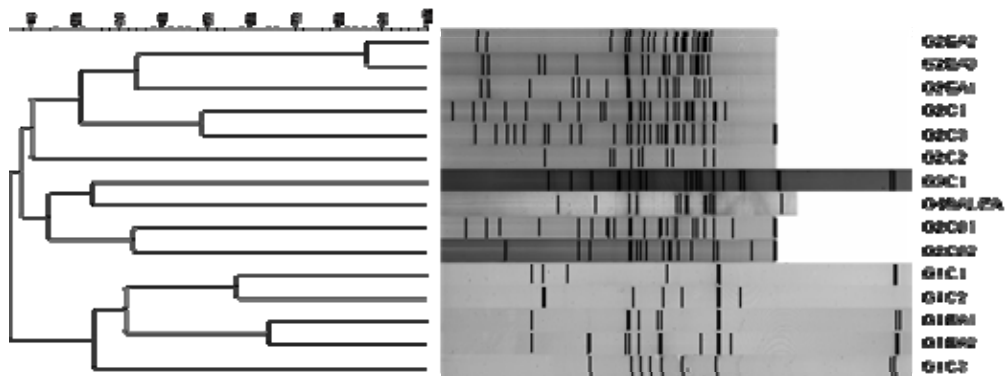


Figura 13.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *E. arborea* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.

Para el caso de los organismos tratados con *S. horridium* los perfiles se agruparon en 4 grupos principales, donde todos se agruparon por el tiempo, 0, 2, 4, y 6 semanas (Figura 14).

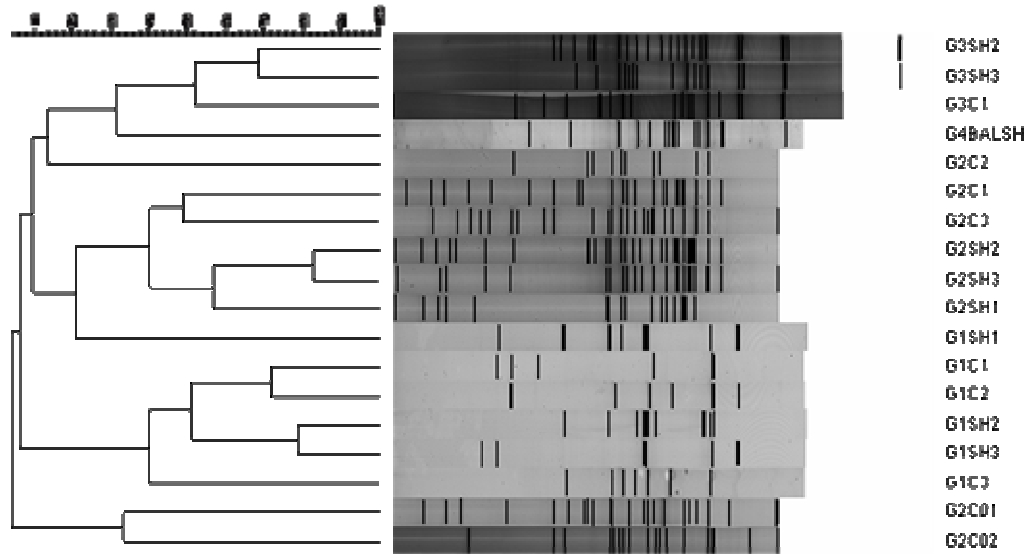


Figura 14.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *S. horridium* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.

Para el caso de los organismos tratados con *P. tricornutum* los perfiles se agruparon de manera similar a los tratados con *S. horridium* en 4 grupos principales, 0, 2, 4, y 6 semanas (Figura 15).

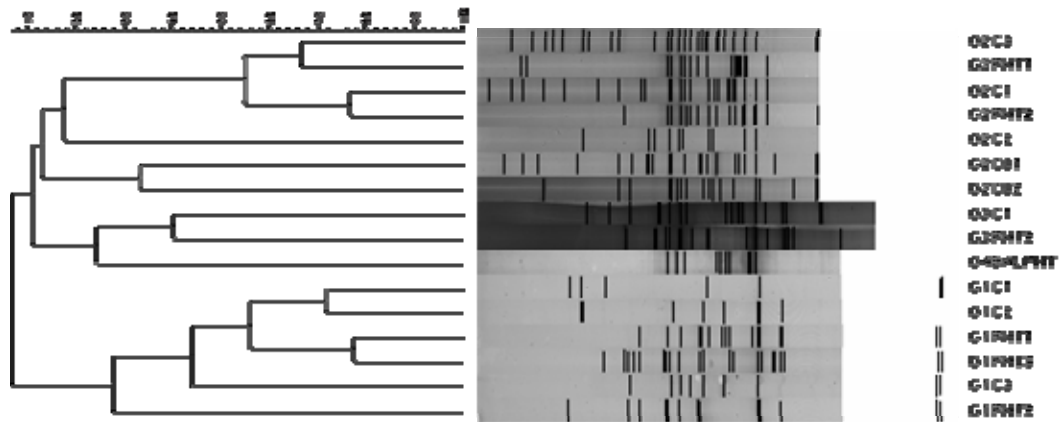


Figura 15.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *P. tricornutum* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.

Para el caso de los organismos tratados con *D. tertiolecta* los perfiles se agruparon de igual manera a los tratados con *S. horridium* y *P. tricornutum* en 4 grupos principales, 0, 2, 4, y 6 semanas (Figura 16).

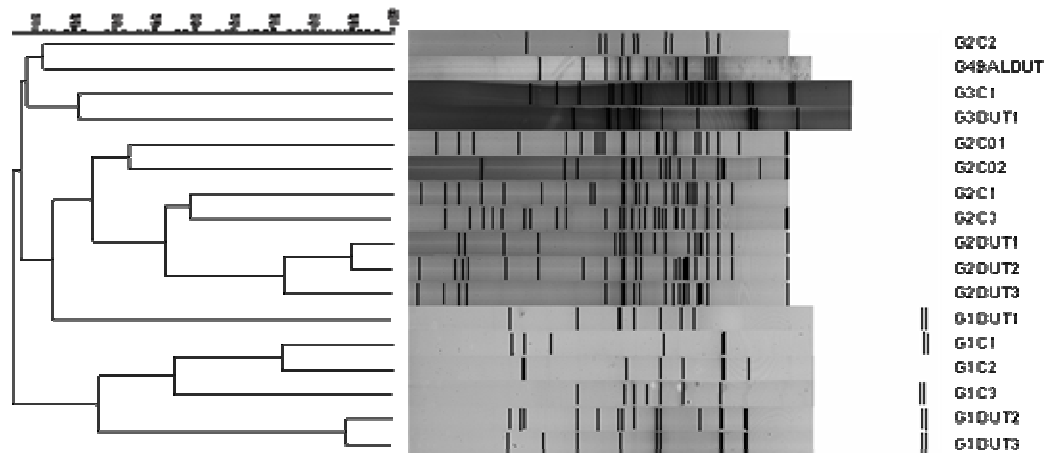


Figura 16.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *D. tertiolecta* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.

Para el caso de los organismos tratados con *O. ficus-indica* los perfiles se agruparon en 2 grupos principales, los de 2 semanas y los de 4 y 6 semanas (Figura 17).

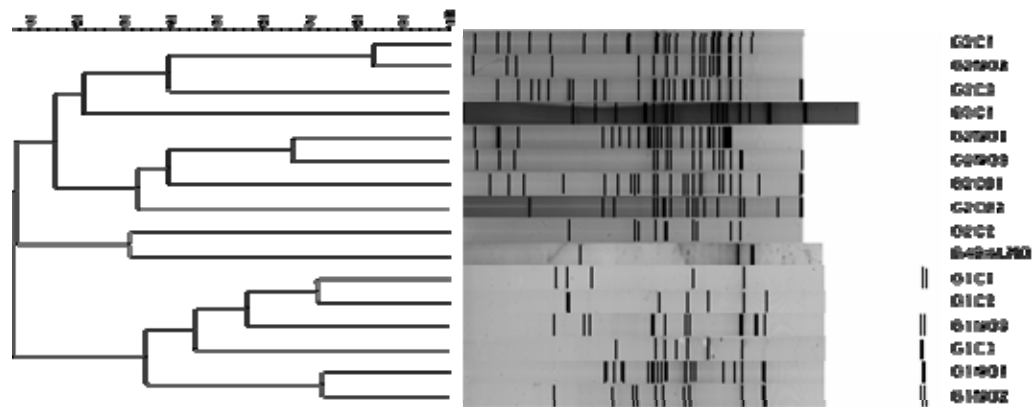
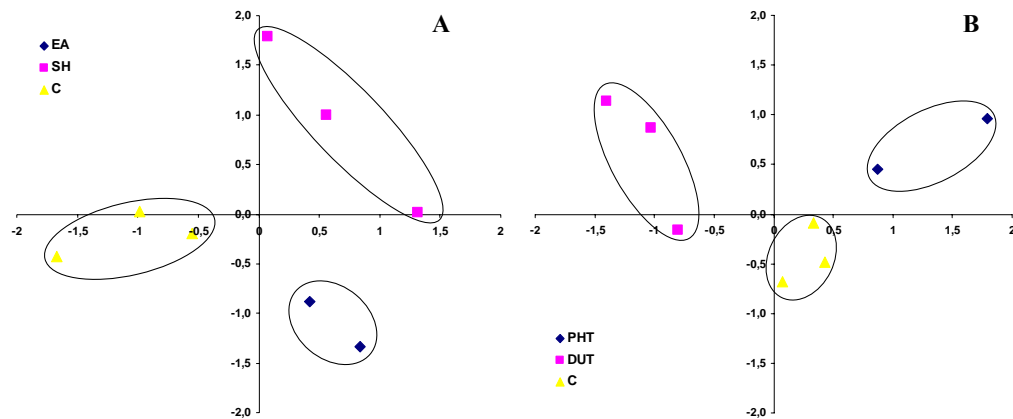


Figura 17.- Dendrograma y perfiles normalizados de polimorfismo conformacional de cadena sencilla obtenido del análisis de agrupamiento de organismos tratados con *O. ficus-indica* con respecto al tiempo: G1.- 2 semanas, G2.- 4 semanas y G3.- 6 semanas.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de los perfiles generados por polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) del ADN bacteriano de las regiones V₄ y V₅ del gen 16S amplificados. Se utilizaron los datos de ausencia presencia de las bandas (OTUs) en los perfiles. El ACP a las 2 semanas de tratamiento para las macroalgas (*E. arborea* y *S. horridum*) presentó perfiles diferentes a los del control, ya que en la gráfica de resultados del ACP los grupos no se traslaparon (Figura 18 A). En el caso de las 2 semanas de tratamiento con microalgas (*P. tricornutum* y *D. tertiolecta*) los perfiles generados presentaron diferencias comparados con los del control, ya que en la gráfica de resultados del ACP no se traslapó ningún tratamiento con el control (Figura 18 B). En el caso de las 2 semanas de tratamiento con *O. ficus-indica* los perfiles generados presentaron diferencias comparados con los del control (Figura 18 C). Para las 4 semanas de tratamiento con macroalgas (*E. arborea* y *S. horridum*) los perfiles generados presentaron diferencias comparados con los del control (Figura 18 D). A las 4 semanas de tratamiento con microalgas solo los perfiles generados por *P. tricornutum* presentaron diferencias comparados con los del control (Figura 18 E). A las 4 semanas de tratamiento con *O. ficus-indica* los perfiles generados no presentaron diferencias comparados con los del control (Figura 18 F).



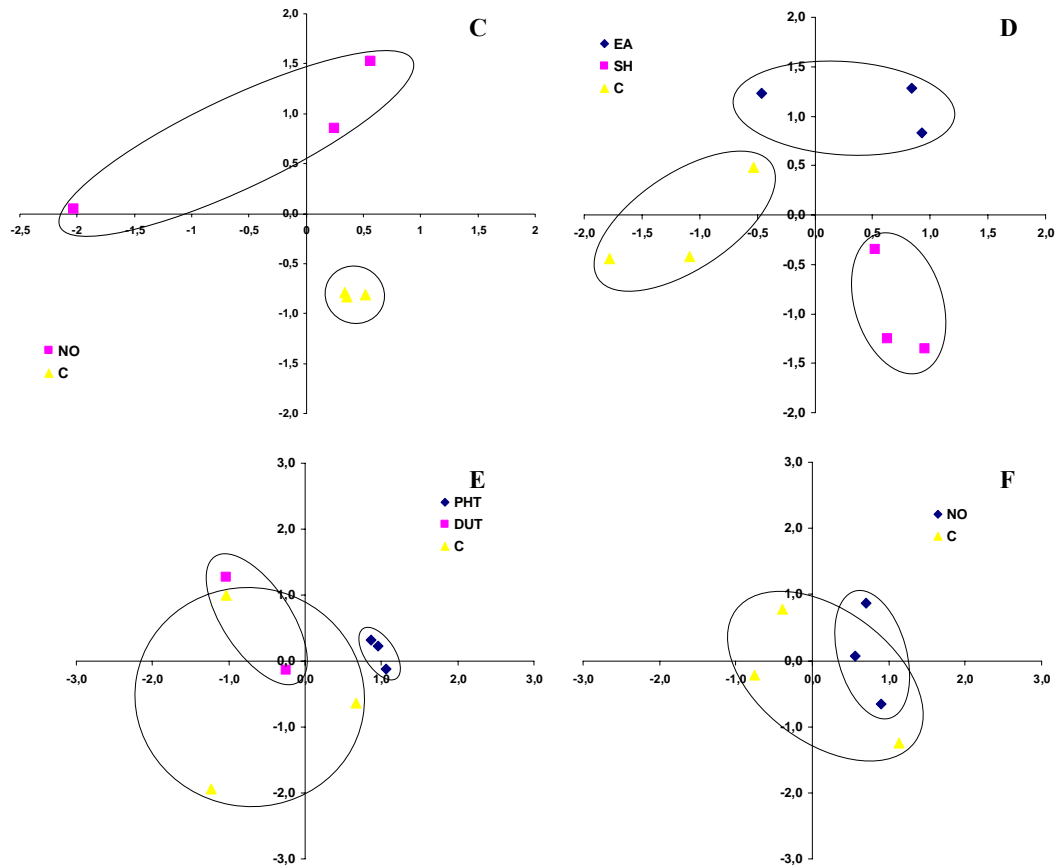


Figura 18.- Grafica de resultados del Análisis de Componentes Principales de los perfiles de polimorfismo conformacional de cadena sencilla basado en ADN bacteriano de las regiones V₄ y V₅ del gen 16S a las A).- 2 semanas para macroalgas, factor 1 es 27,7 % y el factor 2 es 20,9 %. Eigenvalores de 9,7 y 7,3.; B).- 2 semanas para microalgas, factor 1 es 34,8 % y el factor 2 es 25,0 %. Eigenvalores de 14,6 y 10,5; C.-) 2 semanas para Nopal, factor 1 es 34,8 % y el factor 2 es 25,0 %. Eigenvalores de 14,6 y 10,5; D).- 4 semanas para macroalgas, factor 1 es 22,6 % y el factor 2 es 20,3 %. Eigenvalores de 13,4 y 12,0; E).- 4 semanas para microalgas, factor 1 es 22,6 % y el factor 2 es 20,6 %. Eigenvalores de 12,0 y 10,5; F.-) 4 semanas para Nopal 2 semanas de tratamiento, factor 1 es 23,0 % y el factor 2 es 20,1 %. Eigenvalores de 12,2 y 10,6.

Las bandas fueron cortadas y secuenciadas y se realizó una identificación mediante búsqueda de secuencias similares en blast (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los OTUs de referencias fueron colocados para orientación filogenética. Los árboles filogenéticos fueron construidos con las secuencias obtenidas de la amplificación y secuenciación de los productos identificados y seleccionados a partir de los geles del SSCP. Dichas secuencias corresponden a la región V₄ y V₅ y el análisis de las mismas fue hecho con un programa de máxima parsimonia (MP) PAUP 4.0b (Swofford 2003) con una búsqueda heurística empleando las opciones generales de búsqueda. Las relaciones fueron analizadas por el programa Neighbor-Joining (NJ) programa del PAUP 4.0d56 (Swofford no publicado) con la

medición de distancias por Jukes-Cantor. *E. coli* fue usada como secuencia grupo de referencia (Figura 19).

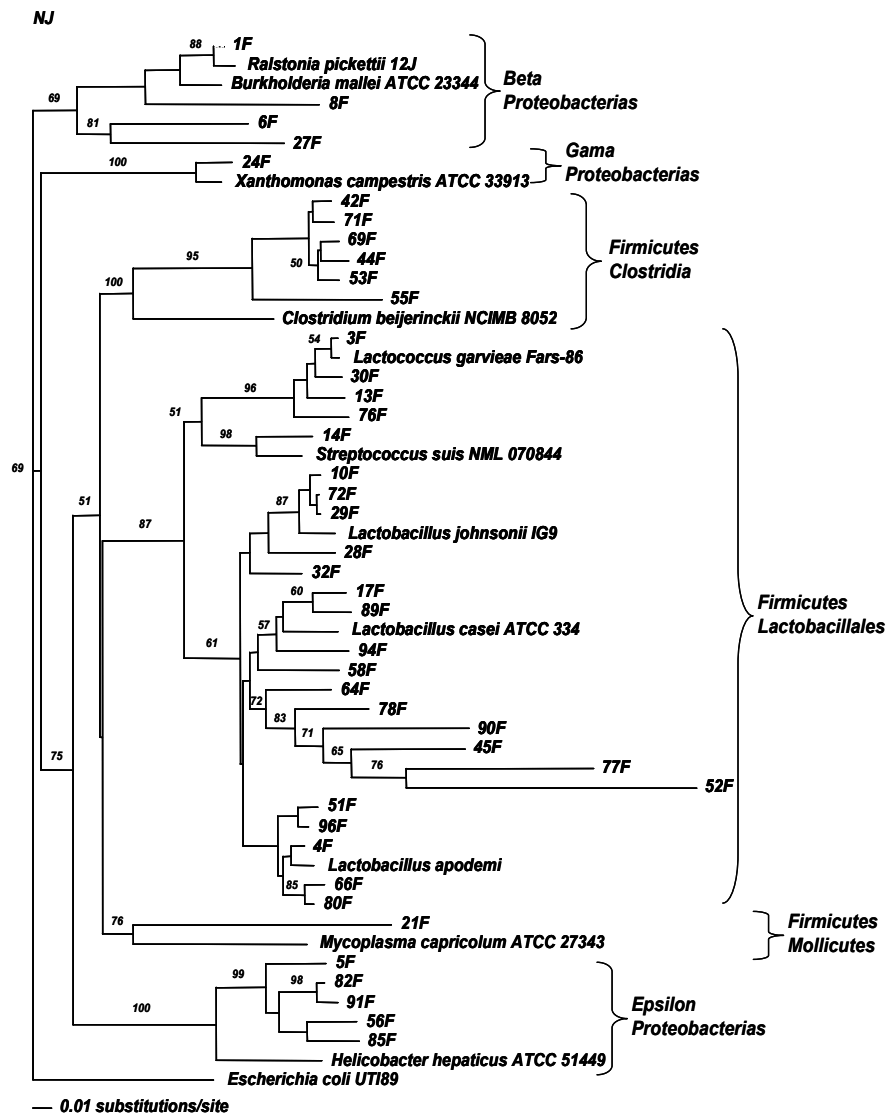


Figura 19. Árbol filogenético de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) identificados en los perfiles de polimorfismo conformacional de cadena sencilla. La escala representa distancia genética (1 sustitución por 100 nucleótidos).

5.- Análisis de actividad enzimática mediante APIzym: La actividad enzimática total a las 2 semanas de tratamiento aumentó significativamente ($P \leq 0.05$) con respecto del control en los tratamientos con algas marinas y no así con la de *O. ficus-indica* (Figura 20 A). En relación a la actividad enzimática total intestinal a las 4 semanas de tratamiento, se encontró una disminución significativa ($P \leq 0.05$) con respecto del control en los tratamientos con *E. arborea*, *S. horridum*, y *P. Tricornutum* (Figura 20 B).

En relación a la actividad enzimática total intestinal a las 6 semanas de tratamiento no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con respecto del control (Figura 20 C). La actividad enzimática total intestinal con respecto al tiempo sólo presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el tratamiento con *P. tricornutum*, *O. ficus-indica* y el control, y en el caso de *O. ficus-indica* y el control hubo una tendencia a aumentar (Figura 20 D). *P. tricornutum* presentó tendencia a disminuir.

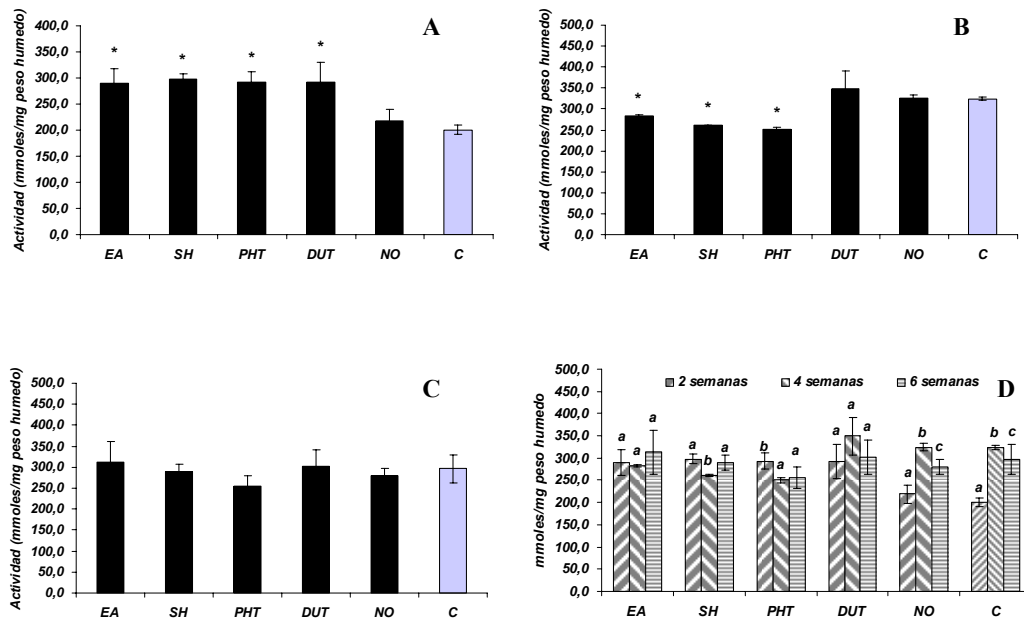


Figura 20.- Actividad enzimática total intestinal a las: A).- 2, B).- 4 y C).- 6 semanas. D).- Análisis con respecto al tiempo (semanas). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicadas con letras sobre las barras. EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricornutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales para visualizar diferencias en los perfiles enzimáticos intestinales en función de los distintos tratamientos con el fin de encontrar las variables que más aportan a la variación de los datos.

A las 2 semanas de tratamiento el CP1 (x) y el CP2 (y) explicaron el 62,5% de las diferencias en los perfiles enzimáticos intestinales. En el CP1 las diferencias vienen de las enzimas fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y esterasa (C 4) y en CP2 provienen de la enzima β -glucuronidasa. Las gráficas de PC1 y PC2 mostraron claros patrones, donde las algas marinas formaron un grupo y *O. ficus-indica* y el control formaron otro grupo (Figura 21 A).

A las 4 semanas de tratamiento El CP1 (x) y el CP2 (y) explicaron el 75% de las diferencias en los perfiles enzimáticos intestinales. En el CP1 las diferencias vienen de las enzimas leucina arilamidasa, β -glucosidasa, fosfatasa ácida y en CP2 provienen de la enzima β -glucuronidasa. Las gráficas de PC1 y PC2 mostraron 2 grupos claros, donde las algas *E. arborea*, *S. horridum*, y *P. tricorutum* marinas formaron un grupo y *D. tertiolecta*, *O. ficus-indica* y el control formaron otro grupo (Figura 21 B).

A las 6 semanas de tratamiento el CP1 (x) y el CP2 (y) explicaron el 47% de las diferencias en los perfiles enzimáticos intestinales. En el CP1 las diferencias vienen de la enzima leucina arilamidasa y en CP2 proviene de la enzima valina arilamidasa. La gráfica de PC1 y PC2 mostró diferencias de todos los tratamientos con algas marinas, y en el caso de *O. ficus-indica* presentó ligero traslape con el control (Figura 21 C).

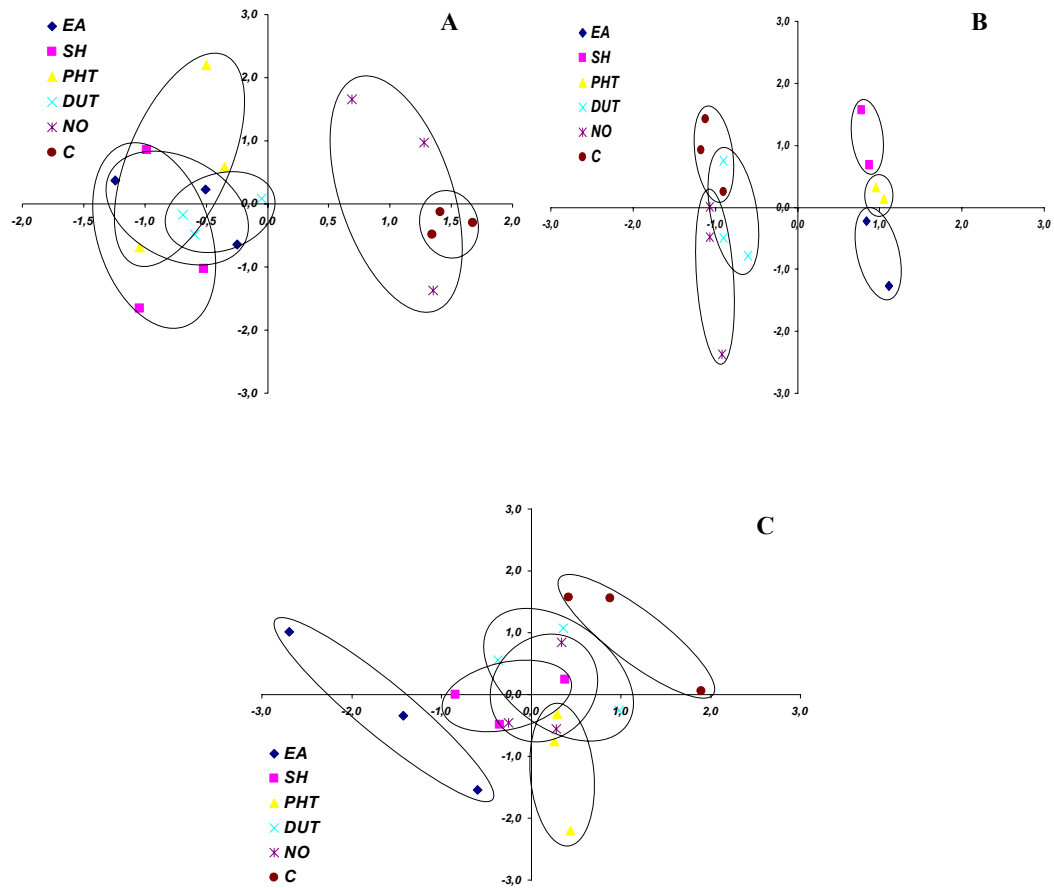


Figura 21.- Grafica de resultados del Análisis de Componentes Principales de los perfiles enzimáticos basados en análisis con APIZYM de homogenizados de la mucosa gástrica a las: A).- 2 semanas, Factor 1.- 46,8 y Factor 2.- 15,7 y Eigenvalores de 5,2 y 1,7; B).- 4 semanas, Factor 1.- 60,8 y Factor 2.- 14,2 y Eigenvalores de 9,1 y 2,1; C.-) 6 semanas Factor 1.- 25,8 y Factor 2.- 21,1 y Eigenvalores de 3,6 y 2,9. EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricornutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*, C.- Control.

En base a los resultados de análisis de ACP se realizó un análisis las enzimas que resultaron importantes. A las 2 semanas de tratamiento para todos los casos, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) salvo para la enzima β -glucuronidasa que no las presentó (Figura 22).

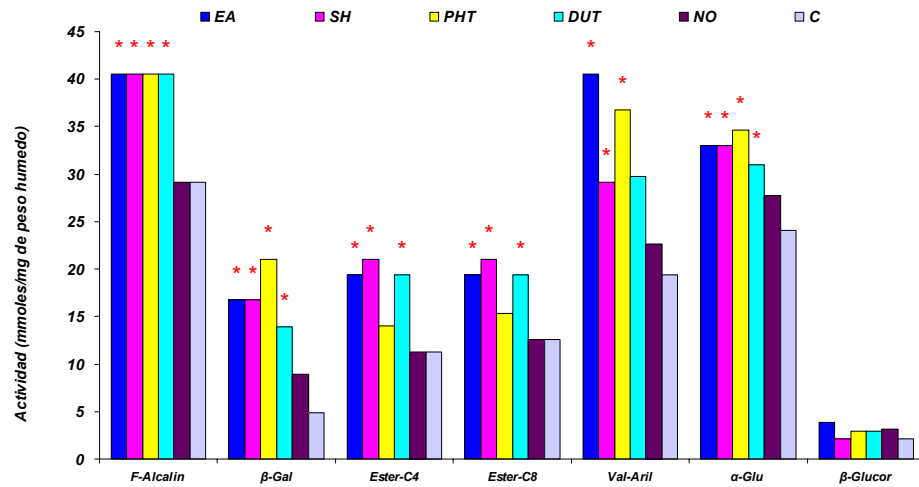


Figura 22.- Actividad enzimática por enzima en base a los resultados de ACP. 2 semanas de tratamiento. EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricorutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*, C.- Control. Los datos representan la media (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los grupos control y algas son indicados con letras sobre las barras.

A las 4 semanas en las enzimas α -glucosidasa, tripsina, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y β -galactosidasa no se encontraron diferentes significativas de ningún tratamiento con respecto al control (Figura 23).

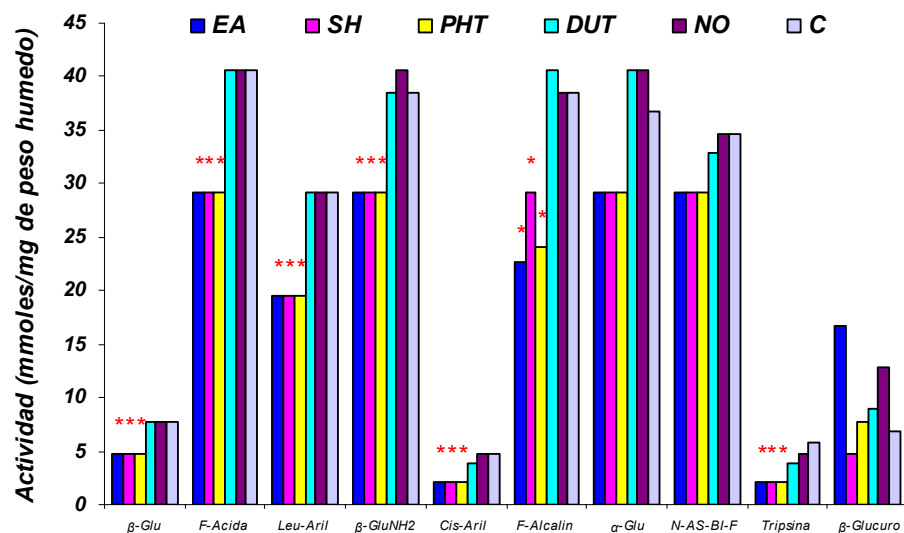


Figura 23.- Actividad enzimática por enzima en base a los resultados de ACP. 4 semanas de tratamiento. Los datos representan la media (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los grupos control y algas son indicados con letras sobre las barras. EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricorutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*, C.- Control.

A las 6 semanas de tratamiento solamente para el caso de la enzima valina arilamidasa se encontraron diferencias significativas con respecto al control (Figura 24).

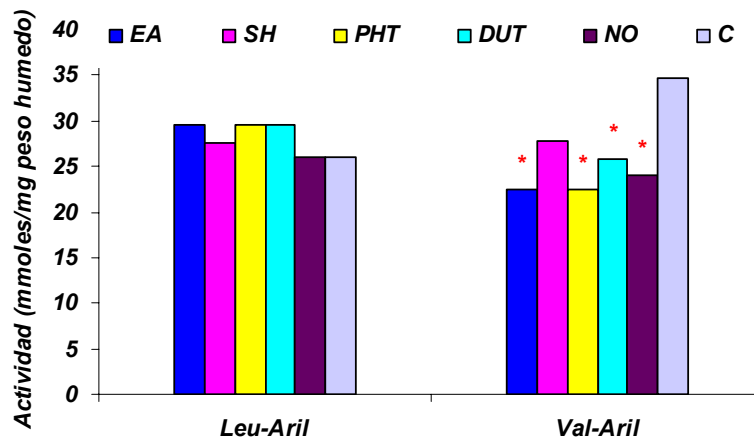


Figura 24.- Actividad enzimática por enzima en base a los resultados de ACP. 6 semanas de tratamiento. EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricornutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*, C.- Control. Los datos representan la media (n=3). Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los grupos control y algas son indicados con letras sobre las barras.

6.- PCR semi-cuantitativo de citocinas: Para llevar a cabo el análisis de la expresión de las citocinas en el tejido intestinal el ARN extraído se trató con ADNsa, fue limpiado y posteriormente se llevó a cabo la síntesis de ADNc mediante RT-PCR. Posteriormente se evaluó la integridad del ADNc obtenido mediante la amplificación del gen constitutivo GAPDH (Figura 25).

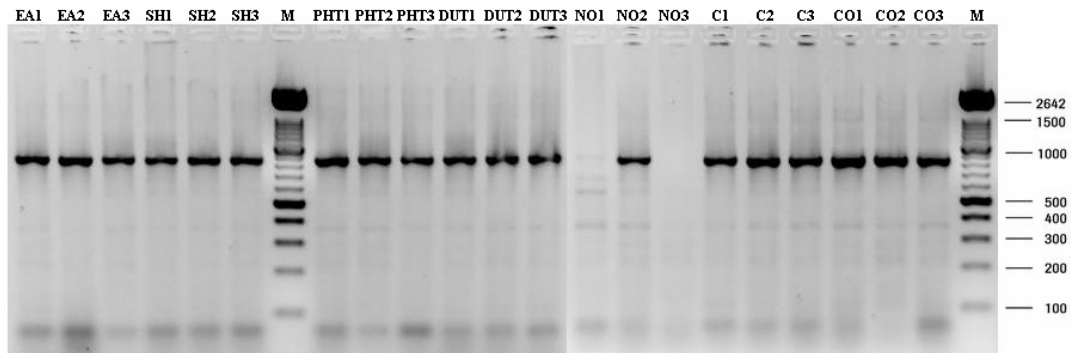


Figura 25.- Análisis de integridad del ADNc mediante la expresión del gen GAPDH de muestras individuales.

Se realizaron pools por tratamiento para analizar que citocinas se expresaron mediante PCR de punto final (35 ciclos). Las citocinas IL-1, IL-6 e IL-8 no presentaron expresión, las citocinas IL-4 e INF- γ presentaron expresión pero esta no fue posible cuantificarla. Las citocinas IL-10 y TNF- α presentaron expresión y fue cuantificada mediante PCR-semicuantitativo (Tabla X).

Tabla X.- Resumen de amplificación para cada citosina a partir de ADNc de pools de muestras intestinales por tratamiento; EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricornutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*, C.- Control. (+).- Presencia de amplicón específico, (-).- Ausencia de amplicón específico y (\pm) Baja concentración del amplicón específico.

Citocinas	EA	SH	PHT	DUT	NO	C
IL-1	-	-	-	-	-	-
IL-4	\pm	\pm	\pm	\pm	-	\pm
IL-6	-	-	-	-	-	-
IL-8	-	-	-	-	-	-
IL-10	+	+	+	+	-	+
TNF- α	+	+	+	+	+	+
INF- γ	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	-

Posteriormente se realizó la estandarización de las condiciones de PCR para la semicuantificación, se evaluó la Tm y el número de ciclos óptimos para encontrar la amplificación exponencial requerida (Figura 26).

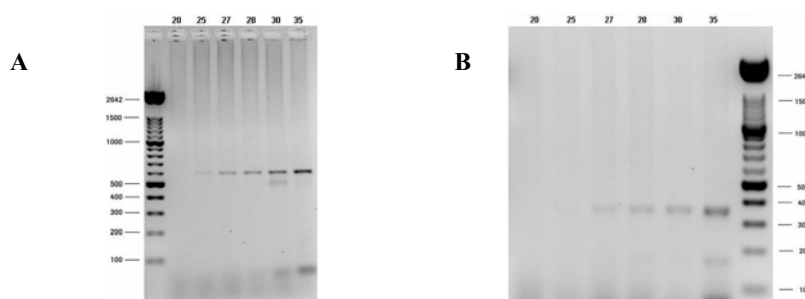


Figura 26.- Determinación del número de ciclos óptimo para: A).- IL-10 y B).- TNF- α .

De acuerdo a los resultados las citocinas que dieron positivo (presencia de amplicón) se llevó a cabo la semicuantificación de acuerdo al programa estandarizado previamente. El cual fue de 28 ciclos para ambos genes, IL-10 y TNF- α , junto con GAPDH.

La expresión de la citocina IL-10 no tubo diferencias significativas, solamente con el tratamiento con *O. ficus-indica* al no presentar expresión (Figura 27).

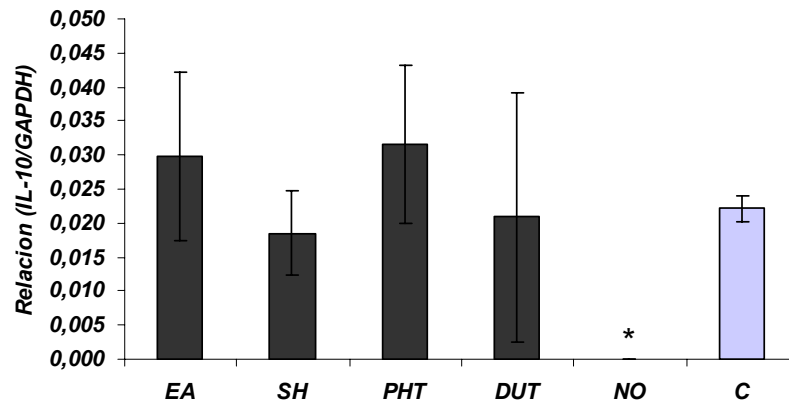


Figura 27.- Expresión de TNF- α en tejido intestinal de ratones por tratamiento. Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicados con * sobre las barras. EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricornutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*.

La expresión de la citocina TNF- α disminuyó de manera significativa ($P \leq 0.05$) en los tratamientos con *E. arborea* y *S. horridum* y aumentó de manera significativa ($P \leq 0.05$) en el tratamiento con *O. ficus-indica* (Figura 28).

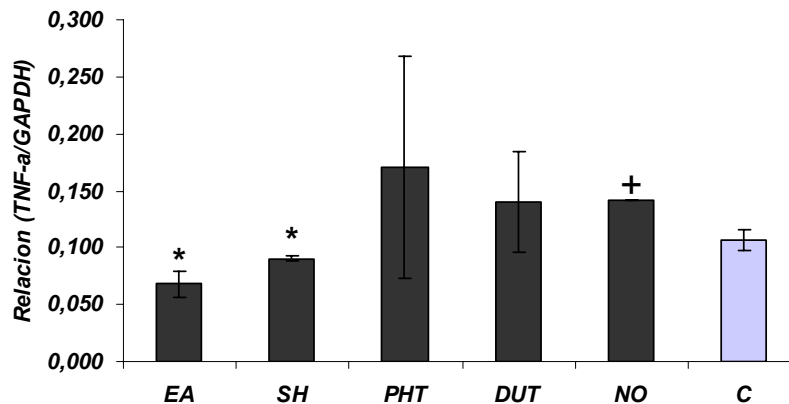


Figura 28.- Expresión de IL-10 en tejido intestinal de ratones por tratamiento. Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) son indicados con * sobre las barras. + sin desviación ($n=1$). EA.- *E. arborea*, SH.- *S. horridum*, PHT.- *P. tricornutum*, DUT.- *D. tertiolecta*, NO.- *O. ficus-indica*.

La cuantificación de citocinas de células mononucleares sanguíneas no se pudo llevar a cabo debido a que no se obtuvo ARN mediante el método utilizado en este trabajo.

DISCUSIÓN

La estimulación de clostridios proteolíticos y bacteroides puede ser perjudicial a la salud (Gibson *et al* 1999; Mangin *et al* 2004; Scanlan *et al.*, 2006), mientras que el estímulo de bifidobacterias y lactobacilos generalmente se considera un beneficio a la salud (Fuller *et al.*, 1998, O'Sullivan *et al* 2005). Estas observaciones han sugerido que la modificación en la composición de la microbiota intestinal por medio de suplementos alimenticios podría promover la salud (Gibson *et al* 1995; Goldin 1992; Roberfroid *et al* 1998). En el presente trabajo se evaluó la microbiota asociada a la mucosa y solo se observó una estimulación significativa *in vivo* de las especies *Lactobacillus* que crecen en agar Rogosa en los ratones tratados con *O. ficus-indica* y una tendencia a aumentar para *E. arborea* (Figura 2 A), en las demás tratamientos con algas los conteos disminuyeron significativamente. Esta estimulación puede deberse al contenido de inulina, un fructooligosacárido, de *O. ficus-indica* ya que hay evidencia que especies de *Lactobacillus* son capaces de utilizarla *in vitro* (Barrangou *et al.*, 2003) e *in vivo* (Konstantinov *et al*, 2004). En el caso *E. arborea* la estimulación posiblemente se debe a que las algas marinas contienen una gran variedad de polisacáridos que varían en estructura primaria (secuencia de monosacáridos), composición (grupos sulfatos, amino y carboxilos), peso molecular y configuración anomérica, posición del enlace glucosídico y densidad de cargas (Yalpani, 1988). Todas estas características hacen una estimulación selectiva de los microorganismos en el intestino (Licht *et al* 2006) las cuales estarían favoreciendo a especies de *Lactobacillus*.

Los tratamientos con *P. tricornutum* y *E. arborea* presentaron los más altos conteos de enterobacterias y caso contrario los tratados con *O. ficus-indica* presentaron menores conteos (Figura 2 B). Para el caso de mesófilos aerobios los resultados fueron similares a los conteos para enterobacterias (Figura 2 C). En casi todos los casos la relación de lactobacilos y mesófilos aerobios fue inversa y muy similar con las enterobacterias. Estos datos concuerdan con observaciones previas en las cuales se sugiere que los lactobacilos inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, tales como Clostridia (*Clostridium difficile* y *C. perfringens*) y Enterobacteriaceae (*Salmonella typhimurium*), lo cual sucede a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), disminución del pH intestinal, producción de compuestos antimicrobianos y/o

competencia por nutrientes y sitios de adhesión (Gibson *et al.*, 1994. Hudault, *et al.* 1997. Lievin *et al.*, 2000). Trabajos anteriores han demostrado que la administración de algas marinas en la dieta disminuye las infecciones gástricas por enterobacterias en ratones (Wang *et al.*, 2000).

La composición global de la microbiota intestinal bacteriana más que la presencia de un único patógeno parece ser relevante en las diferentes patologías intestinales. El análisis de genes del ARNr 16S, amplificados directamente de las complejas comunidades, proporciona una eficiente estrategia para explorar la diversidad bacteriana de la microbiota (Pace 1977). En este trabajo se examinó la microbiota bacteriana asociada a mucosa, la cual directamente interacciona con el hospedador. Para obtener un análisis total de la diversidad bacteriana, se generaron secuencias parciales (OTUs - región V₄ y V₅) del gen de ADNr 16S, el cual ha sido reportado por ser una buena región para este tipo de análisis (Yu *et al.* 2004). Aproximadamente el 75% de los OTUs encontrados pueden ser asignadas a grupos filogenéticos de *Firmicutes* (*Lactobacillales*, *Clostridia* y *Mollicutes*) y el grupo restante a *Proteobacteria* (*Beta*, *Gama* y *Epsilon*) (Figura 19). Interesantemente, no se detectaron miembros del grupo de *Bacteroides* los cuales, junto con el grupo de *Clostridia*, usualmente están presentes en 50-90% de la microbiota anaerobia fecal (Holla *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2003). Lo encontrado en el trabajo concuerda con otros trabajos donde sugieren que la microbiota asociada a mucosa contiene bajos conteos del grupo de *Bacteroides* (Suau *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 2003), además se encontró un representante del género de *Helicobacter*, las cuales se ha demostrado que forman parte de la microbiota indígena intestinal (Monstein *et al.*, 2000).

La riqueza y diversidad de especies son variables importantes en el tracto gastrointestinal, ya que se ha visto mediante técnicas moleculares que estas, se ven disminuidas en procesos patológicos gastrointestinales (Seksik *et al.*, 2003; Ott *et al.* 2003). En todos los tratamientos la riqueza observada por SSCP, mostró un aumento significativo a las 2 semanas. A las 4 semanas la riqueza aumentó pero esta no fue significativa. Además la riqueza generada por *P. tricornutum* fue constante (18 +/-1) a lo largo de 6 semanas. En el caso de la diversidad a las 2 semanas solo fue mayor para los

casos *E. arborea* y *O. ficus-indica*, y a las 4 semanas aumentó la diversidad pero no presentaron diferencias significativas con respecto del control. En el caso de la homogeneidad (abundancia entre especies), los valores a las 2 semanas fueron menores que el control y a las 4 semanas fueron igual que el control, pero estos valores disminuyeron con el tiempo. Esto nos sugiere que algunas especies fueron dominando y a las 4 semanas todas presentaban abundancias homogéneas. Salvo en los casos de *S. horridum*, *P. tricornutum* y *O. ficus-indica* la homogeneidad se mantuvo constante en el tiempo.

Los análisis de grupos de los perfiles obtenidos mediante SSCP mostraron que los diferentes tratamientos fueron diferentes con respecto al control, pero no entre tratamientos a las 2 semanas, pero a las 4 semanas se agruparon por tipo de alga, ya sea macro o microalgas y los perfiles generados por *O. ficus-indica* no fueron diferentes a los del control (Figuras 9 y 10). Al hacer un análisis con respecto al tiempo (2, 4 y 6 semanas) los perfiles fueron diferentes en cada muestreo entre tratamientos y no dentro de los tratamientos (Figura 12-17), lo que muestra una variación de la comunidad bacteriana en el tiempo entre tratamientos y no dentro de los tratamientos (Bernbom, *et al.* 2006).

Con base en el análisis de componentes principales de los perfiles generados por SSCP a las 2 semanas de tratamiento, todos presentaron diferencia con respecto al control (Figuras 18 A, B y C). A las 4 semanas de tratamiento con macroalgas (*E. arborea* y *S. horridum*) y con la microalga *P. tricornutum* se presentaron diferencias comparados con los del control (Figuras 18 D, E y F). Esto nos sugiere que los diferentes tratamientos afectaron a la comunidad bacteriana intestinal asociada a mucosa durante estos tratamientos, salvo en el caso de *D. tertiolecta* y *O. ficus-indica* que su efecto fue solo en corto tiempo (4 semanas) y no se mantuvo.

La actividad de la comunidad microbiana intestinal juega un papel importante en el mantenimiento de la salud y etiología de las enfermedades intestinales en humanos. Se ha estimado que menos de 25% de las enfermedades intestinales tienen una base genética obvia, sugiriendo que la nutrición juega un papel mayor, y por lo cual se piensa

que es mediada, por muchas vías, por el efecto en la microbiota intestinal (Gill *et al.*, 2002). La actividad enzimática evaluada en este trabajo, mediante APIZYM, mostró incremento significativo para los tratados con *E. arborea*, *S. horridum*, *P. tricornutum* y *D. tertiolecta*, a las 2 semanas y una disminución a las 4 semanas para *E. arborea*, *S. horridum* y *P. tricornutum*, y a las 6 semanas no hubo cambios en ningún tratamiento. Realizando un análisis de la actividad enzimática total en el tiempo se observaron incrementos en los tratamientos con *O. ficus-indica* y el control y caso inverso para *P. tricornutum* (Figura 20 C). En los demás casos las actividades fueron oscilatorias.

De acuerdo con el análisis de componentes principales, fue posible visualizar diferencias en los perfiles enzimáticos intestinales en función de los distintos tratamientos. *E. arborea*, *S. horridum*, y *P. tricornutum* mostraron para todos los muestreos diferencias significativas en los perfiles enzimáticos (Figuras 21 A, B y C). En el caso de *D. tertiolecta* solo a las 2 semanas se observaron diferencias claras. Con respecto a *O. ficus-indica* se observaron diferencias solo hasta las 6 semanas de tratamiento. Esto muestra que solo *E. arborea*, *S. horridum*, y *P. tricornutum* influyen en los perfiles enzimáticos intestinales.

La fosfatasa alcalina es una enzima detoxificante de lipopolisacáridos, ya que desfosforila al lípido A de los mismos. El lípido A es la causa de la toxicidad de tales moléculas (Beumer *et al.*, 2003; Goldberg *et al* 2008), lo cual es importante ya que esto ayuda a evitar invasiones bacterianas a través de la mucosa intestinal. En este trabajo la actividad fosfatasa alcalina en los tratamiento con las distintas algas (*E. arborea*, *S. horridum*, *P. tricornutum* y *D. tertiolecta*) mostró incrementos a las 2 semanas. Sin embargo dicha actividad disminuyó a las 4 semanas en los tratamientos con *E. arborea*, *S. horridum* y *P. tricornutum* con valores que estuvieron por abajo del control y para el caso de *D. tertiolecta* dichos valores fueron iguales al que mostró el control (Figuras 22 y 23). A las 6 semanas todos los tratamientos fueron similares en actividad (Figura 24). Esto refleja la estimulación de la actividad fosfatasa alcalina solamente al inicio del tratamiento.

Con respecto a la actividad β -galactosidasa, numerosos estudios revelan los efectos benéficos asociados con la presencia de bifidobacterias en el intestino (Mitsuoka *et al.*, 1990; Yasui *et al.*, 1991; Saavedra *et al.*, 1994; Biffi *et al.*, 1997; Rowland *et al.*, 1998; Arunachalam *et al.*, 1999), las cuales juegan un papel importante en la fermentación de carbohidratos en el intestino (Gibson *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1999; Björkstén *et al.*, 2001; Guarner *et al.*, 2003). Este tipo de bacterias contienen numerosas glucosidasas (Schell *et al.*, 2002) y una de ellas muy importante en la fermentación de carbohidratos que no son digeridos por enzimas intestinales, es la β -galactosidasa (Van Laere *et al.*, 2000) que no solo es específica de bifidobacterias, si no de especies como *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Clostridium* (Sako *et al.*, 1999). Trabajos recientes han mostrado la relación de bifidobacterias y actividad β -galactosidasa, donde esta actividad en heces fue elevada en sujetos que consumieron bizques suplementados con inulina (Tannock *et al.*, 2004). En casos contrarios donde la microflora normal es afectada por diversas patologías esta actividad decrece (Favier *et al.*, 1997). La actividad β -galactosidasa intestinal en los tratamientos con las distintas algas (*E. arborea*, *S. horridum*, *P. tricornutum* y *D. tertiolecta*) mostró incrementos en esta actividad a las 2 semanas (Figura 22). A las 4 y 6 semanas no hubo diferencias con respecto del control, pero si se presentó una ligera tendencia a aumentar para los tratados con *E. arborea* y *D. tertiolecta* (Figuras 23 y 24).

La actividad esterasa (C4) describe de manera indirecta como se está consumiendo el butirato y dicho compuesto se sabe que es una importante fuente de energía para la mucosa intestinal (Scheppach *et al.*, 1987; Macfarlane *et al.*, 1997; Wachtershauser *et al.*, 2000), inhibe reacciones inflamatorias a través del factor de transcripción FN- κ B (Segain *et al.*, 2000; Luhrs *et al.*, 2001), incrementa la proliferación de células intestinales (Kien *et al.*, 2007) y tiene actividad antitumoral (Hague *et al.*, 1995). Además se ha documentado que la producción de butirato puede ser estimulado con la adición a la dieta de polisacáridos (Topping *et al.*, 2001; Schley *et al.*, 2002; López *et al.*, 2007). Además el butirato sólo (Gum *et al.*, 1987) y junto con lipopolisacáridos sinérgicamente incrementan la actividad fosfatasa alcalina (Fukushima *et al.*, 1998). Esta relación de actividad esterasa-fosfatasa alcalina se observó en el intestino de ratones alimentados con las algas a las 2 semanas de tratamiento (Figura

22). Cabe señalar que las muestras tomadas fueron de la mucosa (intestino delgado lavado sin heces) y que la mayoría de la actividad encontrada podría ser de los enterocitos, ya que la comunidad asociada a la mucosa, la cual esta constituida principalmente por especies de *Lactobacillus* (Ahrne *et al.*, 1998) en simbiosis con microorganismos que utilizan el lactato producido por *Lactobacillus* y estas producen butirato (Tsukahara *et al.*, 2002) el cual es consumido por los enterocitos. A las 4 y 6 semanas los niveles de actividad esterasa se mantuvieron sin diferencias con relación a los controles.

Las enzimas β -glucosidasa y β -glucuronidasa de la microbiota intestinal son enzimas dañinas para la salud ya que juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer intestinal (Fishman *et al.*, 1947; Finch *et al.*, 1986; Lidbeck *et al.*, 1992; Marino *et al.*, 1996). Además han sido consideradas como biomarcadores de riesgo para contraer cáncer. En humanos la glucuronidación (biotransformación) es el principal proceso de detoxificación y convierte un número grande de xenobióticos y sustancias endógenas en metabolitos más hidrofílicos (Gueraud *et al.*, 1998). Pero por otro lado, la β -glucuronidasa también es capaz de transformar selectivamente sustancias pro carcinógenas de baja toxicidad en agentes citotóxicos en el sitio del tumor, produciendo un efecto anti-tumorogénico y una reducción de la toxicidad sistémica (Chen *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la administración de prebióticos y especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* inhiben esta actividad microbiana (Rowland *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2005). En este trabajo la actividad β -glucuronidasa no presentó cambios comparados con el control en todo el trabajo.

Por otra parte se ha demostrado que la β -glucosidasa de los enterocitos tiene actividad contra compuestos fenólicos glicosilados (Day *et al.*, 1998), los cuales presentan actividad antioxidante y son más asimilables en el intestino que los no glicosilados (Hollman *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 2000). A las 2 y 6 semanas de tratamiento no se observaron niveles de actividad β -glucosidasa. Sin embargo, a las 4 semanas si se detectó actividad observando que los niveles presentes fueron menores significativamente en los organismos alimentados con *E. arborea*, *S. horridum* y *P. tricornutum* (Figura 23). Debido a que las muestras fueron tomadas del intestino

delgado se puede atribuir esta actividad al procesamiento y absorción de los compuestos fenólicos presentes en las algas marinas evaluadas, ya que las algas continen este tipo de compuestos (Ragan *et al.*, 1986; Jensen *et al.*, 1998; Xu *et al* 2003). Por otro lado existen especies de *Enterobacteriaceae* y *Bacteroides* que son estimuladas por estos compuestos y especies de *Clostridium* que son inhibidas (Smith *et al* 2004).

La fosfatasa ácida es una enzima implicada en la muerte celular y lisis celular (Sarraff *et al.*, 1986) en este trabajo se observó una disminución significativa en la actividad de fosfatasa ácida en el intestino de ratones alimentados con *E. arborea*, *S. horridum* y *P. tricorntutum* a las 4 semanas de tratamiento (Figura 23).

A las 6 semanas de tratamiento las enzimas que explican la variación entre tratamientos, esto analizado mediante ACP, fueron únicamente las peptidasas leucina arilamidasa y valina arilamidasa aunque solo la actividad valina arilamidasa mostró una disminución significativa a las 6 semanas (Figura 24), lo que sugiere que posiblemente especies de *Clostridium* estén siendo inhibidas, ya que estas son las principales bacterias proteolíticas del intestino (Hobson *et al.*, 1974).

Los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas inducen la producción de citocinas proinflamatorias, TNF- α e IL-6, así como IL-10 la cual es conocida por inhibir la síntesis de las anteriores citocinas (Mosmann *et al.*, 1994; Tracey *et al.*, 1993). Estas citocinas contribuyen a los mecanismos de defensa del hospedador en respuesta a la colonización o invasión bacteriana, y cuando son secretadas en exceso pueden inducir desordenes inmunopatológicos. Muchos de los componentes de la pared celular de bacterias Gram positivas (polisacáridos de la cápsula, peptidoglicano y ácido lipoteicoico) han mostrado estar relacionados en la inducción de citocinas. (Bhakdi *et al.*, 1991; Heumann *et al.*, 1994; Mancuso *et al.*, 1994; Muller-Alouf *et al.*, 1994; Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989; Soell *et al.*, 1995; Van Strijp *et al.*, 1993).

Se ha reportado que *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* estimulan la expresión de IL-10 y TNF- α (Lammers *et al*, 2002; Young *et al*, 2004), y esto es importante en la regulación de reacciones pro-inflamatorias y en la generación de una protección contra

infecciones mediante activación de una respuesta Th-2. Además que la producción de IL-10 es estimulada por bacterias coliformes sólo en células inducidas con INF- γ (Niers *et al.*, 2005, Gackowska *et al.*, 2006). En este trabajo no se detectó un efecto claro antiinflamatorio mediado por la IL-10 en ninguno de los tratamientos, ya que la expresión de esta citocina no mostró diferencias significativas. En animales alimentados con *E. arborea* y *P. tricornutum* se observó una tendencia a aumentar la producción de esta citocina (Figura 27). En el caso de la expresión de TNF- α en los tratamientos con *E. arborea* y *S. horridum* se observó una disminución significativa en la expresión del mismo mientras que con *P. tricornutum* y *D. tertiolecta* su expresión tendió a aumentar (Figura 28) y esto puede indicar la estimulación de la respuesta inmune no específica.

La cuantificación de citocinas de células mononucleares sanguíneas no se pudo llevar a cabo debido a que no se obtuvo ARN mediante el método utilizado en este trabajo.

CONCLUSIONES

Las algas modularon la microbiota intestinal asociada a mucosa, estimulando el crecimiento de enterobacterias y mesófilos aerobios cultivables, a diferencia del nopal que estimuló el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias, aunque los valores de homogeneidad obtenidos mediante el análisis por SSCP mostraron que las comunidades estaban siendo dominadas por algunas especies, las cuales mostraron altos porcentajes de identidad con miembros del género *Lactobacillus*. Las algas modularon la actividad hidrolítica intestinal mostrando un efecto específico sobre la actividad fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, esterasa (C 4) y esterasa lipasa (C 8) y una disminución en la actividad β -glucosidasa, fosfatasa ácida, leucina arilamidasa y valina arilamidasa. Las algas marinas no presentaron un efecto claro sobre el sistema inmune de la mucosa, aunque se observaron ligeras diferencias entre los niveles de expresión de IFN- γ entre los animales alimentados con las mismas en relación con los niveles observados en el control. Además las macroalgas (*E. arborea* y *S. horridium*) estimularon la expresión de TNF- α importante en la respuesta no específica.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos podemos concluir que las algas modulan la microbiota intestinal en ratones BALB/c y al mismo tiempo estimulan el metabolismo de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) sin mostrar un efecto importante sobre el sistema inmune de los mismos.

REFERENCIAS

- Abrams, S.A., I.J. Griffin, K.M. Hawthorne, L. Liang, S.K. Gunn, G. Darlington, And K.J. Ellis. 2005. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr.* 82: 471–476.
- Ahrne, S., S. Nobaek, B. Jeppsson, I. Adlerberth, A. E. Wold, and G. Molin. 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. Appl. Microbiol.* 85:88.
- Anderson, W.J., and Watson, L. 2001. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 406: 782-787.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., Bamba, T., and Hosoda, S. 1993. Diferencial cytokine regulation of complement C3, C4, and factor B synthesis in human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *J. Immunol.* 151: 4239-4247.
- Angstwurm K. *et al.* 1995. Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neuroscience Letters*, 191, 1-4.
- Arredondo-Vega, B.O., and Vazquez-Duhalt, R 1991. Aplicaciones biotecnologicas del cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo.* XVII: 99-111.
- AOAC. 1996. Official methods of analysis of AOAC international (16th ed.). Gaithersburg, USA.
- Arunachalam, K. D. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine, and technology. *Nutr. Res.* 19:1559-1597
- Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A: Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expresion of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol* 1994,24: 1097-1101.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920.
- Banchereau J Ryback ME “Interleukin 4” En *The cytokine handbook* 2nd ed Academic press, New York 1994: 99-127.
- Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R., Klaenhammer, T.R. 2003,: Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in

- fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:8957-8962.
- Bauer, H.G., Asp, N.G., Oste, R., Dahlqvist, A. and Fredlund, P.E. 1979. Effect of dietary fiber on the induction of colorectal tumors and fecal b-glucuronidase activity in the rat. *Cancer Research*. 39: 3752–3756.
- Benno, Y., Suzuki, K., Narisawa, K., Bruce, W.R., and Mitsuoka, T. 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol.* 30: 521-532.
- Bernbom, N., Nørrung, B., Saadbye, P., Mølbak, L., Vogensen, F.K., Rask., Licht, T.R. Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: Effects of time, host and gender. *J. Microbiol. Methods* 66: 87–95.
- Beumer C, *et al.* (2003) Calf intestinal alkaline phosphatase, a novel therapeutic drug for lipopolysaccharide (LPS)-mediated diseases, attenuates LPS toxicity in mice and piglets. *J Pharmacol Exp Ther* 307:737–744.
- Bhakdi, S., T. Klonisch, P. Nuber, and W. Fischer. 1991. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* 59:4614–4620.
- Biffi, A., D. Corandini, R. Larsen, L. Riva, and G. Di Fronzo. 1997. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human cancer cell line. *Nutr. Cancer* 28:93-99.
- Blaut, M. 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur. J. Nutr.* 41: 11S–16S.
- Bocker, U., DamiaoA., holt, L., han D.S., Jobin, C., Panja, A., Mayer, L., and sator R.B. 1998. Differential expression of interleukin 1 receptor antagonist isoforms in human intestinal epithelial cell. *Gastroenterology*. 115: 1426-1438.
- Bouhnik, Y., Pochart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I., and Rambaud, J.C. 1992. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology*. 102: 875-878.
- Bouhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Pochart, P., Marteau, P., Flourie, B., Bornet, F.,and Rambaud, J.C. 1999. Short-chain fructooligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacterias in healty humans. *J. Nutr.* 129: 113-116.

- Brandtzaeg P.E. 2002. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann. NY Acad. Sci.* 964 : 13-45.
- Brink, M., Todorov, S.D., Martin, J.H., Senekal, M., and Dicks, L.M.T. 2006. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *J. Applied. Microbiol.* 100: 813–820
- Buissiere, J., Fourcard, A., and Colobert, L. 1967. Usage de substrats synthitiques pour l'étude de l'Quipement cnzymatique de microorganisms. *C. R. Hebd. Stances Acad. Sci.* 264 : 415.
- Cebra, J.J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1046S-1051S.
- Chen, X., Wu, B. and Wang, P. G. 2003. Glucuronides in anti-cancer therapy. *Curr Med Chem C Anti-Cancer Agents.* 3 :139–150.
- Chertov, O., Michiel, D.F., Xu, L., Wang, J.M., Tani, K., Murphy, W.J., Longo, D.L., Taub, D.D., and Oppenheim, J.J. 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractan proteins released from inteleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271: 2935-2940.
- Choi, S.S., Kang, B.Y., Chung, M.J., Kim, S.D., Park, S.H., Kim, J.S., Kang, C.Y. and Ha, N.J. 2005. Safety Assessment of Potential Lactic Acid Bacteria *Bifidobacterium longum* SPM1205 Isolated from Healthy Koreans. *J. Microbiol.* 43: 493-498.
- Collins M D, Gibson G R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr.* 69: 1052–1057.
- Cox, .F.E.G. 2002. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 15: 595-612.
- Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of ood-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 353–361.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J. C., Morgan, M. R. A. and Williamson, G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 436:71–75.
- De la Noüe, J. and de Paw, N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances.* 6: 725-750.

- Denis F; Barriere E; Venot C; Ranger Rogez S; Virus and gastrointestinal infections. Durepaire N; Martin C; Ploy MC. *Ann Biol Clin Paris*. 1998 Jul-Aug; 55(4): 275-87
- Dinareello CA Wolf SM: The role of Interleukin-1 in disease. *N Eng J Med*. 1993; 328: 106-13.
- Donohue, D.C. and S. Salminen. 1996. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 5, 25-28.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Meyet, W., Ewe, K., and Meyer zum, B., Schenfelde, K. 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 102: 448-455.
- Eckmann, L., Jung, H.C., Sch, rer-Maly, C., Panja, A., Morzycka-Wroblecka, E., and Kagnoff, M.K. 1993. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology*. 105: 1689-1697.
- Edgeworth, J.D. 2005. Bacterial gastroenteritis. *Gastro. Infect.* 33(4): 73-77.
- Elson, C.O. 2000. Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* 119:254-257.
- Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon γ and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 571-611.
- Favier, C., Neut, C., Mizon, C., Cortot, A., Colombel, J.F. And Mizon, J. 1997. Fecal β -d-galactosidase production and bifidobacteria are decreased in crohn' s disease. *Digest. Dis Sci.* 42: 817-822
- Felley, C. and Michetti, P. 2003. Probiotics and Helicobacter pylori. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 785-791.
- Finch, P.J., Rogers, K., Williams, G.T. Beta-glucuronidase, LDH and LDH isoenzyme levels and screening for gastric cancer. *Eur J Surg Oncol.* 12: 253-256.
- Fishman, W. H., and Anlyan, A. J. 1947. β -Glucuronidase activity in human tissues. Some correlations with processes of malignant growth and with the physiology of reproduction. *Cancer Res.* 7: 808-817.
- Fukushima, K., Sasaki, I., Takahashi, K., Naito, H., Ogawa, H., Sato, S., Matsuno, S. 1998. Lipopolysaccharide Exhibits Synergistic Enhancement of Butyrate-Induced

- and Retinoic Acid-Mediated Alkaline Phosphatase Activity on Small Intestinal Epithelial Cell Line, IEC-6. *Digestion*. 59:683-688.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics, p. 1-18. In R. Fuller (ed.), *Probiotics-The Scientific Basis*, Chapman and Hall, London.
- Fuller, R., and Gibson, G. R. 1998. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clin. Microbiol. Infect.* 4:477-480.
- Gackowska, L., Michalkiewicz, J., Krotkiewski, M., Helmin-Basa, A., Kubiszewska, I., Dzierzanowska, D. 2006. Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Physiol. Pharmac.* 9:13-21.
- Gibson G R, Beatty E R, Wang X, Cummings J H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 1995;108:975-982.
- Gibson, G. R., and Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77:412-420.
- Gibson, G.R., and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotic. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Gill, C.I.R. and Rowland, I.R. 2002. Diet and cancer: assessing the risk. *Br J Nutr* 88, S73-S87.
- Goldberg, R.F., Austen, W.G., Zhang, X., Munene, G., Mostafa, G., Biswas, S., McCormack, M., Eberlin, K.R., Nguyen, J.T., Tatlidede H.S., Warren†, H.S., Narisawa‡ S.Milla´n‡, J.L. and Hodin, R.A. 2008. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(9): 3551-3556.
- Guarner, F. 2007. Studies with Inulin-Type Fructans on Intestinal Infections, Permeability, and Inflammation . *J. Nutr.* 137:2568S-2571S
- Guarner, F., and Malagelada, J.R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 361: 512-519.
- Gueraud, F. & Paris, A. 1998. Glucuronidation: a dual control. *Gen Pharmacol* 31, 683-688.
- Guignot, J., Peiffer, I., bernet-Camard, M.F., Lublin, D.M., Carnoy, C., Moseley, S.L., and Servin, A.L. 2000. Recruitment of CD55 and CD66e brush border-associated

- glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli* that infect the human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells. *Infect. Immun.* 68: 3554-3563.
- Gum, J.R., Kam, W.K., Byrd, J.C., Hicks, J.W., Sleisenger, M.H. and Kim YS. 1987. Effects of sodium butyrate on human colonic adenocarcinoma cells. Induction of placental-like alkaline phosphatase. *J Biol Chem.* 262:1092-1097
- Guzmán-Murillo, M. A., y Ascencio-Valle, F. 2000. Antiadhesive activity of sulfated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red-sore-disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology.* 30: 473 - 478.
- Hague, A., Elder, D.J.E., Hicks, D.J. and Paraskeva, A.C. 1995. Apoptosis in colorectal tumour cells-induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int. J. Cancer* 60: 400-406.
- Havenaar, R., Ten Brink, B. and Huis in't Veld, J.H.C.1992. Selection of strains for probiotic use. In *Probiotics: The Scientific Basis* ed. Fuller, R.. London: Chapman and Hall.
- Hecht, G. 1999. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am. J. Physiol.* 227: C351-C358.
- Hershberg, R. M. and Mayer L. F. 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells – polarity and complexity. *Immunol. Today.* 21: 123–128.
- Heumann, D., C. Barras, A. Severin, M. P. Glauser, and A. Tomasz. 1994. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* 62:2715–2721.
- Hirano: “Interleukin 6”, En *The Cytokine handbook* 2nd ed Academic press, New York 1994 p145-66.
- Hoentjen, F., G.W. Welling, H.J.M. Harmsen, X. Zhang, J. Snart, G.W. Tannock, K.L. T.A. Churchill, M. Lupicki, and L.A. Dieleman. 2005. Reduction of Colitis by Prebiotics in HLA-B27 Transgenic Rats Is Associated with Microflora Changes and Immunomodulation. *Inflamm Bowel Dis.* 11: 977–985.
- Hold, G. L., S. E. Pryde, V. J. Russell, E. Furrer, and H. J. Flint. 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39:33–39.

- Hollman, P. C. H., Van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M. and Katan, M. B. 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 418: 152–156.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 22:283–307.
- Hooper, L.V., and Gordon, J.I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 292: 1115-1118.
- Hopkins, M.J., Sharp, R., and Macfarlane, G.T. 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut.* 48: 198-205.
- Houghton LA, Green TJ, Donovan UM. 1997. Association between dietary fiber intake and the folate status of a group of female adolescents. *Am J Clin Nutr.* 66:1414–21.
- Hudault, S. V. Lie´vin, M.-F. Bernet-Camard, and A. L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513–518.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macro, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., and Thomas, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature.* 411: 559-603.
- Isolauri, E. 1997. Intestinal involvement in atopic disease. *J. Royal Soc. Med.* 90: 15-20.
- Jelinek, R. and S. Kolusheva. 2004. Carbohydrate Biosensors. *Chemical Review.* 104(12): 5987-6015.
- Jensen, P. R., Jenkins, K. M., Porter, D. and Fenical, W. 1998. Evidence that a New Antibiotic Flavone Glycoside Chemically Defends the Sea Grass *Thalassia testudinum* against Zoospore Fungi. *Appl Environ Microbiol.* 64(4):1490-1496.
- Hobson, P., N., Bousefield, S. & Summers, R. 1974 Anaerobic digestion of organic matter. *Critical Reviews in Environmental Control.* 4: 131-191.

- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M.K. 1995. A distinct array of pro-inflammatory cytokines is expressed in human colon endothelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95: 55-65.
- Kehrl JH, Alvarez-Mon M, Fauci AS: Type B TGF suppresses the grow and differentiation
- Kelso A, Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunology Today.* 1995; 16: 374-9
- Kien, C.L., R. Blauwiel, J.Y. Bunn, T.L. Jetton, W.L. Frankel and J.J. Hols. 2007. Cecal Infusion of Butyrate Increases Intestinal Cell Proliferation in Piglets. *J. Nutr.* 137: 916–922.
- Kimura, K., McCartney, A.L., McConell, M.A., and Tannock, G.W. 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacterias and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3394-3398.
- Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Lynch-Devaney, K., and Podolsky, D.K. 1995. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology.* 109: 516-523.
- Kleessen, B., Bezirtzoglou, E., Matto, J., 2000. Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2: 53– 63.
- Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. 2001. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr.* 86:291–300.
- Konstantinov, S.R., Awati, A., Smidt, H., Williams, B.A., Akkermans, A.D., de Vos, W.M. 2004. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl Environ Microbiol.* 70:3821-3830.
- Lahaye, M. (1991). Marine algae as sources of fibers: determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *Journal Science of Food Agricultural*, 54, 587–594.
- Lahaye, M., and Thibault, J.F. 1990. Chemical and physio-chemical properties of fibers from algal extraction by-products. In *Dietary Fibre: Chemical and Biological*

- Aspects (Southgate, D.A.T., Waldron, K., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R., eds), pp. 68-72, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
- Lammers, K.M., Helwig, U. and Swennen, E. *et al.* (2002) Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am. J. Gastroenterol.* 97:1182-1186.
- Langlands, S. J., Hopkins, M. J., Coleman, N., and Cummings, J. H. 2004. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut* 53:1610–1616.
- Lencer, W.I., Cheung, G., Strohmeier, G.R., Currier, M.G., Ouellette, A.J., Selsted, M.E., and Madara, J.L. 1997. Induction of the epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8585-8589.
- Licht, T.R., Hansen, M., Poulsen, M., and Dragsted, L.O. 2006. Dietary carbohydrate source influences molecular fingerprints of the rat faecal microbiota. *BMC Microbiol.* 30;6:98.
- Lidbeck, A., Nord, C.E., Gustafsson, J.A. and Rafter, J. 1992. Lactobacilli, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *Eur J Cancer Prev.* 1(5): 341-353.
- Lievin, V., L. Pfeiffer, S. Hudault, F. Rochat, D. Brassart, J.-R. Neeser, and A. L. Servin. 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microbiota exert antimicrobial activity. *Gut* 47:646–652.
- Lillard, J.W., Jr., Boyaka, P.N., Chertov, O., Oppenheim, J.J., and McGhee, J.R. 1999. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 651-656.
- López, M.G. and Urias-Silvas, J.E. 2007. Prebiotic effect of fructans from agave, dasyliirion and nopal. *Acta Hort. (ISHS)* 744:397-404.
- Luhrs, H., Gerke, T., Schaubert, J., Dusel, G., Scheppach, W. And Menzel, T. 2001. Cytokine-activated degradation of inhibitory kappa B protein alpha is inhibited by the short chain fatty acid butyrate. *Int. J. Colorect. Dis.* 16:195-201.
- Macfarlane GT, Cummings JC. 2002. Diet and the metabolism of intestinal bacteria. In: Brostoff J, Challacombe SJ, eds. *Food allergy and intolerance.* Amsterdam: Elsevier Science, 321–41.

- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R. 1997. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine. In: Mackie RI, White BH Eds. *Gastrointestinal Microbiology*. London, Chapman & Hall 1997; 269-318.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall. 8va. Ed. Madrid (España). 1064p.
- Mancuso, G., F. Tomasello, C. von Hunolstein, G. Orefici, and G. Teti. 1994. Induction of tumor necrosis factor alpha by the group- and type-specific polysaccharides from type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 62:2748–2753.
- Mangin, I., Bonnet, R., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Sutren, M., Bouhnik, Y., Neut, C., Collins, M.D., Colombel, J.F., Marteau, P. and Dore, J. 2004. Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50:25–36.
- Männel DN: Biological aspects of tumor necrosis factor. *Immunobiology.* 1986; 172: 283-90
- Marino, O., Concho, H., Silva, T., Tauil, E., Solano, P., Machado, D., Chacón, A. 1996. Enzymes in gastric juice. An aid in the diagnosis of gastric cancer. *Acta Cient Venez.* 47:172-177.
- Matricardi, P.M., and Bonini, S. 2000. High microbial turnover rate preventing atopy: a solution to inconsistencies impinging on the hygiene hypothesis? *Clin. Exp. Allergy.* 30 1506-1510.
- Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.* 6:263–268.
- Monstein, H.J., Tiveljung, A., Kraft, C.H., Borch, K. And Jonasson, J. 2000. Profiling of bacterial flora in gastric biopsies from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis and histologically normal control individuals by temperature gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence análisis. *J. Med. Microbiol.* 49: 817-822
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR: Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.
- Moreau, M.C., Thomasson, M., Ducluzeau, R., and raidbaud, P. 1986. Kinetics of establishment of digestive microflora in the human newborn infant as a function of the kind of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* 26: 745-753.

- Mosmann TR Properties and functions of Interleukin 10. *Adv Immunol* 1994; 56: 1-26
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986; 136:2348-57.
- Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989; 7:145-73.
- Muller-Alouf, H., J. E. Alouf, D. Gerlach, J.-H. Ozegowski, C. Fitting, and J.-M. Cavailon. 1994. Comparative study of cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus pyogenes* superantigenic erythrotoxic toxins, heat-killed streptococci, and lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 62:4915–4921.
- Nasu T. *et al.*, 1997. Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice. *Immunology Letters*, 59 : 47-51.
- Niers, L. E. M., Timmerman, H. M., Rijkers, G. T., van Bleek, G. M., van Uden, N. O. P., Knol, E. F., Kapsenberg M. L., Kimpfen, J. L. L. and Hoekstra, M. O. 2005. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy*. 35:1481–1489
- O’Sullivan, G. C., Kelly, P., O’Halloran, S., Collins, C., Collins, J.K., Dunne, C. and Shanahan, F. 2005. Probiotics: An emerging therapy. *Curr. Pharm. Des.* 11:3–10.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M. Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., and Cho, J.H. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature*. 411: 603-606.
- Pace, N.R. 1977. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276(5313): 734-40.
- Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., rambaud, J.C. 1992. Survival of bifidobacterias ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 78-80.

- Raffi, F., Ruseler-van, Embden, J.G.H., van Lieshout L.MC. 1999. Changes in bacterial enzymes and PCR profiles of fecal bacteria from a patient with ulcerative colitis before and after antimicrobial treatments. *Dig Dis Sci* 44:637–642.
- Ragan, M.A. & Glombitza, K.W. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. In: *Progress in Phycological Research* (F. E. Round & D. J. Chapman, eds), vol. 4. Biopress, Bristol, UK, pp. 129–241.
- Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, *et al.* 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol.* 37: 105–118.
- Riesenfeld-Orn, I., S. Wolpe, J. F. Garcia-Bustos, M. K. Hoffmann, and E. Tuomanen. 1989. Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect. Immun.* 57:1890–1893.
- Rinkinen, M., Westermarck, E.S., Salminen, S. and Ouwehand, A.C. 2003. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet Microbiol.* 97: 55–61.
- Rivero-Urgell, M., & Santamaria-Orleans, A. (2001). Oligosaccharides: Application in infant food. *Early Human Development*, 65, S43–S52.
- Roberfroid, M. 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *J. Nutr.* 137: 830S–837S.
- Roberfroid, M.B., Van Loo, J.A., Gibson, G.R. 1998. The bifidogenic nature of inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.* 128: 11-19.
- Rowland, I. R., C. J. Rumney, J. T. Coutts, and L. C. Lievens. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 19:281-285.
- Rowland, I.R. 1995. Toxicology of the colon: role of the intestinal microflora. In: Gibson GR, Macfarlane GT, eds. *Human colonic bacteria. Role in nutrition and, physiology, and pathology.* Boca Raton: CRC Press. 155–74.
- Saavedra, J. M., N. A. Bauman, I. Oung, J. A. Perma, and R. H. Yolken. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344:1046-1049
- Sako, T., K. Matsumoto, and R. Tanaka. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. *Int. Dairy J.* 9:69–80.

- Salminen, S., Isolauri, E. and Salminen, E. 1996. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pac J Clin Nutr* 5, 53–56.
- Sambrook, J., Fritsch, F.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2da Ed. USA.
- Sarraf, C.E., Bowen, I.D. 1986. Kinetic studies on a murine sarcoma and an analysis of apoptosis. *Br. J. Cancer*. 54:989-998.
- Saxelin, M., H. Rautelin, S. Salminen, and P.H. Makela. 1996. Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 5, 331-335.
- Scanlan, P.D., F. Shanahan, C. O'Mahony, and J.R. Marchesi. 2006. Culture-Independent Analyses of Temporal Variation of the Dominant Fecal Microbiota and Targeted Bacterial Subgroups in Crohn's Disease. *J. Clin Microbiol.* 44(11): 3980–3988.
- Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D., Arigoni, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14422–14427
- Scheppach, W.M., Fabian, C.E., and Kasper, H.K. 1987. Fecal short-chain fatty acid (SCFA) analysis by capillary gas-liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.* 46:641-6. Printed
- Schley, P.D. and Field, C.J. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Brit J Nutr* 87: 221–230.
- Schultz C, Berg FVD, Fiebo W. 1999. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology*. 117:1089–97.
- Schwieger, F., and C. C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-singlestrand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4870–4876.
- Segain, J.P., delaBletiere, D.R., Boureille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H.M. and Glamiche, J.P. (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition : implications for Crohn's disease. *Gut*. 47:397-403.

- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G. 2003. Alterations of dominant fecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 52:237–42.
- Shannon C. E., and W. Weaver. 1963. *The mathematical theory of communications*. University of Illinois Press, Urbana.
- Shoaf, K., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D., and Hutkins, R.W. 2006. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infect. Immun.* 74(12):6920-6928.
- Smith, A.H., and R.I. Mackie. 2004. Effect of Condensed Tannins on Bacterial Diversity and Metabolic Activity in the Rat Gastrointestinal Tract. *Applied Environ. Microbiol.* 70(2): 1104–1115.
- Soell, M., M. Diab, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, C. Herbelin, B. Poutrel, and J.-P. Klein. 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect. Immun.* 63:1380–1386.
- Southgate, D.A. 1990. The role of dietary fibre in the diet. *J. R. Soc. Health.* 110(5): 174-8
- Stephen AM, Cummings JH. 1980. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature.* 284:283–4.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 65:4799–807.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 122:44–54.
- Swofford DL (2003) PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takada, H., Hirooka, T., Hiramatsu, Y. and Yamamoto, M. 1982. Effect of β -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Research* 42, 331–334.
- Takatsu, K. 1992. Interleukin 5. *Curr Opin Immunol.* 4:299-306.
- Tannock, G.W., Munro, K., Bibiloni, B., Simon, M.A., Hargreaves, P., Gopal, P., Harmsen, H. and Welling, G. 2004. Impact of Consumption of Oligosaccharide-

- Containing Biscuits on the Fecal Microbiota of Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2129–2136
- Tannock, G.W., Munro, K., Marmsen, H.J., Welling, G.W., Smart, J., and Gopal, P.K. 2000. Analysis of the fecal microflora of humans subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2578-2588.
- Toida, T., A. Chaidedgumjorn & R. J. Linhardt. 2003. Structure and bioactivity of sulfated polysaccharides. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 15(81): 29-46.
- Topping, D.L. and Clifton, P.M. (2001) Short chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 81, 1031-1064.
- Topping, D.L., Fukushima, M. and Bird, A.R. 2003. Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proc Nutr Soc* 62, 171–176.
- Tracey, K. J., and Cerami, A. 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:317–343.
- Tracey, K.J. and Cerami, A. 1994. Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med* 45:491–503, 1994.
- Tsukahara, T., Koyama, K., Okada, M. and Ushida, K. 2002. Stimulation of butyrate production by gluconic acid in pig cecal digesta and identification of butyrate producing bacteria. *Journal of Nutrition* 132, 2229–2234.
- Van Laere, K.M.J., Abee, T., Schols, H.A., Beldman, G., Voragen, A.G.J. 2000 Characterization of a novel β -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 66:1379–1384.
- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., van den Heuvel, E. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr.* 81(2):121-132

- Van Strijp, H. A. Verbrugh, J. Verhoef, and A. Fleer. 1993. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect. Immun.* 61:4167–4172.
- Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10 : 411-53.
- Vaughan, E.E., Heilig, H.G.H., Zoetendal, E.G., satokari, R., Collins, J.K., Akkermans, A.D.L., and d Vos, W.M. 1999. Molecular approaches to study probiotic bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* 10: 400-404.
- Vidal, K., Donnet-Hughes, A. and Granato, D. 2002. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus johnsonii* Strain La1 and *Lactobacillus acidophilus* Strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 70, 2057–2064.
- Wachtershauser, A. and Stein, J. 2000. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal disease. *Eur. J. Nutr.* 39: 164-171.
- Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K., and Alatossava, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 297-303.
- Wang, X., Gibson, G.R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol.* 75:373-380.
- Wang, X., Heazlewood, S.P., Krause, D.O., Florin, T.H. 2003. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol.* 95(3): 508-520.
- Wang, X., Willén, R., and Wadström T. 2000. Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Antimicrob Agents Chemother* 9, 2452-2457.
- Wehkamp, J., K.F. Klaus R. Herrlinger, C.L. Bevins and E.F. Stange. 2005. Mechanisms of Disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology.* 2(9): 406-415.
- Weiner, H.L. 1997. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today.* 18: 335-343.

- Williams BA, Verstegen MWA, Tamminga S. 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr Res Rev.* 14:207–27.
- Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W., and Couteau, D. 2000. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 16–22.
- Xu, N., Fan, X., Yan, X., Li, X., Niu, R. and Tseng, C.K. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry.* 62(8):1221-1224.
- Yalpani, M. 1988. *Studies in organic chemistry 36. Polysaccharides. Syntheses, modifications and structure/property relations.* Elsevier Science Publishers, New York. 499 p.
- Yasui, H., and M. Ohwaki. 1991. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *Bifidobacterium breve. J. Dairy Sci.* 7:1187-1195.
- Young, S.L., Simon, M.A., Baird, M.A., Tannock, G.W., Bibiloni, R., Spencely, K., Lane, J.M., Fitzharris, P., Crane, J., Town, I. Addo-Yobo E., Murray, C.S., and Woodcock, A. 2004. Bifidobacterial Species Differentially Affect Expression of Cell Surface Markers and Cytokines of Dendritic Cells Harvested from Cord Blood. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:4: 686–690
- Yu, Z. and Morrison, M. 2004. Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied Environ Microbiol.* 70(8): 4800–4806.
- Zoetendal, E.G. Akkermans, A.D., and De Vos, W.M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3854-3859.
- Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol.* 68:3401–7.

ANEXO I

Fragmento	% Identidad	Organismo	Acceso al GenBank
1F	98%	<i>Ralstonia pickettii</i> strain 149	EU730922.1
3F	98%	<i>Lactococcus garvieae</i> strain Fars-86	EU727199.1
4F	98%	<i>Lactobacillus apodemi</i> strain: DSM 16634	AB370874.1
5F	98%	<i>Helicobacter ganmani</i> strain MIT 99-5102	AY631951.1
6F	91%	<i>Ralstonia</i> sp. 12I	AY191849.1
8F	96%	<i>Burkholderia</i> sp. Aek11	EU741004.1
10F	99%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain IG9	EU780913.1
13F	98%	<i>Lactococcus garvieae</i> strain Fars-86	EU727199.1
14F	96%	<i>Streptococcus suis</i> strain NML 070844	EU477176.1
17F	99%	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain NS98	EU180606.1
21F	98%	<i>Mycoplasma sualvi</i>	AF412988.1
24F	98%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	AM743169.1
27F	92%	<i>Ralstonia</i> sp. 1P-1-B16	EU704724.1
28F	95%	<i>Lactobacillus apodemi</i> strain: DSM 16634	AB370874.1
29F	100%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain IG9	EU780913.1
30F	97%	<i>Lactococcus garvieae</i> strain Fars-86	EU727199.1
32F	95%	<i>Lactobacillus hilgardii</i> strain: T3-12	AB368911.1
42F	99%	<i>Segmented filamentous</i> bacteria	D86305.1
44F	97%	<i>Segmented filamentous</i> bacteria	D86305.1
45F	97%	<i>Lactobacillus reuteri</i>	EF187261.1
51F	100%	<i>Lactobacillus apodemi</i> strain: DSM 16634	AB370874.1
52F	92%	<i>Uncultured bacterium</i> clone MO21	EU037195.1
53F	98%	<i>Segmented filamentous</i> bacteria	D86305.1
56F	99%	<i>Helicobacter</i> sp. 'Eaton 94-536'	U96299.1
58F	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain: T10-14	AB368909.1
64F	98%	<i>Uncultured bacterium</i> clone MD4_aap50e04	EU508753.1
66F	98%	<i>Uncultured bacterium</i> clone WD5_aak38g09	EU510651.1
69F	91%	<i>Clostridium</i> sp. strain RPec1	Y15985.1
71F	91%	<i>Clostridium</i> sp. partial strain RPec1	Y15985.1
72F	99%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain IG9	EU780913.1
76F	97%	<i>Lactococcus garvieae</i> strain Fars-86	EU727199.1
77F	90%	<i>Enterococcus italicus</i> strain: NRIC 0105	AB362594.1
78F	95%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain IG9	EU780913.1
80F	99%	<i>Lactobacillus apodemi</i> strain: DSM 16634	AB370874.1
82F	98%	<i>Helicobacter ganmani</i> strain MIT 99-5102	AY631951.1
85F	99%	<i>Helicobacter ganmani</i> strain MIT 99-5102	AY631951.1
89F	99%	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain NS98	EU180606.1
90F	90%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain IG9	EU780913.1
91F	98%	<i>Helicobacter ganmani</i> strain MIT 99-5102	AY631951.1
94F	98%	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain 17-2b	EU688978.1
96F	99%	<i>Lactobacillus apodemi</i> strain: DSM 16634	AB370874.1