

Evaluación de los componentes de suero de queso en la modulación del microbioma intestinal de sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal *in vitro*

Nazareth Patricia Cabrera González

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación de los componentes de suero de queso en la modulación del microbioma intestinal de sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal *in vitro*

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Nazareth Patricia Cabrera González

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Evaluación de los componentes de suero de queso en la modulación del microbioma intestinal de sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal *in vitro*

Nazareth Patricia Cabrera González

Resumen. La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es una alteración inflamatoria de las mucosas capaz de generar cronicidad en un individuo. Los alimentos funcionales promueven la salud intestinal, entre ellos, el suero de queso. Los compuestos bioactivos en el suero incluyen proteínas y galacto-oligosacáridos (GOS) conocido por sus efectos benéficos para la salud intestinal. El objetivo consistió en evaluar el efecto de los compuestos bioactivos de la proteína de suero de queso, dentro de ellos, proteína aislada de suero (WPI), proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos (WPI-GOS), y glicomacropéptidos (GMP) en la modulación del microbioma intestinal en sujetos con IBD *in vitro*. El tipo de estudio fue descriptivo exploratorio. GMP, WPI y WPI-GOS se incubaron con enzimas digestivas, pepsina y pancreatina, para simular la digestión gástrica a 37 °C. Para la fermentación fecal *in vitro* las muestras fecales de donantes con IBD se incubaron con componentes de suero de queso después de la digestión *in vitro* (IVD) durante 24 h. La abundancia relativa de bacterias fecales se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (q-PCR) y la producción de ROS se analizó mediante el ensayo de diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Los compuestos bioactivos derivados del suero de queso modulan el crecimiento bacteriano en heces de individuos con IBD *in vitro*, sin embargo, no tienen efecto significativo en la producción de ROS.

Palabras clave: Compuestos bioactivos, galacto-oligosacáridos, glicomacropéptidos, microbioma, proteína de suero.

Abstract. Inflammatory bowel disease (IBD) is an alteration characterized by intestinal inflammation. There are functional foods that promote intestinal health such as whey protein. Whey is a byproduct of the cheese industry. Bioactive compounds in cheese whey include proteins and galacto-oligosaccharides (GOS) known for their beneficial effects on intestinal health. The objective of the study was to evaluate if bioactive components of cheese whey, after *in vitro* digestion, such as Glycomacropeptide (GMP), whey protein isolate (WPI) and a galacto-oligosaccharide-rich whey protein isolate (WPI-GOS); can modulate microbial populations and production of reactive oxygen species in feces from donors with IBD *in vitro*. The study was descriptive cross-sectional observational. GMP, WPI and WPI-GOS were incubated with digestive enzymes, pepsin and pancreatin, to simulate gastric and duodenal digestion at 37 °C. For *in vitro* fecal fermentation samples from donors with IBD were incubated with cheese whey components after *in vitro* digestion (IVD) for 24 h. The relative abundance of bacteria was analyzed by real-time q-PCR and the production of reactive oxygen species (ROS) was analyzed by the dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. Bioactive compounds derived from cheese whey can modulate bacterial growth in feces from donors with IBD *in vitro*, however, they have no significant effect on ROS production.

Key words: Bioactive compounds, galacto-oligosaccharide, glycomacropeptides, microbiome, whey protein.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES	25
5. RECOMENDACIONES	26
6. LITERATURA CITADA	27
7. ANEXOS.....	32

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Acrónimos.....	3
2. Caracterización química de los ingredientes funcionales de suero utilizados para experimentos <i>in vitro</i> de acuerdo con la hoja de datos técnicos de cada fabricante.	4
3. Número de tratamientos.....	7
4. Número de repeticiones por análisis.	7
5. Grado de hidrólisis de los compuestos de suero después de la digestión <i>in vitro</i>	8
6. Resultados del análisis estadístico individual de los nueve sujetos enfermos, de especies reactivas al oxígeno (ROS) con diferencia estadística significativa y tratamiento que presentó dicha diferencia.	10
7. Resultados de análisis estadístico de especies reactivas al oxígeno (ROS) por cada tratamientos.....	12
8. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y sujetos con IBD tratados con GMP, WPI y WPI-GOS con diferencia estadística significativa.	15
9. Influencia de los tratamientos en la abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS con diferencia estadística significativa.	15
Figuras	
1. Viabilidad de las células HT29-MTX a diferentes concentraciones de muestras de sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal <i>in vitro</i>	9
2. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en donantes con IBD y donantes enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, sujetos 1, 2 y 3.	10
3. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en donantes con IBD y donantes enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, sujetos 4, 5 y 6.	11
4. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en donantes con IBD y donantes enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, sujetos 7, 8 y 9.	11

Figuras	Página
5. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos.	12
6. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) comparados con sujetos enfermos (IBD) tratados con WPI.	13
7. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos enfermos (IBD) comparados con sujetos con IBD tratados con WPI-GOS.	13
8. Unidades de fluorescencia relativas (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos enfermos con IBD comparados con sujetos con IBD tratados con GMP.	14
9. Abundancia relativa de <i>Bacteroidetes</i> spp. expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	16
10. Abundancia relativa de <i>Firmicutes</i> spp. expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	17
11. Abundancia relativa de <i>Bacteroides fragilis</i> expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	18
12. Abundancia relativa de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	18
13. Abundancia relativa de <i>Roseburia hominis</i> expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	19
14. Abundancia relativa de <i>Roseburia intestinalis</i> expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	20
15. Abundancia relativa de <i>Ruminococcaceae</i> expresada en log de ADN en ag/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	20
16. Abundancia relativa de <i>Ruminococcus torques</i> expresada en log de ADN en ag/10 ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	21
17. Abundancia relativa de <i>Eubacterium Rectale</i> expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	22
18. Abundancia relativa de <i>Escherichia coli</i> expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.	23

Figuras	Página
19. Abundancia relativa de <i>Campylobacter jejuni</i> expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.....	23
20. Abundancia relativa de <i>Akkermansia muciniphila</i> expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.....	24

Anexos	Página
1. Fermentación fecal in vitro de compuestos de suero de queso después de la IVD.	32
2. Protocolo catálogo no. D6010 del “Miniprep ADN fecal Zymo-Research”	3
3. iProof High-Fidelity PCR kit	4
4. Resultados del analisis estadístico de la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal y sujetos con dicha enfermedad, tratados con GMP, WPI, WPI-GOS.	5
5. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.....	5
6. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS. expresando la media en log ADN (fg)/10ng y desviación estándar	6
7. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, expresando la media en Log AD (zg)/10ng y desviación estándar.	6
8. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, expresando la media en log ADN (ag)/10ng y desviación estándar	7
9. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, expresando la media en log ADN (yg)/10ng y desviación estándar.....	7
10. Resultados del análisis estadístico de la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos con IBD sometidos a los diferentes tratamientos, media y desviación estándar expresados en RFU.	7
11. Estructura de los componentes bioactivos.	8
12. Bacterias utilizadas para PCR, secuencia de iniciadores y temperatura de hibridación.	39

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD por sus siglas en inglés), es una alteración caracterizada principalmente por inflamación intestinal, pudiendo resultar crónica para el paciente. Entre los tipos más comunes de esta enfermedad se encuentra la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Matsuoka y Kanai 2015). Los pacientes con IBD presentan una reducción significativa en las bacterias benéficas que se encuentran en el tracto intestinal durante los últimos años se ha observado un aumento significativo de la misma, por lo tanto, se ha convertido en un desafío para la salud en todo el mundo. Estudios recientes refieren que la IBD está relacionada con cambios en el estilo de vida, higiene e industrialización de los países. Entre las principales regiones con un aumento en esta enfermedad se encuentran América del sur, Europa del este, Asia y África. En países en vías de desarrollo de América Central y Sur América los estudios sobre esta enfermedad son escasos (Simian 2014).

Se define microflora intestinal al conjunto de bacterias que habitan en el intestino, de gran importancia para la salud en los humanos, por sus funciones, determina tanto la recolección de energía como el almacenamiento de las proteínas y producción de varios metabolitos (Moreno-Perez *et al.* 2018). La relación que existe entre el huésped y la microbiota intestinal se conoce como simbiosis, en donde el huésped, proporciona el ambiente adecuado para el crecimiento de microorganismos que se encuentran presentes en la microbiota intestinal (Matsuoka y Kanai 2015). Además de realizar otras funciones, como la producción de moco, inhibiendo directamente el crecimiento de microorganismos patógenos perjudiciales para el huésped, compitiendo tanto por nutrientes como el espacio habitual de los microorganismos benéficos, aumentando la función de barrera de las células epiteliales, liberación de péptidos antimicrobianos y la producción de inmunoglobulinas (Nagao-Kitamoto y Kamada 2017).

La microbiota intestinal queda determinada principalmente por la dieta habitual de un individuo. A lo largo de los años, se ha descubierto el uso de alimentos funcionales y compuestos bioactivos que promueven la salud de los individuos, estos compuestos, se encuentran en diferentes alimentos, entre ellos el suero de queso. El suero es el líquido restante que se obtiene de la precipitación y eliminación de la caseína durante la fabricación de queso (Flaim *et al.* 2017). La proteína del suero constituye aproximadamente un 20% de la proteína de la leche y se considera básicamente como una mezcla de proteína globular, como beta-lactoglobulina (β -LG), alfa-lactoglobulina (α -LA), inmunoglobulinas y albúmina de suero bovino (BSA) por sus siglas en inglés, la cual, al llegar al microbiota intestinal causa un efecto positivo en el mismo, al liberar péptidos bioactivos (Ma *et al.* 2016). Los péptidos son compuestos que se encuentran presentes en la secuencia de las proteínas, los cuales, debido a la acción de las enzimas proteolíticas se liberan y al suceder esta liberación los péptidos son capaces de regular las funciones fisiológicas del cuerpo.

(Mohanty *et al.* 2016). Estos péptidos se encuentran presentes en alimentos funcionales los cuales pueden ser aprovechados por el sujeto, mediante la hidrólisis enzimática, fermentación microbiana y la digestión gastrointestinal de proteínas de alimentos (Ma *et al.* 2016).

La proteína de suero debido a las características que posee como antiinflamatorio, inmunestimulador y antidiabético se consideran benéficas para la salud intestinal del huésped, (Akal 2017). No obstante, aun conociendo los beneficios que el suero posee, en la gran mayoría es descartado por los productores de queso, lo cual, ocasiona un problema de contaminación ambiental (Poveda 2013).

La industria alimentaria ha avanzado en términos de investigación sobre cómo aprovechar las proteínas de suero de leche como alternativa para luchar contra las enfermedades intestinales (Patel 2015). Debido al aumento de IBD, investigar sobre opciones para reducir esta incidencia se convierte un tema importante hoy en día (Ng, *et al.* 2017). Consecuencia de lo anterior el presente estudio evaluó el efecto de los compuestos bioactivos presentes en la proteína de suero de queso tales como proteína aislada de suero (WPI), proteína de suero aislada enriquecida con galacto-oligosacáridos (WPI-GOS), y glicomacropéptidos (GMP) en la modulación del microbioma intestinal en sujetos con IBD *in vitro* el cual contó con los siguientes objetivos:

- Evaluar el comportamiento de los componentes del suero de queso después de la digestión *in vitro* en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal *in vitro*.
- Determinar la capacidad de modulación bacteriana de los componentes de suero de queso después de la digestión *in vitro* en heces de sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal *in vitro*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 1. Acrónimos

Acrónimo	Significado
IBD	Inflammatory bowel disease.
WPI	Whey protein isolate.
WPI-GOS	Galacto-oligosaccharide rich whey protein.
GMP	Glycomacropeptide.
BSA	Bovine serum albumin.
ROS	Reactive oxygen species.
FBS	Fetal bovine serum.
IVD	<i>In vitro</i> digestion.
MPC	Milk protein concentrate.
RFU	Relative Fluorescent Units
LPS	Lipopolysaccharide.
PCR	Polymerase Chain Reaction.
PBS	Phosphate buffered saline.
RFU	Relative fluorescence units.
CV	Coeficiente de variación.

Localización del estudio.

El estudio se realizó en el laboratorio de nutrición y ciencia de alimentos “AgriLife Research”, en la universidad de TEXAS A&M, en College Station, Texas, Estados Unidos. El financiamiento de este proyecto fue brindado por “The Build Dairy Program”.

Productos de suero comercial.

Los ingredientes funcionales derivados del suero, el aislado de proteína de suero (WPI), glicomacropéptidos (GMP) se obtuvieron de Agropur, Eden Prairie, MN. El aislado de proteína de suero rico en galacto-oligosacáridos (WPI-GOS) utilizados en experimentos *in vitro* se obtuvo de “FrieslandCampina Ingredients” (Países Bajos). La caracterización química de cada ingrediente de suero de leche se muestra el cuadro 2.

Cuadro 2. Caracterización química de los ingredientes funcionales de suero utilizados para experimentos *in vitro* de acuerdo con la hoja de datos técnicos de cada fabricante.

	Tratamientos		
	GMP	WPI	WPI-GOS
Proteína (%) Base seca	92.8	97.8	17.5
Lactosa	0.76	N. D	36.0
pH	6.4	6.9	6.0-7.0
GOS (galacto-oligosacáridos)	-	-	28.5
GMP, % de proteína	94.9	-	-

(Agropur and frieslandcampina ingredientes 2019)

GMP: glicomacropéptidos.

WPI: proteína aislada de suero.

WPI-GOS: proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

El lactosuero es obtenido por medio de la coagulación de la caseína, esta coagulación por medio del cuajo produce un fragmento *k*-caseína llamado glicomacropéptido (GMP), el cual, genera un interés debido a la composición nutricional que posee. El GMP puede separarse por medio de la tecnología de membranas con el objetivo de utilizarse como ingrediente alimenticio. La lactosa puede transformarse en diferentes productos, entre los cuales se encuentran los galacto-oligosacáridos, los cuales, son compuestos prebióticos derivados de la hidrólisis de la lactosa por medio de la enzima β -galactosidasa. En el anexo se puede observar la estructura de los componentes bioactivos (Gómez y Sánchez 2019).

Fase 1. Análisis de viabilidad celular, hidrólisis enzimática de los componentes de suero de queso y análisis de especies reactivas al oxígeno.

Cultivo celular. La línea de células de copa secretadora de moco, HT29-MTX, fue donada por “Vanesa Lievin le Moal” (UMRS CNRS BioCIS. Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry). Las células HT29-MTX se cultivaron por separado rutinariamente utilizando “high glucose Dulbecco’s modified Eagle’s médium” (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 10% (v/v) suero bovino fetal (FBS) por sus siglas en inglés, 1% (v/v) aminoácidos no esenciales y 1% (v/v) penicilina-streptomina (Life Technologies, Carlsbad, CA). La línea celular se mantuvo a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

Hidrólisis enzimática de muestras. La digestión gástrica y duodenal fue simulada considerando características de un individuo sano. El aislado de proteína de suero rico en galacto-oligosacáridos (WPI-GOS), aislado de proteína (WPI) y glicomacropéptido (GMP) fueron incubados con enzimas digestivas, pepsina y pancreatina para simular la digestión gástrica y duodenal. Los compuestos de suero de queso fueron homogenizados con agua purificada (20 g/200mL). A fin de simular la digestión gástrica, el pH de la solución se

ajustó a 3.0 utilizándose una solución a una concentración de 6 M de HCl, para ello 7.52 g de pepsina se añadieron con una incubación durante 40 min a 37 °C. Con el fin de detener la reacción de la enzima en la solución, la muestra fue colocada en un recipiente con hielo. La digestión duodenal fue simulada ajustando nuevamente el pH a 7 usando una solución a una concentración de 6 M de NaOH e incubado con 3.68 g de pancreatina durante 1 h a 37 °C. Los compuestos de lactosuero de queso digeridos *in vitro* (IVD) fueron sometidos a diálisis durante 48 h en una membrana de celulosa con un corte de 2 kDa para eliminar el agua purificada (Hernandez-Ledesma 2007). El grado de hidrolisis de cada compuesto se muestra en el cuadro 4.

Viabilidad celular. Las células HT29-MTX se sembraron en una placa inferior de 96-orificios de fondo negro y se incubaron durante 24 h para permitir el acoplamiento de la célula antes del tratamiento con IBD W1 (1, 2, 3 y 4% v/v) durante 48 h. La viabilidad celular fue evaluada por el kit de ensayo de “Resazurin *in vitro* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)” siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La intensidad de la fluorescencia se midió utilizando un lector de microplacas “FLUOstar Omega BMG Labtech Inc, Durham, NC” fijado en una excitación de 560 nm y emisión de 590 nm. Los resultados de viabilidad celular se cuantificaron como porcentaje de los controles tratados después del ajuste de fondo, como se describió anteriormente (Fang 2018).

Fase 2. Fermentación de muestras de donantes sanos y enfermos con los componentes de suero de queso y análisis de producción de especies reactivas al oxígeno.

Fermentación fecal *in vitro* de compuestos de suero de queso después de la digestión *in vitro*. Se recolectaron muestras fecales de donantes sanos y de donantes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) para ambos casos no se aplicaron recordatorios de 24 h de alimentos, datos antropométricos, tipo y calidad de fibra consumida. El experimento del cultivo fecal, un pre-cultivo fue preparado con heces diluidas con solución salina amortiguada con fosfato (PBS por sus siglas en inglés) en una relación de 1:10 w/w, la muestra fue sometida a homogenización con el objetivo de producir líquido fecal, el cual se utilizó para la inoculación de un pre-cultivo (1:10 v/v) en medio estéril pre-reducido con un pH 7,0 y fue incubado durante 13 h a 37 °C bajo anaerobiosis y agitación. Posterior a dicha incubación, se preparó un cultivo con un 10% (v/v) del pre-cultivo que contenía los compuestos de suero liofilizado después de la IVD. Las heces de los individuos fueron cultivadas con compuestos después de la digestión *in vitro* IVD, e incubados durante 24 h a 37 °C bajo anaerobiosis y agitación. (Anexo 1) como se describió anteriormente con ligeros ajustes (Noratto 2016).

Ensayo de especies reactivas al oxígeno (ROS). La determinación de ROS fue evaluada como se describió previamente con ligeras modificaciones (Fang 2018). Inicialmente, las células HT29-MTX fueron sembradas en una placa de 96-orificios de fondo negro y después del acoplamiento de las células al fondo de la placa durante 24 h, las células HT29-MTX fueron tratadas con WPI, GMP y WPI-GOS (100 µg ml⁻¹) e incubadas durante 2 h a 37 °C a modo de inducir la producción de Ros. La producción se detectó utilizando 10 µm de diclorofluorescina diacetato (DCFH-da) durante 30 min a 37 °C. Las unidades de fluorescencia relativa (RFU) por sus siglas en inglés, fueron monitoreadas con una emisión

de 520 nm y una excitación de 480 nm en un lector de microplacas “FLUOstar Omega BMG Labtech Inc, Durham, NC”. Luego de monitorear la señal de fluorescencia, las células fueron contadas y posteriormente, las células HT29-MTX fueron lavadas en dos oportunidades con PBS y fijadas con 100% de metanol durante 3 min. El metanol fue removido y las células fueron teñidas con 1mg ml⁻¹ “Janus green” durante 3 min, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió 50% metanol con 50% agua purificada. El conteo de células se determinó en un lector de placas fijado en una absorbancia de 654 nm.

Fase 3. Análisis de abundancia relativa de bacterias.

Extracción de ADN. El ADN fue extraído de 150 mg de cada muestra fecal después de la fermentación *in vitro* usando el catálogo no. D6010 del “Miniprep ADN fecal Zymo-Research” (Anexo 2) y se cuantificó con el ensayo en tiempo real de reacción en cadena de la polimerasa (q-PCR). A cada muestra se agregó 150 mg de muestra fecal a un “ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm)” y se diluyó con 750 uL “Bashingbead buffer”, posteriormente se agitó a máxima velocidad durante 3 min, y se procedió a centrifugar las muestras en una microcentrífuga a 11,000-x g durante 1 min. sobrenadante que resultó de la centrifugación se transfirió a un tubo de “Zymo-spin III-F filter” en un tubo de colección y fue centrifugado a 8.000-x g durante 1 min. Seguidamente, 1,200 uL de “Genomic lysis buffer” se añadieron al “Zymo-spin III-F filter” con el tubo de colección y se procedió a mezclar la solución. Posteriormente, 800 uL de la mezcla fueron transferidos a “ZYMO-spin IIC column” en un tubo de colección, el cual se centrifugó a 10,000-x g durante 1 min. El flujo fue descartado a través del tubo de recolección y se repitió este paso. A continuación, 200 uL de “DNA Pre-Wash Buffer” se añadieron al “ZYMO-Spin column IIC” en un nuevo tubo de recolección y se centrifugó a 10,000-x g durante 1 min. Posteriormente 500 uL de “g-DNA Wash Buffer” fueron agregados al “Zymo-Spin™ IIC Column” y centrifugados a 10,000-x g durante 1 min. El “ZYMO-spin II-C column” fue transferido a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL, y posteriormente 50 uL de “DNA Elution Buffer” fueron añadidos, seguidamente fue centrifugado a 10.000-x g durante 30 segundos. El “Zymo-spin III-HRC” se colocó en un tubo de recolección limpio con el añadido de 600 uL de solución “PREP”, y centrifugado a 8,000-x g durante 3 min. El ADN removido se transfirió a un “Zymo-spin III-HCR” preparado y transferido a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL, por último, fue centrifugado a 16,000-x g durante 3 min.

Amplificación de ADN. La amplificación de ADN fue realizada usando “iProof High-Fidelity PCR kit” (Anexo 3) para ello se preparó una mezcla del iniciador a una concentración de 10uM utilizando el iniciador delantero e inverso de cada bacteria a analizar. Para el análisis q-PCR se realizó una mezcla en un volumen de 20 uL, incluyendo 4uL de “5X iproof buffer HF”, 0.4 uL de “dNTP Mix”, 1uL de mezcla de iniciador, 14.4 uL de plantilla de ADN y 0.2 uL de “Iproof DNA polymerase”. Las reacciones se continuaron a 98 °C durante 30 ciclos para la desnaturalización inicial, 98 °C durante 10 s para desnaturalización, 72 °C para extensión durante 30 s y 72 °C para una extensión final durante 10 min. Cada reacción se ejecutó con la temperatura de hibridación óptima para cada iniciador utilizando un “Eppendorf MasterCycler Gradient Thermal Cycler”.

La cuantificación del ADN. El análisis en tiempo real de reacción en cadena de la polimerasa (q-PCR) fue realizado para estudiar la abundancia relativa de bacterias presentes en las muestras, tanto en los donantes sanos y enfermos, así como en las muestras de los donantes a los cuales se les aplicó el tratamiento con WPI, WPI-GOS y GMP. Se realizaron análisis de q-PCR en 10 muestras de donantes sanos, 9 muestras de donantes con IBD, 9 muestras de IBD + WPI, 9 muestras de IBD + WPI-GOS y 9 muestras de IBD + GMP. Las muestras fueron cuantificadas con iniciadores de bacterias utilizando el sistema “Real time q-PCR CFX384 BIO-RAD”. Las muestras fueron preparadas para la lectura de abundancia relativa se utilizó una microplaca de 384 orificios para PCR. Inicialmente una solución de trabajo fue preparada a una concentración de 5 ng/uL utilizando 3 uL de cada muestra y agua purificada en diferentes cantidades. La mezcla principal fue preparada con 10 uL de “SYBR green”, 0.8 uL del iniciador y 5.2 uL de agua purificada. La solución de trabajo se mezcló durante 1 minuto. En la microplaca de PCR, se añadió 8 uL de mezcla principal a cada orificio y se completó el volumen de 10 uL con 2uL de solución de trabajo de cada muestra. La placa se centrifugó a 2,000 revoluciones por minuto (RPM) durante 1 minuto. Las condiciones para la lectura PCR fueron de 95 °C durante 2 minutos y 40 ciclos a 95 °C durante 5 s y 10 s a la temperatura de hibridación óptima.

Análisis estadístico. Se usó un Diseño Completamente al Azar con un tamaño de muestra de 19 individuos, de los cuales, 10 fueron individuos sanos y 9 individuos con IBD La producción de ROS en los sujetos sanos y sujetos con IBD, IBD+GMP, IBD+WPI y IBD+WPI-GOS y la abundancia relativa de bacterias entre los sujetos sanos y sujetos con IBD, IBD+GMP, IBD+WPI, IBD+WPI-GOS se evaluaron mediante un análisis unidireccional de varianza (ANDEVA) $p < 0.05$, el análisis se realizó utilizando el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4®). los tratamientos y número de repeticiones se muestran en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Número de tratamientos.

Número de tratamiento	Tratamientos
Tratamiento 1	Sanos
Tratamiento 2	Enfermos
Tratamiento 3	GMP
Tratamiento 4	WPI
Tratamiento 5	WPI-GOS

Cuadro 4. Número de repeticiones por análisis.

Tratamientos	Repeticiones ensayo ROS sujeto individual	Repeticiones ensayo abundancia relativa.	Repeticiones ensayo ROS grupos.
5	4	10	10

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1. Análisis de viabilidad celular e hidrólisis enzimática de los componentes de suero de queso.

Se puede observar en el cuadro 5 el grado de hidrólisis obtenido de cada uno de los tratamientos utilizados en el estudio.

Cuadro 5. Grado de hidrólisis de los compuestos de suero después de la digestión *in vitro*.

Muestra	Grado de hidrólisis (%)
GMP	12.55 ± 4.50
WPI	16.34 ± 2.00
WPI-GOS	32.21 ± 2.24
MPC	12.20 ± 2.12

GMP: glicomacropéptidos

WPI: proteína aislada de suero

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galaco-oligosacáridos.

MPC: concentrado de proteína de leche.

Viabilidad celular. Los ensayos de proliferación y viabilidad celular son importantes para poder evaluar la función celular. Estos se muestran en la figura 1.

El control es igual a las células sin ningún tratamiento. Las células HT29-MTX fueron tratadas con diferentes concentraciones de muestras de sujetos con IBD (1, 2, 3 y 4% v/v) durante 48 h. la viabilidad celular se determinó mediante el kit de ensayo “Resazurin *in vitro* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)”. Los resultados estadísticos indican una $P < 0.0001$, por lo tanto, por lo menos uno de los tratamientos es diferente, un R^2 de 0.76 y un CV de 15.47. Como se observa en la figura 1, existe diferencia estadística significativa en los tratamientos comparados con el control, encontrando así, una disminución en la viabilidad celular en los tratamientos, lo cual, se da, debido al estrés que las células sufren al estar en presencia de la muestra fecal.

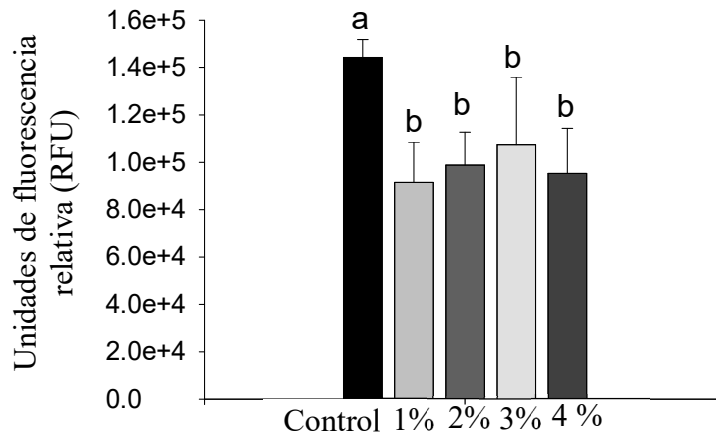


Figura 1. Viabilidad de las células HT29-MTX a diferentes concentraciones de muestras de sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal *in vitro*. Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

Fase 2. Fermentación de muestras de donantes sanos y enfermos con los componentes de suero de queso y análisis de producción de especies reactivas al oxígeno.

Resultados de unidades de fluorescencia relativa en la producción de ROS. Los mecanismos implicados en las enfermedades inflamatorias intestinales son las especies reactivas al oxígeno (ROS) se encuentran asociados principalmente al desequilibrio entre ROS y la actividad antioxidante, generando un estrés oxidativo (Balmus *et al.* 2016). Definido como un proceso de desequilibrio o perturbación en la producción y la eliminación de especies reactivas al oxígeno, las cuales conducen a un daño celular (Pereira *et al.* 2015). Las ROS pueden incluir superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), radical hidroxilo ($-OH$), radical hidropéroxido (O_2H), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (O_2) (Balmus *et al.* 2016). Un nivel bajo de ROS es importante para los mecanismos celulares, incluidos la defensa contra patógenos. El aumento en la producción de ROS puede ser consecuencia de factores externos, tales como, enfermedades hereditarias que afectan principalmente el transporte de electrones o trastornos metabólicos (Pereira *et al.* 2015). Las ROS generadas durante el estrés oxidativo, pueden ser reducidas mediante procesos antioxidantes (Garg *et al.* 2018). La proteína de suero posee diferentes características benéficas para la salud, entre ellas, tiene la capacidad de prevenir el estrés oxidativo y enfermedades relacionadas con este (Mann *et al.* 2019).

Se ha establecido que los sujetos que sufren de enfermedad inflamatoria intestinal presentan una sobreproducción de ROS. Así como también, se conoce que existe un descenso en la abundancia relativa de los filos *Firmicutes* spp. y *Bacteroidetes* spp y un aumento en la abundancia relativa de actinobacteria y proteobacteria (Balmus *et al.* 2016).

Las RFU fueron determinadas por medio del ensayo “DCFH-DA” en células HT29-MTX con una confluencia de 80-90%, pretratadas con sobrenadantes fecales (2% v/v) de sujetos con IBD y sujetos con IBD+WPI, IBD+GMP y IBD+WPI-GOS durante 2 horas.

En las figuras 2, 3 y 4 se observa un aumento en la producción de ROS en sujetos enfermos tratados con GMP y WPI-GOS comparados con sujetos enfermos sin ningún tratamiento. Del análisis estadístico individual de los nueve sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal, los sujetos S3, S4, S5 y S6 muestran diferencia estadística significativa. (cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados del análisis estadístico individual de los nueve sujetos enfermos, de especies reactivas al oxígeno (ROS) con diferencia estadística significativa y tratamiento que presentó dicha diferencia.

Sujeto	Probabilidad	R ² %	CV %	Tratamiento con diferencia estadística
S3	<0.044	82	10.08	GMP
S4	<0.010	82	6.94	WPI-GOS
S5	<0.045	73	8.32	WPI-GOS
S6	<0.001	89	6.62	*

(*) todos los tratamientos, poseen diferencia estadística significativa, comparados con los sujetos con IBD.

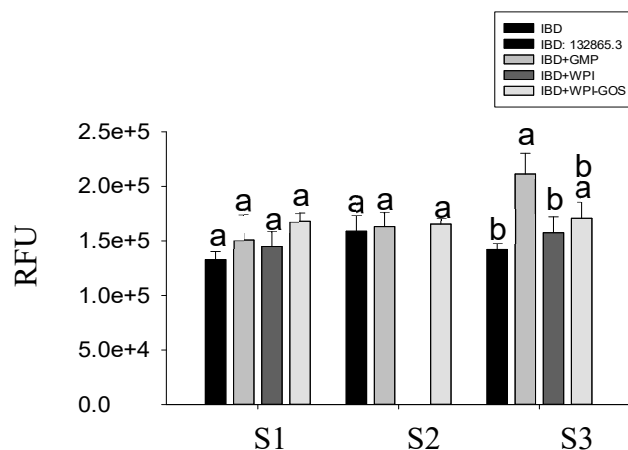


Figura 2. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en donantes con IBD y donantes enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, sujetos 1, 2 y 3.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

IBD: sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal.

GMP: glicomacropéptidos.

WPI: proteína aislada de suero.

WPI-GOS: proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

S1: sujeto número 1. S2: sujeto número 2 S3: sujeto número 3

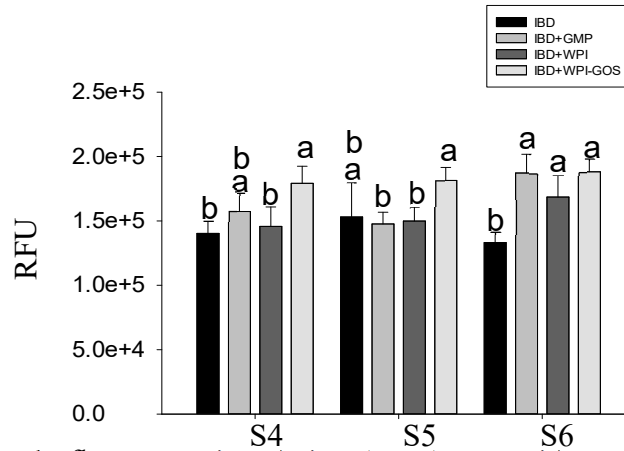


Figura 3. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en donantes con IBD y donantes enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, sujetos 4, 5 y 6.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

IBD: sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal.

GMP: glicomacropéptidos.

WPI: proteína aislada de suero.

WPI-GOS: proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

S1: sujeto número 1. S2: sujeto número 2. S3: sujeto número 3.

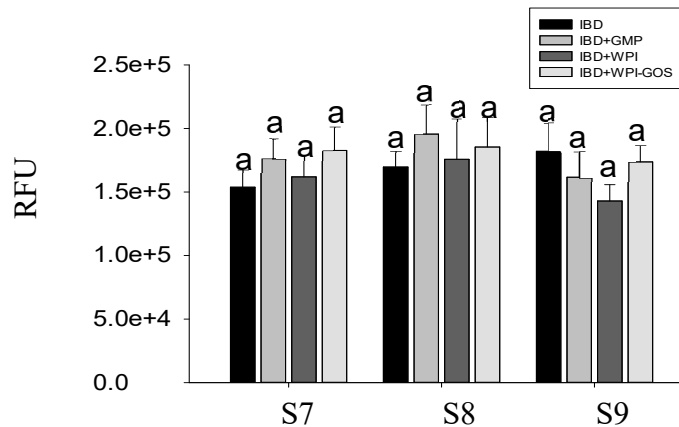


Figura 4. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en donantes con IBD y donantes enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, sujetos 7, 8 y 9.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa

IBD: sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal.

GMP: glicomacropéptidos.

WPI: proteína aislada de suero.

WPI-GOS: proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

S1: sujeto número 1.

S2: sujeto número 2.

S3: sujeto número 3.

Los resultados estadísticos obtenidos muestran que no existe diferencias estadísticas significativa en los tratamientos comparados con los sujetos que padecen IBD. En el análisis realizado individualmente a los nueve sujetos con IBD tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, sí se observó diferencia estadística significativa en cuatro de ellos, por lo tanto, los resultados de cada grupo se ven afectados por los cinco sujetos que no presentaron diferencia estadística significativa. La variación entre individuos se debe a que la microbiota intestinal, características antropométricas, genética y tipo de dieta difiere entre individuos (Kim *et al.* 2017). los resultados estadísticos se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Resultados de análisis estadístico de especies reactivas al oxígeno (ROS) por cada tratamientos.

Tratamiento	Probabilidad	R ²	CV%
SANOS vs IBD	<0.1811	56	11.69
IBD+WPI vs IBD	<0.4171	44	11.46
IBD+WPI-GOS vs IBD	<0.6900	32	4.990
IBD+GMP vs IBD	<0.1538	56	10.41

SANOS: individuos sanos

IBD: individuos con enfermedad inflamatoria intestinal.

WPI: proteína aislada de suero.

WPI-GOS: proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

Para el análisis de la producción de especies reactivas al oxígeno las RFU fueron determinadas por medio del ensayo “DCFH-DA” en células HT29-MTX con una confluencia de 80-90%, tratadas con sobrenadantes fecales (2% v/v) de sujetos sanos y sujetos enfermos durante 2 horas. Las células sin tratamiento con sobrenadante fecal se utilizaron como control.

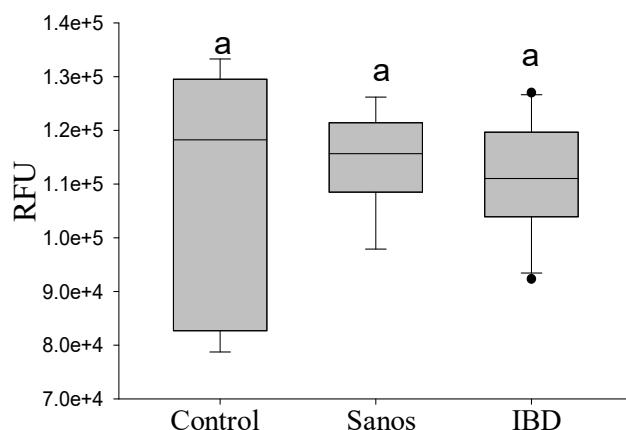


Figura 5. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos. Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

Control: células sin ningún tratamiento. Sanos: muestra de los individuos sanos.

IBD: muestra de los individuos con enfermedad inflamatoria intestinal

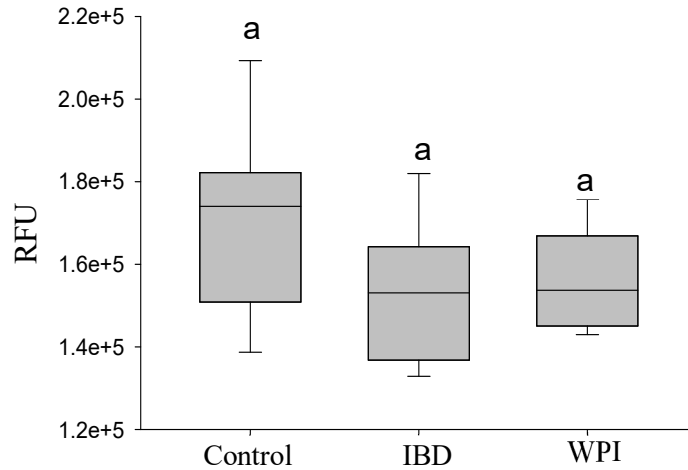


Figura 6. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) comparados con sujetos enfermos (IBD) tratados con WPI. Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

Control: células sin ningún tratamiento.

IBD: muestra de los individuos con enfermedad inflamatoria intestinal

WPI: individuos enfermos tratados con proteína aislada de suero.

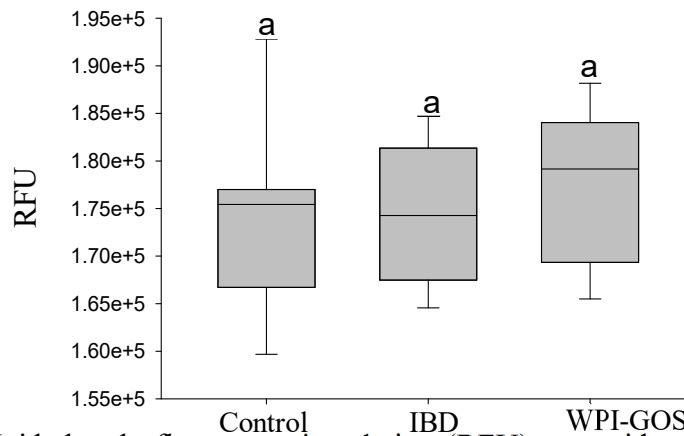


Figura 7. Unidades de fluorescencia relativa (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos enfermos (IBD) comparados con sujetos con IBD tratados con WPI-GOS. Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

Control: células sin ningún tratamiento.

IBD: muestra de los individuos con enfermedad inflamatoria intestinal

WPI-GOS: individuos enfermos tratados con proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

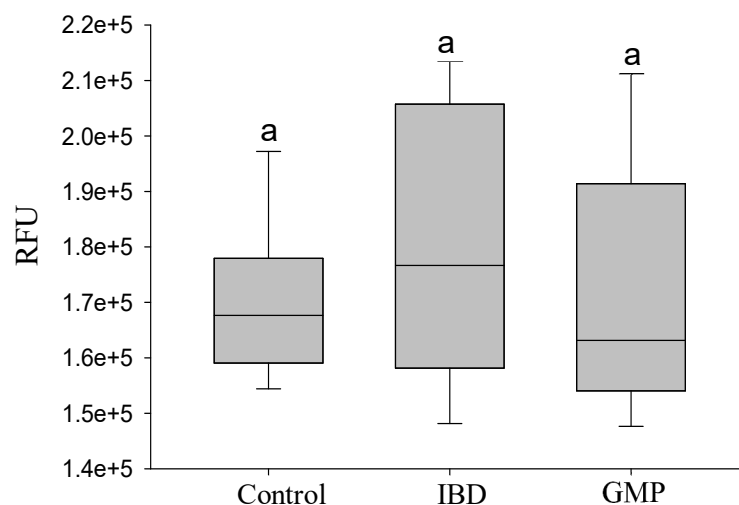


Figura 8. Unidades de fluorescencia relativas (RFU) corregidas con “Janus green” en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos enfermos con IBD comparados con sujetos con IBD tratados con GMP.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

Control: células sin ningún tratamiento.

IBD: muestra de los individuos con enfermedad inflamatoria intestinal

GMP: individuos enfermos tratados con glicomacropéptidos.

Fase 3. Análisis de abundancia relativa de bacterias.

Resultados obtenidos de abundancia relativa de bacterias. Pese a que, se desconoce aún la causa principal de IBD, ésta puede estar asociada a factores como la genética del paciente y sus antecedentes, así como, los factores ambientales (Matsuoka 2015). De la misma manera factores endógenos y exógenos tienen influencia sobre la microbiota intestinal, como ser, tipo de dieta, respuesta inmune del huésped e infecciones (Lynch *et al.* 2016).

La microbiota intestinal se encuentra densamente poblada por una gran cantidad de bacterias, no obstante, la diversidad de la microbiota intestinal difiere entre individuos. Dentro de los cuatro filos que predominan en la microbiota intestinal, se encuentran, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Los dos primeros filos representan aproximadamente el 90% de la composición total de la microbiota, por otra parte, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* se presentan regularmente en bajas cantidades (Kim *et al.* 2017). Estudios indican que los glicomacropéptidos cumplen un papel importante en la modulación de la microbiota intestinal de los sujetos (Kavadi *et al.* 2017). Así como también se ha demostrado que los galacto-oligosacáridos promueven el crecimiento de bacterias benéficas para la salud de los sujetos, que ayudan a prevenir y a tratar la disbiosis gastrointestinal que se relaciona con enfermedades autoinmunes (Smith 2018).

Inicialmente se identificó la abundancia relativa de los filos *Bacteroidetes* spp. y *Firmicutes* spp. ya que, estos representan el mayor porcentaje de la microbiota intestinal. Los resultados obtenidos en el análisis estadístico que se muestran en los cuadros 8 y 9 indican que sí existe una diferencia estadística significativa dentro de estos filos, por lo tanto, se procedió a

estudiarlos de una forma más específica. Esto se realizó mediante la evaluación de la abundancia relativa de especies de bacterias que se encuentran dentro de estos filos.

Cuadro 8. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y sujetos con IBD tratados con GMP, WPI y WPI-GOS con diferencia estadística significativa.

Filo	Género /especie/familia	P < 0.05	R ²	CV%
<i>Bacteroidetes</i> spp.	-	0.0019	58.8	15.35
<i>Firmicutes</i> spp.	-	0.0242	48.8	5.540
<i>Proteobacteria</i>	<i>Escherichia coli</i> .	<0.0001	65.0	16.97
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	0.0050	55.0	28.14
<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia hominis</i>	<0.0001	68.0	18.00
<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia intestinalis</i>	0.0268	48.0	11.60
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium rectale</i>	0.0269	50.0	34.00
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	0.0015	59.0	9.300

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

Cuadro 9. Influencia de los tratamientos en la abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS con diferencia estadística significativa.

Tratamiento	Filo	Especie/familia	Efecto
GMP	<i>Firmicutes</i> spp		Aumento
WPI-GOS	<i>Bacteroidetes</i> spp		Disminución
	<i>Proteobacteria</i>	<i>E. coli</i>	Aumento
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>B. fragilis</i>	Disminución
	<i>Firmicutes</i>	<i>E. rectale</i>	Disminución
	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	Disminución
	<i>Firmicutes</i>	<i>R. intestinalis</i>	Disminución
WPI	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	Disminución

R. hominis posee diferencia estadística significativa entre sujetos sanos comparados con sujetos enfermos, los tratamientos no poseen diferencia estadística significativa comparado con los sujetos enfermos.

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

Tal como se observa en la figura 9, existe una reducción significativa de *Bacteroidetes* en sujetos con IBD tratados con WPI-GOS en comparación con los sujetos sanos. El filo *Bacteroidetes* es uno de los más predominantes en la microbiota intestinal. Se ha demostrado que existe una diversidad reducida en la microbiota intestinal de pacientes con IBD (Matsuoka *et al.* 2015).

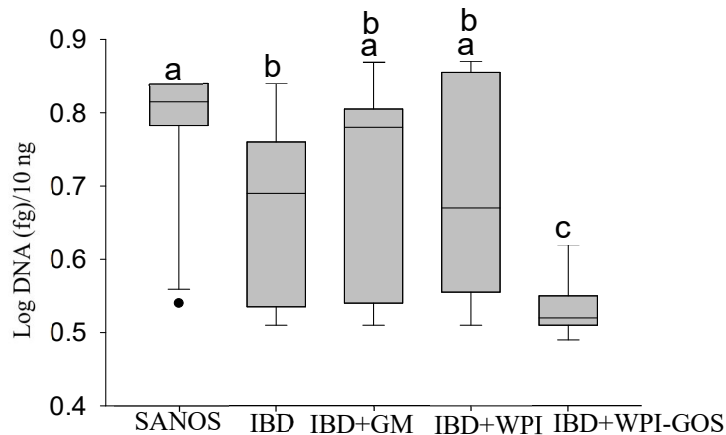


Figura 9. Abundancia relativa de *Bacteroidetes* spp. expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos. WPI: Proteína aislada de suero WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal.

Tal como se observa en la figura 10, los sujetos con IBD tratados con GMP muestran una similitud con sujetos sanos, representando una mayor abundancia relativa de este filo, en comparación con los sujetos con IBD y sujetos con IBD+WPI y IBD+WPI-GOS. Se conoce que el filo *firmicutes* es predominante en la microbiota intestinal, sin embargo, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, consecuencia de esta patología, a nivel colónico presentan una reducción característica de este filo (Balmus *et al.* 2016).

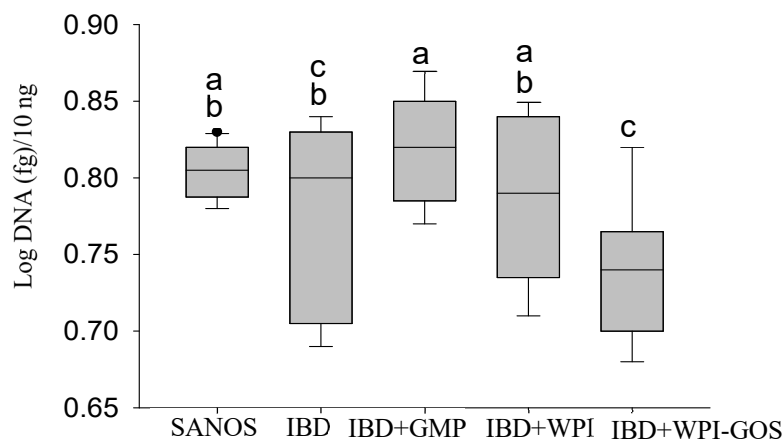


Figura 10. Abundancia relativa de *Firmicutes* spp. expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal.

Puede observarse en la figura 11, que el tratamiento de IBD+WPI-GOS presenta una diferencia significativa comparada con los sujetos sanos, al existir una reducción de abundancia relativa de *B. fragilis*, el colon presenta una estructura formada por dos capas, la capa externa, está compuesta principalmente por bacterias que degradan la mucina y se caracteriza por la presencia de *Bacteroides acidifaciens*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacteriaceae* y *Akkermancia muciniphila*, mientras que la capa interna se caracteriza por presentar una comunidad más restringida, la cual incluye *Bacteroides fragilis* y *Acinetobacter* (Donaldson *et al.* 2015). Puede observarse que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal presentan niveles bajos de *Bacteroides fragilis* (Zhou 2016). Paradójicamente se ha demostrado que *B. fragilis* ayuda en la formación del sistema inmunitario del huésped, sin embargo, también es responsable de la formación de abscesos, por lo tanto, se considera una bacteria tanto benéfica como patógena que se encuentra en el microbioma intestinal (Wexler HM 2007).

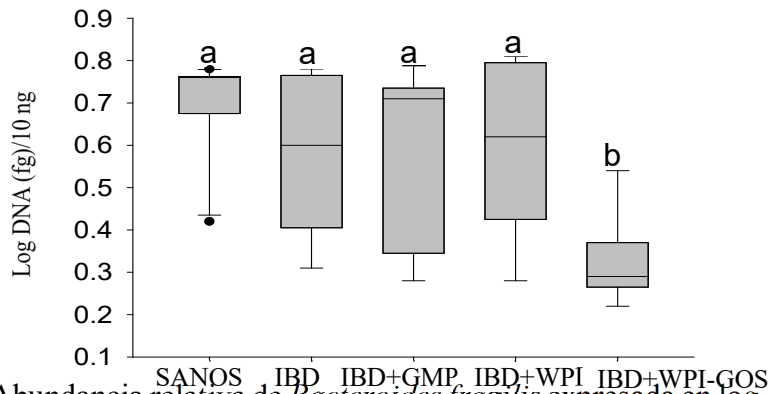


Figura 11. Abundancia relativa de *Bacteroides fragilis* expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

En los pacientes con IBD, existe una reducción en la diversidad de la microbiota intestinal observada, diversos estudios han informado una reducción en el filo *firmicutes*. Dentro de este filo se observa una disminución significativa en el grupo de *Clostridium leptum* especialmente en *F. prausnitzii* (Matsuoka *et al.* 2015). Sin embargo, en la figura número 12 no se presentó diferencia estadística significativa entre tratamientos.

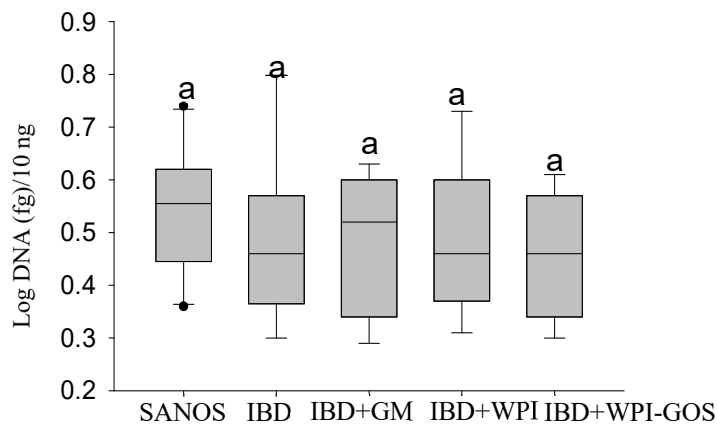


Figura 12. Abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

En la figura 13, puede observarse una diferencia estadística donde se muestra una disminución entre los pacientes enfermos comparados con los pacientes sanos, sin embargo, no existe diferencia estadística entre los tratamientos, comparados con los sujetos enfermos, La presencia de *R. hominis* en el intestino, promueve la salud intestinal al momento de fomentar la función de la barrera intestinal y la inmunidad innata (Patterson *et al.* 2017). En pacientes con IBD existe una reducción en cuanto a bacterias productoras de butirato, el cual, actúa como una fuente de energía para la células y el mantenimiento de la salud en la mucosa colónica, dentro de estas bacterias encontramos *R.hominis* y *E.rectale*, que pertenecen al filo de *firmicutes* (Nagao-kitamoto *et al.* 2017).

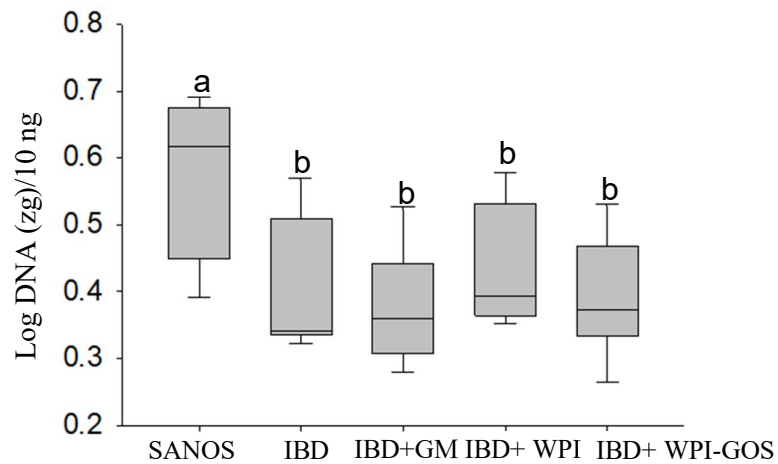


Figura 13. Abundancia relativa de *Roseburia hominis* expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos. WPI: Proteína aislada de suero WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

En la figura 14, puede observarse una diferencia estadística significativa entre la abundancia relativa en sujetos enfermos tratados con WPI-GOS comparados con los sujetos sanos, existiendo una reducción en la abundancia relativa de *R. hominis* en el tratamiento con WPI-GOS. Especie directamente vinculada con IBD, al demostrarse una disminución de *R. intestinalis* en pacientes con la enfermedad de Crohn (Quan *et al.* 2018). No obstante, *R. intestinalis* juega un papel importante en el control de los procesos inflamatorios intestinales, especialmente con la producción de butirato (La Rosa *et al.* 2019).

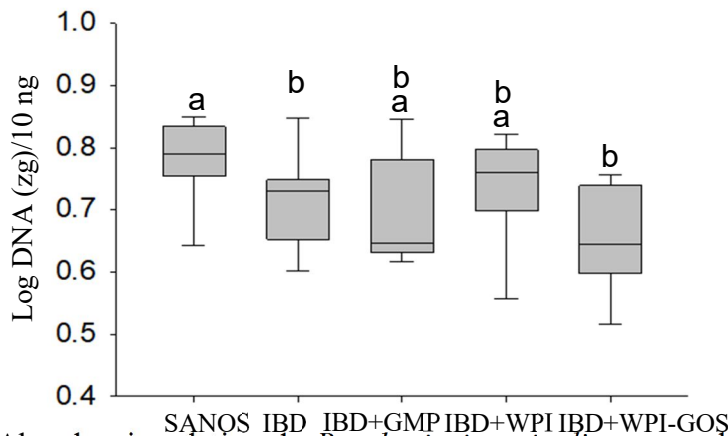


Figura 14. Abundancia relativa de *Roseburia intestinalis* expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos. WPI: Proteína aislada de suero. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

En la figura 15, puede observarse una disminución significativa de la abundancia relativa de *Ruminococcaceae* en los sujetos enfermos tratados con WPI-GOS comparados con los sujetos enfermos sin ningún tratamiento y los sujetos sanos, también se observa que los sujetos enfermos tratados con WPI muestran una diferencia estadística significativa en comparación con los sujetos sanos. En pacientes que sufren enfermedad inflamatoria intestinal, se ha demostrado que existe una reducción en *Ruminococcaceae* como consecuencia de dicha patología (Lo Presti A *et al.* 2019).

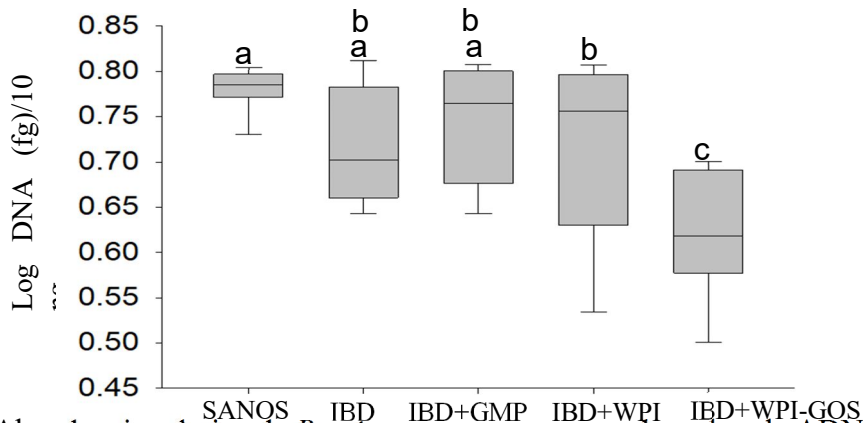


Figura 15. Abundancia relativa de *Ruminococcaceae* expresada en log de ADN en ag/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos. WPI: Proteína aislada de suero. WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

En la figura 16, puede observarse una disminución de *R. torques* en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, sin embargo, no se observan diferencia estadística significativa. *R.torques* es una especie que se encuentra presente en la microbiota intestinal normal de los individuos; en pacientes que presentan enfermedad inflamatoria intestinal, se presenta una reducción de esta especie (Nishida *et al.* 2018).

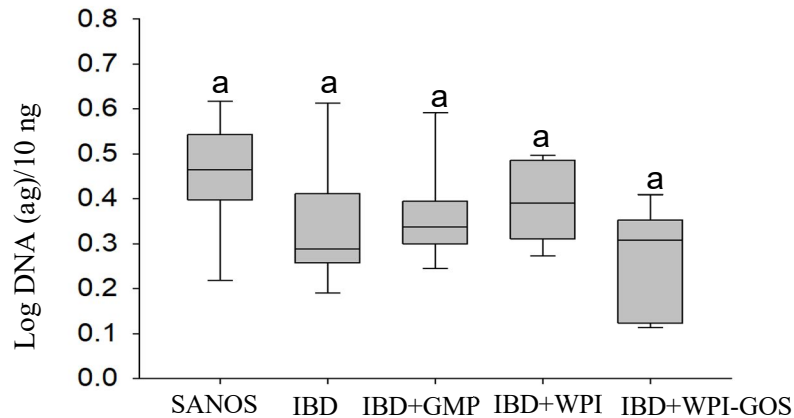


Figura 16. Abundancia relativa de *Ruminococcus torques* expresada en log de ADN en ag/10 ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos. WPI: Proteína aislada de suero. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

En la figura 17, puede observarse una diferencia estadística entre los sujetos sanos y los sujetos con IBD+WPI-GOS, este último se ve en menor abundancia comparada con los sujetos sanos. Anteriormente mencionado, *E. rectale* es una bacteria productora de butirato, por lo tanto, promueve la salud intestinal, afectada en sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal, presentando una reducción de la especie (Nagao-Kitamoto *et al.* 2017).

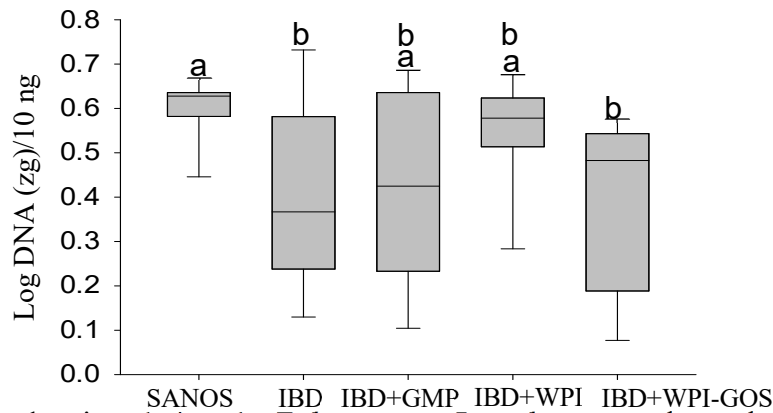


Figura 17. Abundancia relativa de *Eubacterium Rectale* expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos. WPI: Proteína aislada de suero. WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

En la figura 18, puede observarse que los sujetos con IBD+WPI-GOS presentan una mayor abundancia relativa similar a los sujetos sanos, comparada con la disminución en los sujetos con IBD. *Escherichia coli* forma parte del filo proteobacteria, el cual se presenta en pequeñas cantidades en la microbiota intestinal. En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, se presenta un aumento de *E.coli*, debido a los cambios que resultan en la microbiota intestinal como consecuencia de esta patología (Matsuoka *et al.* 2015). Sin embargo existe una gran cantidad de cepas de *E.coli*, dentro de las cuales se encuentran tanto patógenas como benéficas, dentro de estas cepas benéficas se encuentra *Escherichia coli Nissle (EcN) 1917* es una cepa gramnegativa no patógena utilizada en muchos trastornos gastrointestinales (Scaldeferri *et al.* 2016).

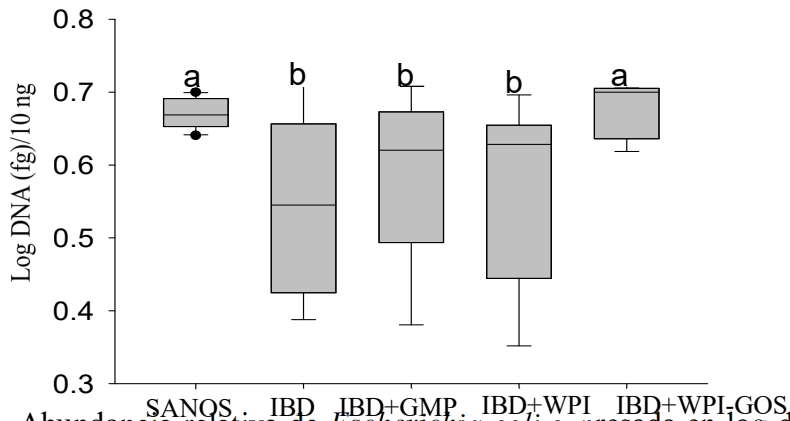


Figura 18. Abundancia relativa de *Escherichia coli* expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa. WPI: Proteína aislada de suero. GMP: Glicomacropéptidos. WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

En la figura 19, puede observarse que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos comparados con los sujetos enfermos. La enfermedad inflamatoria intestinal y su papel en la patogénesis de la microbiota no está totalmente claro, sin embargo, microorganismos potencialmente patógenos, están asociados con dicha enfermedad, dentro de los cuales encontramos; *Listeria monocytogenes*, *Clostridioides difficile*, *Salmonella* spp. Y *Campylobacter* spp. Estudios han demostrado que existe un posible vínculo entre la infección de *C.jejuni* y un futuro riesgo de incidencia de la enfermedad inflamatoria intestinal (Nielsen *et al.* 2019).

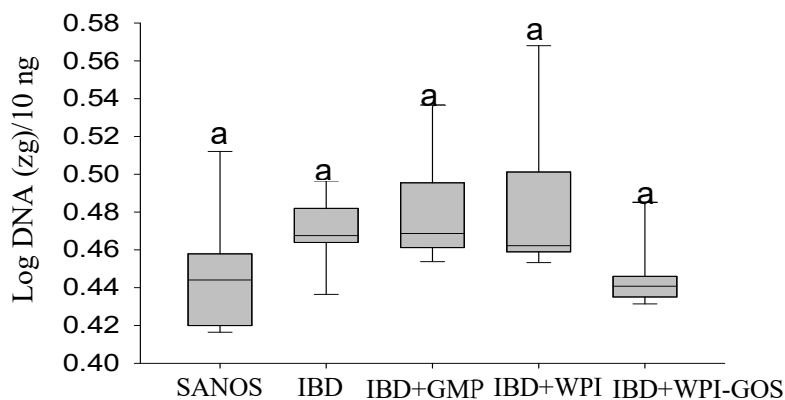


Figura 19. Abundancia relativa de *Campylobacter jejuni* expresada en log de ADN en zg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos. WPI: Proteína aislada de suero. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal. WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

Akkermansia muciniphila se localiza en el moco y representa aproximadamente un 3 % de la microbiota intestinal. Esta especie es importante tanto para el huésped como también, para la comunidad microbiana intestinal, ya que, es esencial para una capa saludable de moco. Estudios han demostrado que existe una reducción de esta especie en pacientes con trastornos como la enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad y diabetes tipo 2 (Lopez *et al* 2018). Sin embargo, en la figura número 20 no se muestra diferencia estadística significativa entre tratamiento.

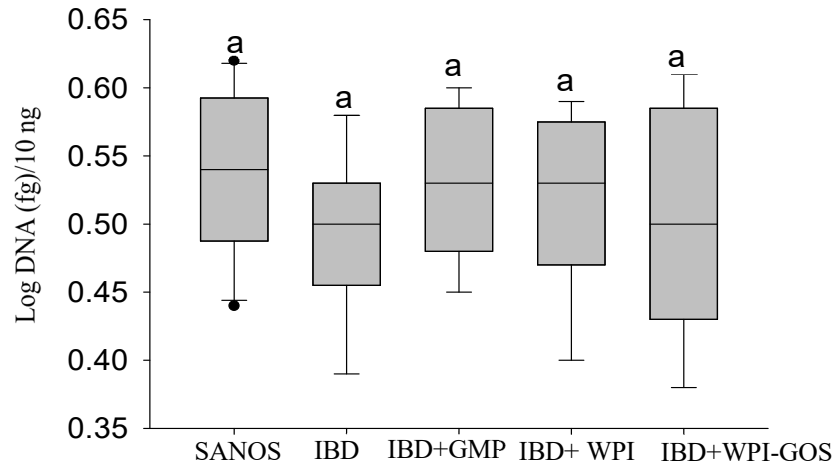


Figura 20. Abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila* expresada en log de ADN en fg/10ng en sujetos sanos comparados con sujetos enfermos con IBD y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Diferentes letras indican diferencia estadística significativa.

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

4. CONCLUSIONES

- Los componentes derivados de suero de queso después de digestión *in vitro* no tienen efecto significativo en la modulación de la producción de las especies reactivas al oxígeno de individuos con enfermedad inflamatoria intestinal.
- Los péptidos liberados a partir de componentes de suero de queso después de la digestión *in vitro* son capaces de modular el crecimiento bacteriano de individuos con enfermedad inflamatoria intestinal.

5. RECOMENDACIONES

- Incluir en estudios futuros criterios de inclusión en la selección de los participantes, tales como, características antropométricas, antecedentes genéticos, tipo de dieta y recordatorio de 24 h.
- Conocer el estadio de la enfermedad inflamatoria intestinal al momento del estudio.
- Identificar en estudios similares características como, presencia de enfermedades autoinmunes relacionadas o hereditarias que permitan obtener nuevas asociaciones.

6. LITERATURA CITADA

- Akal C. 2017. Benefits of Whey Proteins on Human Health. En: Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan. [sin lugar]: Elsevier. p. 363–372.
- Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods*. 86(3):351–356. eng. doi:10.1016/j.mimet.2011.06.010.
- Balmus IM, Ciobica A, Trifan A, Stanciu C. 2016. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. *Saudi J Gastroenterol*. 22(1):3–17. eng. doi:10.4103/1319-3767.173753.
- Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AHK, Vasconcelos AC, Cunha LD, Mayer AE, Shen Y, Wu W-L, Kambal A, et al. 2016. Gene-Microbiota Interactions Contribute to the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Science (New York, N.Y.)*. 352(6289):1116–1120. 27230380. doi:10.1126/science.aad9948.
- Collado MC, Derrien M, Isolauri E, Vos WM de, Salminen S. 2007. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol*. 73(23):7767–7770. eng. doi:10.1128/AEM.01477-07.
- Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 14(1):20–32. eng. doi:10.1038/nrmicro3552.
- Fang C, Kim H, Noratto G, Sun Y, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. 2018. Gallotannin derivatives from mango (*Mangifera indica* L.) suppress adipogenesis and increase thermogenesis in 3T3-L1 adipocytes in part through the AMPK pathway. *Journal of Functional Foods*. 46:101–109. doi:10.1016/j.jff.2018.04.043.
- Flaim C, Kob M, Di Pierro AM, Herrmann M, Lucchin L. 2017. Effects of a whey protein supplementation on oxidative stress, body composition and glucose metabolism among overweight people affected by diabetes mellitus or impaired fasting glucose: A pilot study. *The Journal of nutritional biochemistry*. 50:95–102. 29053995. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.05.003.
- Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, Markel M, Steiner JM, Dossin O. 2012. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol*. 80(3):624–636. eng. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01331.x.

- Garg G, Singh S, Singh AK, Rizvi SI. 2018. Whey protein concentrate supplementation protects rat brain against aging-induced oxidative stress and neurodegeneration. *Appl Physiol Nutr Metab*. 43(5):437–444. eng. doi:10.1139/apnm-2017-0578.
- Gómez Soto JA, Sánchez Toro ÓJ. 2019. Producción de galactooligosacáridos: alternativa para el aprovechamiento del lactosuero. Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo (INDE)*. 37(1):129–158. doi:10.14482/inde.37.1.637
- Guerrero C, Illanes A. 2016. Enzymatic Production of Other Lactose-Derived Prebiotic Candidates. En: *Lactose-Derived Prebiotics*. [sin lugar]: Elsevier. p. 229–259.
- Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K. 2008. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol*. 47(5):367–373. eng. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x.
- Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. 2002. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 40(12):4423–4427. eng. doi:10.1128/JCM.40.12.4423-4427.2002.
- Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkivuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, Malinen E, Apajalahti J, Palva A. 2007. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*. 133(1):24–33. eng. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.005.
- Kavadi PK, Pothuraju R, Chagalamarri J, Bhakri G, Mallepogu A, Sharma RK. 2017. Dietary incorporation of whey protein isolate and galactooligosaccharides exhibits improvement in glucose homeostasis and insulin resistance in high fat diet fed mice. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 6(3):326–332. 28894632. doi:10.5455/jice.20170526091235.
- Kim S, Covington A, Pamer EG. 2017. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev*. 279(1):90–105. eng. doi:10.1111/imr.12563.
- La Rosa SL, Leth ML, Michalak L, Hansen ME, Pudlo NA, Glowacki R, Pereira G, Workman CT, Arntzen MØ, Pope PB, et al. 2019. The human gut Firmicute *Roseburia intestinalis* is a primary degrader of dietary β -mannans. *Nat Commun*. 10(1):905. eng. doi:10.1038/s41467-019-08812-y.
- Larsen N, Vogensen FK, Gøbel RJ, Michaelsen KF, Forssten SD, Lahtinen SJ, Jakobsen M. 2013. Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. *Clinical Nutrition*. 32(6):935–940. doi:10.1016/j.clnu.2013.02.007.
- Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, Altomare A, Cocca S, Avola A, Biasio F de, Russo A, Cella E, Reddel S, et al. 2019. Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Front. Microbiol*. 10:648. doi:10.3389/fmicb.2019.01655.
- Lopez-Siles M, Enrich-Capó N, Aldeguer X, Sabat-Mir M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. 2018. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of

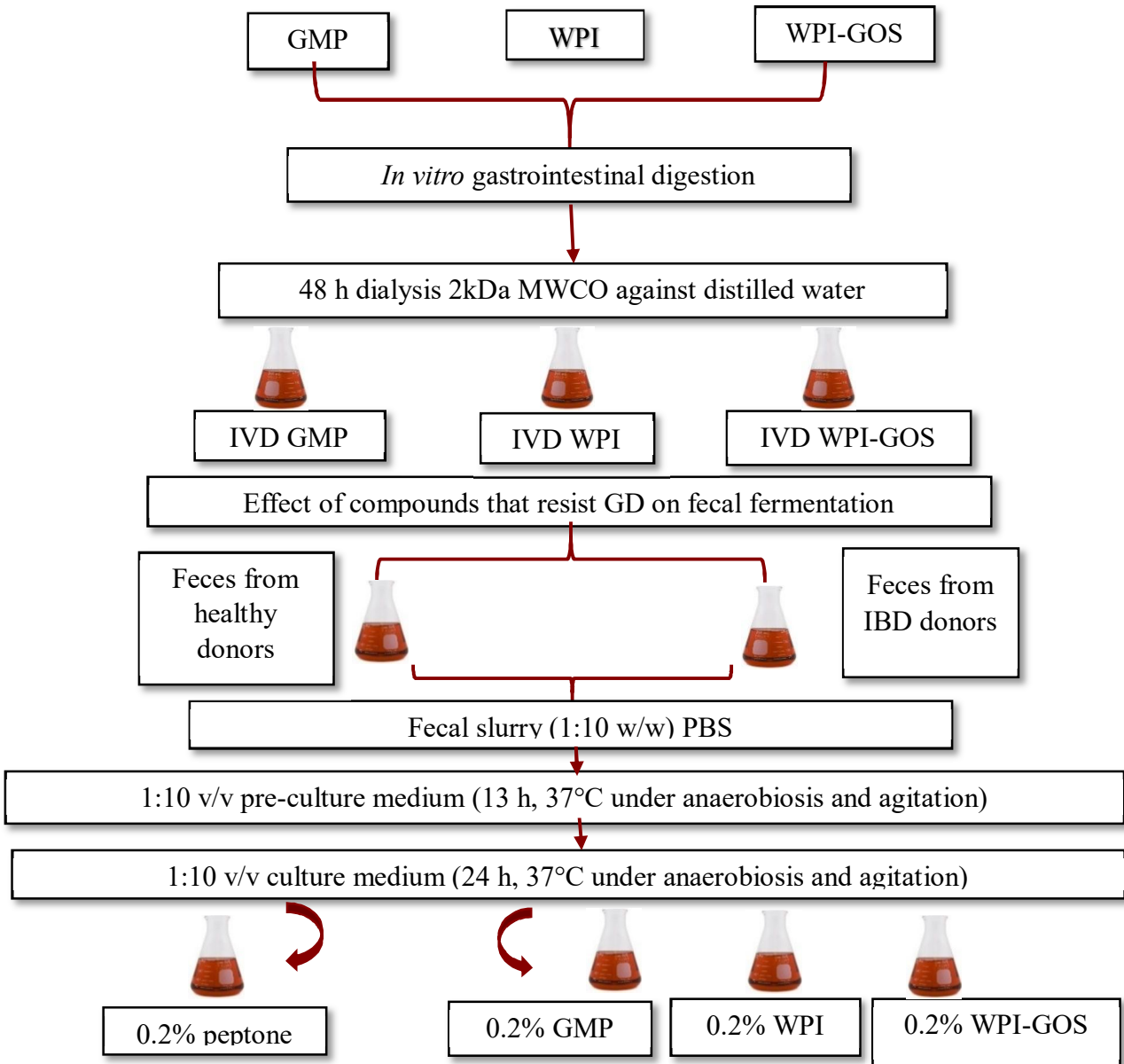
- Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Front Cell Infect Microbiol.* 8:281. eng. doi:10.3389/fcimb.2018.00281.
- Lynch SV, Pedersen O. 2016. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 375(24):2369–2379. eng. doi:10.1056/NEJMra1600266.
- Ma Y, Liu J, Shi H, Yu LL. 2016. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. *Journal of Dairy Science.* 99(9):6902–6912. 27394940. doi:10.3168/jds.2016-11186.
- Machiels K, Joossens M, Sabino J, Preter V de, Arijis I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, van Immerseel F, Verbeke K, et al. 2014. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 63(8):1275–1283. eng. doi:10.1136/gutjnl-2013-304833.
- Man SM, Zhang L, Day AS, Leach ST, Lemberg DA, Mitchell H. 2010. *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* species in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 16(6):1008–1016. eng. doi:10.1002/ibd.21157.
- Mann B, Athira S, Sharma R, Kumar R, Sarkar P. 2019. Bioactive Peptides from Whey Proteins. En: *Whey Proteins*. ICAR National Dairy Research Institute: Elsevier. p. 519–547.
- Matsuoka K, Kanai T. 2015. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol.* 37(1):47–55. eng. doi:10.1007/s00281-014-0454-4.
- Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS. 2016. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review. *Saudi J Biol Sci.* 23(5):577–583. eng. doi:10.1016/j.sjbs.2015.06.005.
- Moreno-Pérez D, Bressa C, Bailén M, Hamed-Bousdar S, Naclerio F, Carmona M, Pérez M, González-Soltero R, Montalvo-Lominchar MG, Carabaña C, et al. 2018. Effect of a Protein Supplement on the Gut Microbiota of Endurance Athletes: A Randomized, Controlled, Double-Blind Pilot Study. *Nutrients.* 10(3). 29534465. doi:10.3390/nu10030337.
- Mu C, Yang Y, Luo Z, Guan L, Zhu W. 2016. The Colonic Microbiome and Epithelial Transcriptome Are Altered in Rats Fed a High-Protein Diet Compared with a Normal-Protein Diet. *The Journal of Nutrition.* 146(3):474–483. 26843585. doi:10.3945/jn.115.223990.
- Nagao-Kitamoto H, Kamada N. 2017. Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. *Immune Network.* 17(1):1–12. 28261015. doi:10.4110/in.2017.17.1.1.
- Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, et al. 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet.* 390(10114):2769–2778. doi:10.1016/s0140-6736(17)32448-0.

- Nielsen HL, Dalager-Pedersen M, Nielsen H. 2019. Risk of inflammatory bowel disease after *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter concisus* infection: a population-based cohort study. *Scand J Gastroenterol.* 54(3):265–272. eng. doi:10.1080/00365521.2019.1578406.
- Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. 2018. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol.* 11(1):1–10. eng. doi:10.1007/s12328-017-0813-5.
- Noratto G. 2016. Aged American Cheddar Cheese as Source of Protein Derived Compounds that Modulate Obese Mice Fecal Bacteria and Colon Inflammation In Vitro. *Journal of Nutritional Health & Food Science.* 4(5):1–10. doi:10.15226/jnhfs.2016.00176.
- Patel S. 2015. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods.* 19:308–319. doi:10.1016/j.jff.2015.09.040.
- Patterson AM, Mulder IE, Travis AJ, Lan A, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V, Garden K, Logan E, Delday MI, Coutts AGP, et al. 2017. Human Gut Symbiont *Roseburia hominis* Promotes and Regulates Innate Immunity. *Front Immunol.* 8:1166. eng. doi:10.3389/fimmu.2017.01166.
- Pereira C, Grácio D, Teixeira JP, Magro F. 2015. Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 21(10):2403–2417. eng. doi:10.1097/mib.0000000000000506.
- Poveda E E. 2013. Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Rev. Chil. Nutr.* 40(4):397–403. doi:10.4067/s0717-75182013000400011.
- Quan Y, Song K, Zhang Y, Zhu C, Shen Z, Wu S, Luo W, Tan B, Yang Z, Wang X. 2018. *Roseburia intestinalis*-derived flagellin is a negative regulator of intestinal inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 501(3):791–799. eng. doi:10.1016/j.bbrc.2018.05.075.
- Rivière A, Gagnon M, Weckx S, Roy D, Vuyst L de. 2015. Mutual Cross-Feeding Interactions between *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCC2705 and *Eubacterium rectale* ATCC 33656 Explain the Bifidogenic and Butyrogenic Effects of Arabinoxylan Oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 81(22):7767–7781. eng. doi:10.1128/AEM.02089-15.
- Scaldaferri F, Gerardi V, Mangiola F, Lopetuso LR, Pizzoferrato M, Petito V, Papa A, Stojanovic J, Poscia A, Cammarota G, et al. 2016. Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: An update. *World J Gastroenterol.* 22(24):5505–5511. eng. doi:10.3748/wjg.v22.i24.5505.
- Simian D, Estay C, Lubascher J, Acuña R, Kronberg U, Figueroa C, Brahm J, Silva G, López-Köstner F, Wainstein C, et al. 2014. Enfermedad inflamatoria intestinal a partir de una experiencia local [Inflammatory bowel disease. Experience in 316

- patients]. *Rev Med Chil.* 142(8):1006–1013. spa. doi:10.4067/s0034-98872014000800008.
- Smith ML. 2018. Isolation and characterisation of novel enzymes producing fructo- and galacto-oligosaccharides through a metagenomic approach. Stellenbosch University. <http://hdl.handle.net/10019.1/103718>.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, Blugeon S, Bridonneau C, Furet J-P, Corthier G, et al. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(43):16731–16736. eng. doi:10.1073/pnas.0804812105.
- Wexler HM. 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 20(4):593–621. eng. doi:10.1128/CMR.00008-07.
- Zhou Y, Zhi F. 2016. Lower Level of Bacteroides in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *BioMed research international.* 2016:5828959. eng. doi:10.1155/2016/5828959.

7. ANEXOS

Anexo 1. Fermentación fecal in vitro de compuestos de suero de queso después de la IVD



GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal.

PBS: Phosphate buffered saline. MWCO: membrane with a cut off

.Anexo 2. Protocolo catálogo no. D6010 del “Miniprep ADN fecal Zymo-Research”.

Protocol

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the Genomic Lysis Buffer to a final dilution of 0.5% (v/v) *i.e.*, 500 µl per 100 ml.

1. Add ≤ 150 mg of fecal sample or ≤ 250 mg of soil sample to a ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm). Add 750 µl BashingBead™ Buffer to the tube¹.

Note: Alternatively, add water sample² or 50-100 mg (wet weight) fungal/bacterial cells³ that have been resuspended in up to 200 µl of water or isotonic buffer (e.g., PBS) to a ZR BashingBead™ Lysis Tube.

2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly and process at maximum speed for ≥ 5 minutes.

Note: Required processing time will vary depending on the device and application and therefore should be evaluated on a case by case basis.

For example, processing times may be as little as 3 minutes when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable TerraLyzer™ Sample Processor, FastPrep® -24, or similar) or as long as 20 minutes when using lower speeds (e.g., Disruptor Genie™, or standard benchtop vortexes). See manufacturer's literature for operating information.

3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm) in a microcentrifuge at $\geq 10,000 \times g$ for 1 minute.
4. Transfer up to 400 µl supernatant to a Zymo-Spin™ III-F Filter in a Collection Tube and centrifuge at $8,000 \times g$ for 1 minute.
5. Binding preparation:

Feces and All Non-Soil Samples
Add 1,200 µl of Genomic Lysis Buffer to the filtrate in the Collection Tube from Step 4. Mix well.

OR

Soil Samples
Add 800 µl of Genomic Lysis Buffer and 400 µl of 95% ethanol to the filtrate in the Collection Tube from Step 4. Mix well.

6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a Zymo-Spin™ IICR Column⁴ in a Collection Tube and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
7. Discard the flow through from the Collection Tube and repeat Step 6.
8. Add 200 µl DNA Pre-Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IICR Column in a new Collection Tube and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
9. Add 500 µl g-DNA Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IICR Column and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
10. Transfer the Zymo-Spin™ IICR Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100 µl (50 µl minimum) DNA Elution Buffer directly to the column matrix. Centrifuge at $10,000 \times g$ for 30 seconds to elute the DNA^{5,6}.
11. Place a Zymo-Spin™ III-HRC Filter in a clean Collection Tube and add 600 µl Prep Solution. Centrifuge at $8,000 \times g$ for 3 minutes.
12. Transfer the eluted DNA to a prepared Zymo-Spin™ III-HRC Filter in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and centrifuge at exactly $16,000 \times g$ for 3 minutes.

The filtered DNA is now suitable for PCR and other downstream applications.

¹ Cap tube tightly to prevent leakage.

² For water samples, filter using desired non-silica based filter (not provided). Cut the filter into small pieces before adding to the lysis tube.

³ This equates to approximately 10^9 bacterial cells and 10^7 yeast cells.

⁴ The Zymo-Spin™ IICR Column has a maximum capacity of 800 µl.

⁵ In some cases a brown-colored pellet may form at the bottom of the tube after centrifugation. Avoid this pellet when collecting the eluted DNA.

⁶ If fungi or bacterial cultures were sampled, the DNA is now suitable for PCR as well as other downstream applications.

ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9682 • Fax: (949) 266-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

Anexo 3. iProof High-Fidelity PCR kit.

Notes About Cycling Conditions

1. Denaturation

Template denaturation should be performed at 98°C. Due to the high thermostability of iProof, denaturation temperatures greater than 98°C can be used. A 30 s initial denaturation time is recommended, but this can be extended to 3 min for difficult DNA templates. Subsequent denaturation should be performed for 5–10 s at 98°C.

2. Annealing

When using iProof, a general rule is to anneal primers (>20 nt) for 10–30 s at +3°C above the primer with the lowest T_m . Primer T_m should be calculated using the nearest-neighbor method as results can vary significantly depending on the method used. For primers ≤ 20 nt, use an annealing temperature equal to the primer with the lowest T_m .

3. Extension

Template extension should be performed at 72°C and extension time depends on amplicon length and complexity. For low complexity DNA (e.g. plasmid, lambda, or BAC DNA) use 15 s per kb. For high complexity DNA (e.g. genomic DNA) use 30 s per kb. **Do not exceed 1 min per kb for amplicons that are >5 kb.**

Related Amplification Products From Bio-Rad Laboratories

Reagents for PCR or Real-Time PCR

iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase	172-5301
iProof HF™ Master Mix	172-5310
iProof GC™ Master Mix	172-5320
ITaq™ DNA Polymerase	170-8870
ITaq Supermix With RDX	170-8854
ITaq SYBR Green Supermix With RDX	170-8850
IQ™ Supermix	170-8860
IQ SYBR Green Supermix	170-8880
iScript™ cDNA Synthesis Kit	170-8890
iScript Select cDNA Synthesis Kit	170-8896
iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green	170-8892
iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes	170-8894

For ordering information on larger pack sizes, or to learn more about Bio-Rad amplification reagents and instruments, visit www.bio-rad.com/amplification/

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,362; 5,789,224; 5,618,711; 6,197,165 and claims outside the US corresponding to US Patent Nos. 4,869,618. The purchase of this product includes a limited, non-transferable license from and under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as the patented 5' Nucleic Acids Process claims in the US Patent Nos. 5,210,015 and 5,487,972), no right to perform any patented method, and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94034, USA.

iProof, ITaq, IQ, and iScript are trademarks of Bio-Rad Laboratories.

Bio-Rad Laboratories
2000 Alvarado Drive, Hercules, CA 94547
510-741-1000

10002500 Rev G

Reaction Setup

Important Note – Please Read Before Starting

Spin tubes before opening to improve recovery. Reactions should be set up on ice. Pipet all components in the order given below. Always add iProof DNA Polymerase last to the reaction as primer degradation may occur in the absence of dNTPs. It is recommended that you prepare a master mix for the appropriate number of samples to be amplified.

Typical Reaction Setup

Component	Volume for 50 µl reaction	Volume for 20 µl reaction	Final Conc.
5x iProof HF Buffer*	10 µl	4 µl	1X
dNTP mix	1 µl	0.4 µl	200 µM each
Primer 1**	x µl	x µl	0.5 µM
Primer 2**	x µl	x µl	0.5 µM
DNA template	x µl	x µl	
Sterile H ₂ O	x µl	x µl	
iProof DNA Polymerase	0.5 µl	0.2 µl***	0.02 U/µl
Total Volume	50 µl	20 µl	

* For difficult or GC-rich templates, 5x iProof GC Buffer can be used.

** Recommended final primer concentration is 0.5 µM; can range between 0.2–1.0 µM.

*** Enzyme should be diluted to avoid pipetting errors.

Control Template Reaction Setup

Component	Volume for 50 µl reaction	Volume for 20 µl reaction	Final Conc.
5x iProof HF Buffer	10 µl	4 µl	1X
dNTP mix	1 µl	0.4 µl	200 µM each
Primers *	2.5 µl	1 µl	0.2 µM
Control DNA Template	2 µl	0.8 µl	
Sterile H ₂ O	34 µl	13.6 µl	
iProof DNA Polymerase	0.5 µl	0.2 µl**	0.02 U/µl
Total Volume	50 µl	20 µl	

* Either 1.3 kb or 10 kb primers

** Enzyme should be diluted to avoid pipetting errors.

Notes About Reaction Components

1. iProof DNA Polymerase

The optimal amount of enzyme depends on the amount of template and the length of the PCR product. Usually 1 unit of iProof DNA polymerase per 50 µl reaction will give good results, but optimal amounts could range from 0.5–2 units per 50 µl reaction depending on amplicon length and difficulty. **Do not exceed 2 U/50 µl (0.04 U/µl), especially for amplicons that are > 5 kb.**

2. Buffers

Two buffers are provided: 5x iProof HF buffer and 5x iProof GC buffer. The error rate of iProof polymerase in HF buffer (4.4×10^{-7}) is lower than that in GC buffer (9.5×10^{-7}). Therefore, the HF buffer should be used as the default buffer for high fidelity amplification. However, the GC buffer can improve iProof performance on certain difficult or long templates, i.e. GC rich templates or those with complex secondary structures. Only use GC buffer when amplification with HF buffer does not provide satisfactory results.



iProof™ High-Fidelity PCR Kit

2 units/µl, 25 µl	50U	172-5330
2 units/µl, 100 µl	200U	172-5331

For research purposes only

Store at -20°C

iProof is a high-fidelity DNA polymerase that offers extreme performance for all PCR applications. Incorporating an exciting new and patented technology, iProof DNA polymerase brings together a novel *Pyrococcus*-like enzyme with a processivity enhancing domain. This allows for the generation of long templates with an accuracy and speed previously unattainable with a single enzyme. The extreme fidelity of iProof makes it a superior choice for cloning. The error rate of iProof polymerase is determined to be 4.4×10^{-7} in iProof HF buffer, which is approximately 50-fold lower than that of *Thermus aquaticus*, and 6-fold lower than that of *Pyrococcus furiosus*.

The iProof™ High Fidelity PCR Kit includes lambda-DNA control template and primers for 1.3 kb and 10 kb positive control amplicons. Sufficient template is included for performing 20 x 50 µl or 50 x 20 µl reactions.

Storage and Stability

Store the iProof™ High-Fidelity PCR Kit at -20°C in a constant temperature freezer. When stored under these conditions, the polymerase is stable for one year after the ship date.

Kit Contents

Reagent	50U	200U	Description
iProof Polymerase	25 µl	100 µl	iProof™ High Fidelity DNA Polymerase, 2 units/µl
iProof HF Buffer	1.5 ml	3 x 1.5 ml	5x HF Buffer, 7.5 mM MgCl ₂
iProof GC Buffer	1.5 ml	3 x 1.5 ml	5x GC Buffer, 7.5 mM MgCl ₂
dNTP mix	100 µl	100 µl	dNTP solution, 10 mM each
MgCl ₂	1.5 ml	1.5 ml	50 mM MgCl ₂ solution
Control 1(template)	40 µl	40 µl	Control 1(template), 0.5 ng/µl
1.3 kb primers	50 µl	50 µl	4 µM each
10 kb primers	50 µl	50 µl	4 µM each
DNA Standard	200 µl	400 µl	DNA size standard
DMSO	500 µl	500 µl	100% DMSO solution

iProof DNA polymerase is unlike other enzymes. Please read the QuickGuide to modify your protocol for optimal results.

QuickGuide (See Notes About Cycling Conditions for details)

- Use 98°C for denaturation.
- Anneal at $T_m + 3^\circ\text{C}$ (>20nt oligo).
- Use 15–30 sec/1kb for extension times. Do not exceed 1 min/kb.
- Use iProof at 0.5–1.0 U per 50 µl reaction. Do not exceed 2 U/50 µl.
- Use 200 µM dNTPs. Do not use dUTP.
- iProof produces blunt end DNA products.

3. Mg²⁺ and dNTP

Mg²⁺ concentration is critical since iProof is a Mg²⁺-dependent enzyme. Excessive Mg²⁺ stabilizes dsDNA, preventing complete denaturation, and can also promote inaccurate priming. Conversely, insufficient amounts of Mg²⁺ can lead to low product yield. The optimal Mg²⁺ concentration also depends on dNTP concentration, the specific DNA template and the sample buffer composition. The optimal Mg²⁺ concentration is 0.5 to 1 mM over the total dNTP concentration for standard PCR. For optimization, increase or decrease Mg²⁺ concentration in 0.2 mM increments.

Only high quality dNTPs should be used. Use of dUTP or other dNTP-derivatives or analogs is not recommended. Due to the increased processivity of iProof, there is no advantage to increasing dNTP amounts. For optimal results, use 200 mM dNTPs.

4. DNA Template

General guidelines are 1 pg–10 ng of DNA template in a 50 µl reaction for low complexity DNA (e.g. plasmid, lambda, or BAC DNA). For high complexity DNA (e.g. genomic DNA), 50–500 ng of template DNA should be used in a 50 µl reaction.

5. PCR Additives

The recommended reaction conditions for GC-rich templates include the addition of 3% DMSO which aids in template denaturation. Further optimization of DMSO should be made in 2% increments. In some cases, DMSO may be used to help relax supercoiled plasmid DNA. High DMSO concentrations (10%) will require lowering the annealing temperature by 5.5–6.0°C. Other PCR additives such as formamide, glycerol, and betaine are also compatible with iProof.

Cycling Conditions

Important Note – Please Read

Due to the novel nature of iProof DNA polymerase, optimal reaction conditions may differ from standard PCR protocols. iProof works better at elevated denaturation and annealing temperatures due to higher salt concentration in the reaction buffer.

Typical Thermal Cycling Protocol

Cycle Step	Temp.	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	5–10 s	
Annealing	45–72°C	10–30 s	25–35
Extension	72°C	15–30 s / kb	
Final Extension	72°C	5–10 min	1

Control Template (1.3 kb) Cycling Protocol (2-step)

Cycle Step	Temp.	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	98°C	1 min	1
Denaturation	98°C	5 s	
Annealing/Extension	72°C	20 s	25–35
Final Extension	72°C	10 min	1

Control Template (10 kb) Cycling Protocol (3-step)*

Cycle Step	Temp.	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	98°C	1 min	1
Denaturation	98°C	5 s	
Annealing	60°C	15 s	25–35
Extension	72°C	2 min 30 sec	
Final Extension	72°C	10 min	1

* Both control template reactions can be run using the 10 kb cycling protocol.

Anexo 4. Resultados del análisis estadístico de la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal y sujetos con dicha enfermedad, tratados con GMP, WPI, WPI-GOS.

Sujeto	Probabilidad	R ²	CV %	Tratamiento
S1	>0.2637	58.0	10.87	-
S2	>0.6574	40.0	7.430	-
S3	>0.0440	81.9	10.08	GMP
S4	>0.0105	82.0	6.940	WPI-GOS
S5	>0.0450	73.0	8.320	WPI-GOS
S6	>0.0015	89.0	6.620	(*)
S7	>0.1000	65.8	8.600	-
S8	>0.8300	24.0	14.45	-
S9	>0.3150	55.0	10.77	-

(*) todos los tratamientos, poseen diferencia estadística significativa, comparados con los sujetos con IBD.

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

Anexo 5. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS.

Bacteria	Probabilidad	R ²	CV%
<i>Bacteroidetes</i> spp.	0.0019	58.8	15.35
<i>Firmicutes</i> spp	0.0242	48.8	5.54
<i>Escherichia coli</i> .	<0.0001	65	16.97
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.0846	42.2	23.46
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.11	40	1.22
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.005	55	28.14
<i>Roseburia hominis</i>	<0.0001	68	18.48
<i>Roseburia intestinalis</i>	0.0268	48	11.60
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.2065	36	7.5
<i>Ruminococcus torques</i>	0.0724	43	36
<i>Eubacterium rectale</i>	0.0269	50	34
<i>Ruminococcaceae</i>	0.0015	59	9.3

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

Anexo 6. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS. expresando la media en log ADN (fg)/10ng y desviación estándar

Bacteria	Log ADN (fg)/10ng									
	SANOS		ENFERMOS		GMP		WPI		WPI-GOS	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
<i>Bacteroidetes</i> spp.	0.88	0.09	0.75	0.123	0.81	0.139	0.79	0.139	0.63	0.038
<i>Firmicutes</i> spp	0.80	0.017	0.77	0.05	0.82	0.03	0.79	0.05	0.74	0.04
<i>Escherichia coli.</i>	0.67	0.02	0.636	0.065	0.62	0.072	0.60	0.0790	0.672	0.037
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.64	0.119	0.59	0.15	0.58	0.127	0.58	0.135	0.55	0.117
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.54	0.057	0.49	0.057	0.53	0.056	0.52	0.06	0.51	0.08
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.70	0.117	0.52	0.19	0.59	0.203	0.59	0.189	0.33	0.095

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

Anexo 7. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, expresando la media en Log AD (zg)/10ng y desviación estándar.

Bacteria	Log ADN (zg)/10ng									
	SANOS		ENFERMOS		GMP		WPI		WPI-GOS	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
<i>Roseburia hominis</i>	0.574	0.121	0.413	0.104	0.382	0.093	0.438	0.093	0.396	0.099
<i>Roseburia intestinali</i>	0.775	0.08	0.717	0.092	0.706	0.094	0.729	0.100	0.653	0.093
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.451	0.042	0.46	0.022	0.482	0.032	0.485	0.04	0.447	0.02

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

Anexo 8. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, expresando la media en log ADN (ag)/10ng y desviación estandar

	Log ADN (ag)/10ng									
	SANOS		ENFERMOS		GMP		WPI		WPI-GOS	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
<i>Ruminococcus torques</i>	0.445	0.157	0.347	0.162	0.367	0.142	0.387	0.091	0.255	0.122

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

Anexo 9. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias en sujetos sanos, sujetos enfermos y sujetos enfermos tratados con GMP, WPI y WPI-GOS, expresando la media en log ADN (yg)/10ng y desviación estándar.

	Log ADN (yg)/10ng									
	SANOS		ENFERMOS		GMP		WPI		WPI-GOS	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
<i>Eubacterium rectale</i>	0.595	0.084	0.407	0.229	0.427	0.233	0.539	0.149	0.391	0.212

GMP: Glicomacropéptidos.

WPI: Proteína aislada de suero.

WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

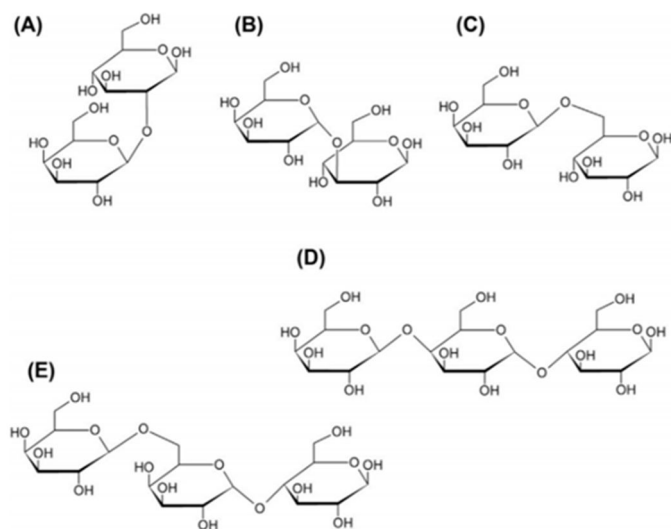
Anexo 10. Resultados del análisis estadístico de la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) en sujetos con IBD sometidos a los diferentes tratamientos, media y desviación estándar expresados en RFU.

Sujeto	Unidades de fluorescencia relativa.							
	ENFERMOS		GMP		WPI		WPI-GOS	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
S1	132865	7399.23	150787	23990.71	144831.8	14606.76	167947.8	7566.921
S2	158910	14847.82	163145	13842.69	-	-	165502	5568.644
S3	142201	6056.36	211309	19038.04	6056.36	14542.91	170730.5	15311.5
S4	140345	9506.66	157290	15148.11	145721.1	15145.47	179166.46	13316.70
S5	153063	26590.73	147640	9130.669	149909.1	10714.72	181474.2	10071
S6	133216	8682.661	187268	14506.397	168570.52	17265.67	188174.5	10407.78
S7	153797	13779.18	176089	15508.73	161915.57	17189	182704	18772.87
S8	169645	12698.26	195579	23330.09	175732.099	32038.4	185391.2	23778.8
S9	162855	22560.39	161632	20118.206	142952.879	12808.6	173682.58	13742.52

GMP: Glicomacropéptidos. IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

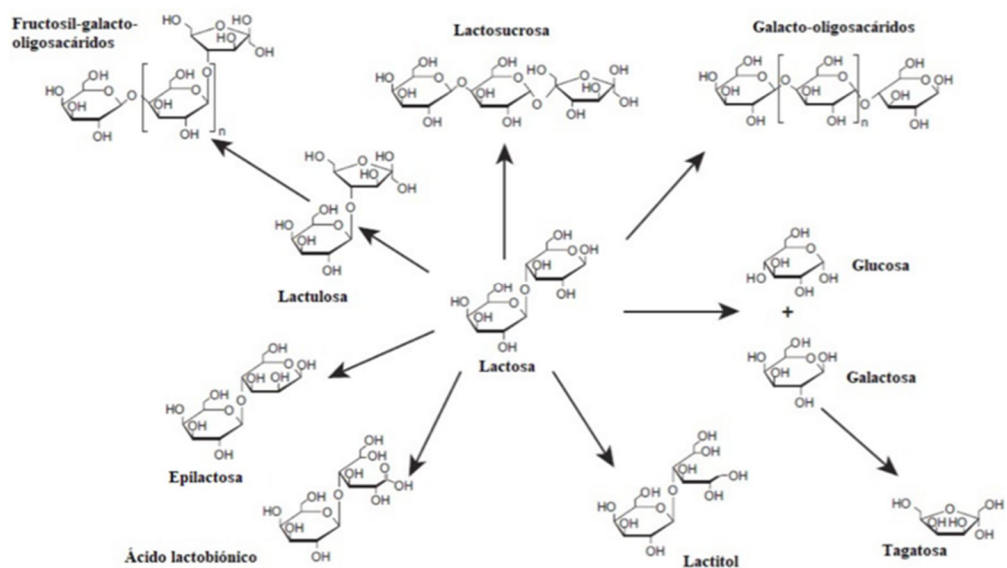
WPI: Proteína aislada de suero. WPI-GOS: Proteína aislada de suero enriquecida con galacto-oligosacáridos.

Anexo 11. Estructura de los componentes bioactivos.
Estructura química de algunos galacto-oligosacáridos.



Fuente: (Guerrero y Illanes 2016)

Estructura química de oligo-sacáridos no digeribles derivados de lactosa



Fuente (Gomez y Sánchez 2016).

Anexo 12. Bacterias utilizadas para PCR, secuencia de iniciadores y temperatura de hibridación.

ID	Phylum	Class/Family/genus	Species/group	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature °C	Reference
5	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	CTGAACCAGCCAAGTAGCG	68	(Nagao-Kitamoto <i>et al.</i> 2017)
32	<i>Firmicutes</i>	<i>all</i>	<i>all</i>	CCGCAAACCTTTCACAACCTGACTTA TGAAACTYAAAGGAATTGACG	60	(Bacchetti De Gregoris <i>et al.</i> 2011)
27	<i>Bacteroidetes</i>	<i>all</i>	<i>all</i>	ACCATGCACCACCTGTC GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT	60	(Guo <i>et al.</i> 2008)
11	<i>Proteobacteria</i>	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	AGTCGACGACAACCATGCAG CATGCCGCGTGTATGAAGAA	60	(Huijsdens <i>et al.</i> 2002)
3r	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>faecalibacterium prausnitzii</i>	CGGGTAACGTCAATGAGCAA CCATGAATTGCCTTCAAACTGTT	60	(Sokol <i>et al.</i> 2008)
13	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>akkermancia</i>	<i>muciniphila</i>	GAG CCT CAG CGT CAG TTG GT CAGCACGTGAAGGTGGGGAC CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	50	(Collado <i>et al.</i> 2007)
1	<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia</i>	<i>hominis</i>	CCGCAGCAAACGCAATAAG GAACCGCTGGCTACTAAGAATAG	60	(Machiels <i>et al.</i> 2013)
4	<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia</i>	<i>intestinalis</i>	CCCTTATGACTTGGGCTACAC TCACTGACTTCGGGCATTAC	56	(Larsen <i>et al.</i> 2013)
2r	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>all</i>	ACTGAGAGGTTGAACGGCCA CCTTTACACCCAGTAAWTCCGGA	59	(Garcia-Mazcorro <i>et al.</i> 2012)
5	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>torques</i>	GACTAAGAAGCACCGGCTAAA CCACTGGTGTTCCTCCTAATATC	65	(Kassinen <i>et al.</i> 2007)
7	<i>Proteobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	AGCGCAACCCACGTATTTA AGCATGGCTGATCTACGATTAC	55	(Man <i>et al.</i> 2010)
9	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>rectale</i>	CTAGAGAGACTGCCAGGGATAA CAGCTCCTTCCTTTCGGTTAG	60	(Rivière <i>et al.</i> 2015)