

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA
Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial
Del 3 de abril de 1981



“Uso de algoritmos computacionales, estadísticos y bioinformáticos, para evaluar el efecto del consumo de diferentes hidratos de carbono sobre el microbioma intestinal”

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
Presenta

LORENA PATRICIA MORA FLORES

Director: Dr. Elier Ekberg Neri Torres
Codirector: Dr. Rubén Darío Moreno Terrazas Casildo
Tutor Externo: Dr. Guillermo de Anda Jáuregui
Tutor Interno: Dr. Hugo Alexer Pérez Vicente
Lectores: Dra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández
Dr. Enrique Hernández Lemus
Dra. Diana Elizabeth Leyva Daniel

Ciudad de México, 2024

Agradecimientos

Finalmente, esta bonita y dolorosa etapa de mi vida a la que todos conocimos como “el doctorado” está llegando a su fin. La realidad es que, después de un momento tan complejo, como lo fue la realización de este posgrado, es difícil agradecer a todos los que me ayudaron para llegar aquí, al día que finalmente, puedo poner tres letras antes de mi nombre “Dra.”

Quisiera empezar por mi familia, que me demostró su amor incondicional, su empatía, y me enseñaron que es posible amar a alguien aún en sus momentos más complicados. Mi mamá, Patricia Adriana Flores Córdova, quien me escuchó TODAS las veces que lo necesité y siempre me dio su consejo, gracias por tu paciencia y siempre tratar de que yo esté bien. A mi papá, Francisco Javier Mora Romero, quién me tuvo toda la paciencia del mundo, siempre con palabras de amor, gracias por cuidarme y dejarme seguir siendo tu niña. A mi esposo, Gabriel Moreno Lomelín, quien estuvo allí aún en los momentos que nadie más pudo estar; este reto me confirmó que eres el amor de mi vida. A mi tío Nicolás Ramón Flores Córdova, que me ayudó a lograr esto de todas las maneras posibles, gracias por creer en mí, tengo al tío más chingón del mundo. A mi abuelita Concepción Córdova de Flores, quien no logró ver este proceso terminado, pero seguramente desde el cielo estará festejando conmigo acompañada por mi abuelito y comiendo rico siempre junto con mis abuelitos paternos y mi abuelita adoptada Made.

Ahora voy a agradecer a mi comité tutorial, los cuatro doctores que me apoyaron cuando nadie más parecía querer hacerlo y me enseñaron a ser una investigadora. Soy muy afortunada de tener al mejor comité tutorial que pude pedir. Gracias por aceptarme cuando nadie más lo hizo a pesar de lo difícil que parecía ser este reto. Agradezco en especial al Dr. Guillermo de Anda y al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por darme un lugar seguro para terminar mi doctorado. Al Dr. Elier Neri Torres, por sus consejos y siempre buscar soluciones. Al Dr. Rubén Moreno por siempre impulsarme a superarme y mejorar. Al Dr. Hugo Alexer Pérez, por siempre buscar la forma de resolver las situaciones que se presentaron. A mis lectores, la Dra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández, Dr. Enrique Hernández Lemus y la Dra. Diana Elizabeth Leyva por sus aportaciones en la recta final de este trabajo.

A mis amigos: Gustavo; por enseñarme el mundo de los datos, de Python y a siempre pensar afuera de la caja. A Fernand; por enseñarme el mundo de las revisiones sistemáticas y por siempre estar. A Lourdes; por escucharme, leerme y tenerme la paciencia incondicional. To Bella Yueyan Zhang for so many hours working together through the distance, you are the best PhD long distance peer I could have asked for, thank you for your academic and friendly advice and for the long hours working together on each other's PhD. A Margarita, Daniel, Masiel, Ugo, Mafi, Virgil, Gaby, Laura, Arely, Caty, Jimena, Anne-Lise y Rodrigo L y Jesús Arturo; gracias por permanecer. A mi familia política por criar al mejor esposo que pude pedir y presentármelo.

A quienes coincidieron conmigo en esta jornada y se convirtieron en amigos; Rafa González Acuña, Rafa López, Saraí, Zuly, Marianita, Bere, Angie, Gaby, Iván, Cesar, Sergio, Luis, Noé, Ale, Chio, Karen y Alma. A mis amigas y amigos del trabajo, tanto en la Universidad Panamericana como en la Ibero: Lorenza, Mariana, Nahieli, Charo, Lupita, Moni, Karen, Maricarmen, Lucy. A mis profesores. A los académicos e investigadores que me apoyaron, en especial al Dr. David Kershenovich. Al Dr. Jorge Ibáñez, Dr. Guillermo Fernández, Dra. Esther Ramírez, Dra. Graciela Canseco y la Dra. Mariana Dobernig, por su apoyo emocional y abrirme la mente durante los momentos difíciles. A la Mtra. Ana María Martínez del Olmo. Al Mtro. Eitan Kleinberg, Dr. Enrique Lamadrid y Dra. Angélica Maldonado, por mantenerme sana física y emocionalmente. A quienes perdimos en la pandemia directa o indirectamente. A mis gatitas Masha y Moccha. A todos los “bichitos” que dieron su vida por la ciencia durante mi doctorado.

A mis alumnas y alumnos, que me ayudaron a mantenerme motivada en este largo proceso. A la IBERO, a la Universidad Panamericana y a INMEGEN. A Martha Saldaña, mi primera maestra de química y a todos mis profesores del Instituto Asunción y de la IBERO. Finalmente, quisiera agradecer al patinaje artístico, que me enseñó la resiliencia y a levantarme con una sonrisa y la cabeza en alto después de los golpes más fuertes y las caídas más dolorosas.

Resumen

En los últimos años, el microbioma intestinal ha cobrado importancia científica, ya que se ha comprobado que posee relevancia para la salud del hospedero. Se ha estudiado su composición, los factores que lo modifican y las interacciones que éste tiene en los procesos de salud-enfermedad. El presente proyecto busca mejorar la comprensión de cómo la dieta modifica la composición de la microbiota intestinal

Existen múltiples publicaciones en las que se ha buscado caracterizar el microbioma intestinal tras diferentes intervenciones clínicas y subclínicas, sin embargo, resulta difícil comparar dichos estudios entre sí, para así llegar a conclusiones significativas.

En la primera parte de este trabajo doctoral, se buscó generar una metodología para crear revisiones sistemáticas basada en el Peso de la evidencia y el Valor de la información (WoE / IV) tras una binarización de los datos. Esto se realizó con la intención de comparar estudios de microbioma intestinal y buscar poder predictivo entre las diferentes variables dietéticas y microbianas, que, debido a las diferencias metodológicas, no serían comparables entre sí utilizando las herramientas estadísticas disponibles en la actualidad, pues los resultados numéricos de abundancia microbiológica tendrían una gran variabilidad entre estudios.

Se obtuvieron resultados que por un lado, coinciden con relaciones conocidas entre la composición de la dieta y ciertos taxones bacterianos y por otro lado se observan posibles relaciones de interés científico en las que valdría la pena profundizar. Se observó que el filo microbiano que se modifica con mayor cantidad de intervenciones dietéticas es *Firmicutes*, así como los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*

Finalmente, en la segunda parte de este proyecto se realizó el análisis completo de una base de datos pública,¹ correspondiente a un análisis de microbioma intestinal en un modelo murino con una intervención dietética utilizando oligosacáridos extraídos de *Hylocereus undatus*, con el objetivo de desarrollar una metodología estándar para el estudio de este tipo de datos.

Los resultados de la primera parte, arrojaron que el consumo de fibra soluble tiene un alto poder predictivo para el aumento en la abundancia del género *Bacteroides*, la fibra insoluble tiene un alto poder predictivo para el aumento del género *Bacteroides* y el *phylum Actinobacteria*, así como la disminución del *phylum Firmicutes*. Los oligosacáridos tienen un alto poder predictivo para la disminución en la abundancia del género *Enterococcus* y el incremento del género *Lactobacillus*. Los almidones gelatinizados tienen un alto poder predictivo para el incremento del género *Prevotella*. Los almidones resistentes predicen la disminución del género *Blautia* y aumento del *phylum Firmicutes*.

Por otro lado, los resultados de la segunda parte arrojaron resultados similares al artículo publicado por Peerakietkhajorn y colaboradores ¹, mostrando que el género *Prevotellaceae* se encuentra presente en todos los grupos correspondientes a 14 días de intervención y ausente completamente a los 7 días de intervención.

Palabras clave

- Weight of evidence
- Revisión sistemática
- Bioinformática
- Hidratos de carbono
- Microbiota intestinal
- Microbioma intestinal

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	4
TABLA DE CONTENIDO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.2. PROBLEMA A INVESTIGAR	10
1.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	11
1.4. HIPÓTESIS	11
1.5. OBJETIVO GENERAL.....	11
1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
1.7. JUSTIFICACIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1. EL USO DE ALGORITMOS COMPUTACIONALES EN LAS REVISIONES SISTEMÁTICAS	14
2.1.1. <i>Revisión sistemática</i>	14
2.1.2. <i>Jerarquía de la evidencia científica</i>	14
2.1.3. <i>“Weight of evidence” / “Information value”</i>	17
2.2. SECUENCIACIÓN GENÉTICA Y BIOINFORMÁTICA.....	18
2.2.1. <i>Tipos de secuenciación</i>	19
2.2.2. <i>Parámetros que se utilizan en el análisis e interpretación del microbioma intestinal</i>	20
2.2.3. <i>Análisis taxonómico</i>	23
2.3. MICROBIOTA Y MICROBIOMA.....	26
2.3.1. <i>Microbiota</i>	26
2.3.2. <i>El microbioma intestinal humano</i>	26
2.3.3. <i>Microbioma</i>	27
2.4. HIDRATOS DE CARBONO	28
2.4.1. <i>Clasificación general de los hidratos de carbono</i>	28
2.4.2. <i>Los hidratos de carbono como componentes de los alimentos</i>	31
3. METODOLOGÍA	33
3.1. PARTE 1 REVISIÓN SISTEMÁTICA.....	33
3.1.1. <i>Estrategia de búsqueda</i>	33
3.1.2. <i>Búsqueda</i>	35
3.1.3. <i>Tamizaje</i>	35
3.1.4. <i>Síntesis de la información y categorización de las variables</i>	35
3.1.5. <i>Análisis estadístico y co-ocurrencia de variables categóricas</i>	37
3.2. PARTE 2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE MICROBIOMA INTESTINAL DE RATÓN	38
3.2.1. <i>Selección de base de datos a trabajar</i>	38
3.2.2. <i>Obtención y organización de los datos</i>	39
3.2.3. <i>Desarrollo de algoritmo computacional para análisis del microbioma</i>	39
4. RESULTADOS	51
4.1. PARTE 1 REVISIÓN SISTEMÁTICA.....	51
4.1.1. <i>Estrategia de búsqueda y búsqueda</i>	51
4.1.2. <i>Tamizaje</i>	52
4.1.3. <i>Análisis estadístico y co-ocurrencia de variables categóricas</i>	55
4.2. PARTE 2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE MICROBIOMA INTESTINAL DE RATÓN	56
4.2.1. <i>Obtención y organización de datos</i>	56

4.2.2. Desarrollo de algoritmo computacional para análisis de microbioma de ratón	57
5. DISCUSIÓN	72
5.1. PARTE 1 REVISIÓN SISTEMÁTICA	72
5.1.1. Polisacáridos sulfatados	73
5.1.2. Almidón gelatinizado.....	74
5.1.3. Polisacáridos provenientes de hongos macromycetos	75
5.1.4. Oligosacáridos	75
5.1.5. Fibra insoluble	76
5.1.6. Almidón	76
5.1.7. Fibra soluble	76
5.1.8. Inulina.....	77
5.1.9. Hidratos de carbono como aditivos alimentarios o como componentes naturales de los alimentos	77
5.1.10. Hidratos de carbono como compuestos funcionales, hidratos de carbono funcionales.....	77
5.2. PARTE 2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL MICROBIOMA INTESTINAL	78
5.2.1 Diferencias taxonómicas	78
5.2.2 Alfa diversidad.....	79
5.2.3 Beta diversidad.....	80
6. CONCLUSIONES	81
6.1. PARTE 1 REVISIÓN SISTEMÁTICA	81
6.2. PARTE 2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE UNA BASE DE DATOS PÚBLICA GENERADA A PARTIR DE UNA INTERVENCIÓN CON FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y EXTRACTO DE <i>H. UNDATUS</i>	82
7. REFERENCIAS.....	83

Lista de figuras

Figura 1: Jerarquía de la evidencia científica (Adaptado de S. Wallace y col)	15
Figura 2: Jerarquías taxonómicas ^{45,46}	24
Figura 3: Factores que pueden modificar el microbioma intestinal	28
Figura 4: Clasificación general de los hidratos de carbono	29
Figura 5: Panorama científico – Co-ocurrencia de términos que aparecen juntos en los documentos arrojados por los buscadores. Se pueden observar 4 principales grupos: rojo (microbiota humana), azul (modelos murinos) verde (estudios metabólicos) y amarillo (modelos patológicos).	51
Figura 6: Revisión y tamizaje de los artículos	52
Figura 7: Histograma que representa el número de secuencias por muestra.....	58
Figura 8: análisis de secuencias que se pueden utilizar para el análisis del microbioma tras filtración y control de calidad.	59
Figura 9: Alfa diversidad por índice de Faith	59
Figura 10: Análisis de alfa diversidad por uniformidad	60
Figura 11: Análisis de alfa diversidad por Índice de Shannon.....	60
Figura 12: Alfa diversidad por profundidad de secuenciamiento y secuencias observadas..	61
Figura 13: Análisis de beta diversidad por distancia de Bray Curtis dividiendo las muestras de acuerdo con el polisacárido utilizado	62
Figura 14: Análisis de beta diversidad por Índice de Jaccard dividiendo las muestras de acuerdo con el polisacárido utilizado	62
Figura 15: Beta diversidad por distancia de Bray Curtis dividiendo las muestras por grupo experimental	63
Figura 16: Análisis de beta diversidad por índice de Jaccard dividiendo las muestras según el grupo experimental	63
Figura 17: Análisis de beta diversidad por distancia Unifrac no ponderada dividiendo las muestras según el grupo experimental	64
Figura 18: Análisis de beta diversidad por distancia Unifrac ponderada dividiendo las muestras según el grupo experimental	64
Figura 19: Asignación taxonómica por filo	65
Figura 20: Asignación taxonómica por Clase	66
Figura 21: Asignación taxonómica por Orden	66
Figura 22: Asignación taxonómica por familia.....	67
Figura 23: Asignación taxonómica por Género.....	68
Figura 24: Asignación taxonómica por especie	70

Lista de tablas

Tabla 1: Descripción de la herramienta SPIDER.....	34
Tabla 2: Variables categóricas utilizadas como posibles variables predictivas	53
Tabla 3: Aumento y disminución reportada de variables de diversidad bacteriana (BDVs) utilizadas como variables de respuesta.....	54
Tabla 3: Aumento y disminución reportada de variables de diversidad bacteriana (BDVs) utilizadas como variables de respuesta.....	54
Tabla 4: Variables predictivas y de respuesta con valor de la Información (IV) y repeticiones	55
Tabla 5: Metadatos utilizados para el análisis del microbioma intestinal Error! Bookmark not defined.	
Tabla 6: Número de secuencias por muestra	57

1. Introducción

1.1. Problema a investigar

En la actualidad, existen muchas investigaciones clínicas y preclínicas, acerca de la composición del microbioma intestinal, pues se ha observado que dicha composición influye de forma directa en la salud física y emocional del hospedero ^{2,3}. Sin embargo, es difícil comparar dichos estudios debido a las diferencias metodológicas que presentan; la diversidad de técnicas experimentales para cuantificar y caracterizar el microbioma intestinal, iniciando con el modelo experimental, la caracterización que se puede realizar con técnicas tradicionales o a partir de técnicas de secuenciación genética ya sea del gen 16S del RNA ribosomal (16S rRNA) o de genoma completo. Así mismo, los algoritmos bioinformáticos disponibles para el análisis taxonómico y las bases de datos de referencia taxonómica pueden generar resultados no comparables entre estudios.

Dado lo anterior, para poder generar una revisión amplia, que permita comparar los resultados entre diferentes estudios, es necesario, por un lado, comprender los análisis bioinformáticos actuales, ser capaces de replicarlos, y por otro lado, recurrir a herramientas estadísticas que hasta el momento no han sido utilizadas en esta rama particular de la ciencia, tal es el caso del peso de la evidencia (Weight of Evidence /WoE) y el valor de la información (Information Value /IV) ⁴⁻⁸. Ambas técnicas, son medidas estadísticas que se utilizan en análisis de datos para modelar y evaluar el poder predictivo de variables independientes sobre variables potencialmente dependientes (variables de respuesta). El WoE usa el número de eventos en los que una variable independiente podría modificar a una variable respuesta, mientras que el IV cuantifica la posible relación o poder predictivo entre una variable independiente y una potencialmente dependiente en problemas de clasificación binaria.

Por otro lado, los hidratos de carbono son la principal fuente de energía para el ser humano^{9,10}. Son un tipo de biomoléculas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Están presentes en prácticamente todos los alimentos y clasificados de acuerdo con su tamaño, digestibilidad, composición química y tipos de enlaces.

En la actualidad, se ha evidenciado que los hidratos de carbono que llegan sin digerir al intestino grueso tienen un efecto importante sobre la composición del microbioma intestinal^{10,11}. Sin embargo, los estudios actuales, de forma general, se enfocan en analizar de forma puntual algún alimento o algunos hidratos de carbono específicos, dado que estudios más amplios, realizados de forma experimental, requieren una inversión considerable y corren el riesgo de incorporar variables confusoras. En la actualidad, es necesaria una revisión más amplia de la literatura existente, que utilice técnicas diferentes a las que se han utilizado en el pasado, para interpretar las relaciones entre los hidratos de carbono y el microbioma intestinal.

Por lo anterior, los análisis bioinformáticos elaborados en este tipo de estudios presentan una gran variabilidad metodológica, dada la existencia de diferentes librerías y bases de datos

genéticos^{12,13}. Con el objetivo de estandarizar dicho proceso, se busca crear un método bioinformático capaz de asignar taxonomía a nivel de *phylum* y género a las bacterias presentes en el microbioma intestinal a partir de secuenciamiento de regiones de hipervariabilidad V3 y V4 del gen 16S rRNA¹⁴⁻¹⁷.

1.2. Pregunta de investigación

Dada la variabilidad de metodologías existentes para analizar el microbioma intestinal, ¿Es posible evidenciar la relación entre los hidratos de carbono y el microbioma intestinal mediante el uso de algoritmos computacionales estadísticos y bioinformáticos utilizando librerías existentes en Qiime2 y Python? y ¿Es posible replicar el análisis bioinformático de una base de datos pública y obtener resultados similares a los ya publicados por otro grupo de investigación?

1.3. Hipótesis

Al aplicar técnicas estadísticas como el Peso de la información (mejor conocido como Weight of Evidence) y el Valor de la Información (Information Value) en una revisión sistemática de la literatura, sobre el efecto del consumo de diferentes hidratos de carbono sobre la microbiota intestinal, se podrán identificar relaciones entre tipos específicos de hidratos de carbono y *phylum* y géneros bacterianos, lo cual permitirá comparar los resultados de estudios ya publicados realizados por diversos autores.

Así mismo, la información obtenida de dicha revisión sistemática permitirá localizar una base de datos pública de gen 16S rRNA a la cual se le asignará taxonomía y obtendrán visualizaciones de alfa y beta diversidad utilizando el software QIIME2 y la base de datos de referencia SILVA 132.

1.4. Objetivo general

Desarrollar una técnica de revisiones sistemáticas para examinar las relaciones potenciales entre las características de los hidratos de carbono ingeridos, que se denominaron como variables predictivas, y los cambios en la abundancia relativa de filos y géneros bacterianos del microbioma intestinal, que se denominaron como variables de respuesta, con el fin de identificar patrones y correlaciones que puedan informar sobre el impacto dietético en la composición del microbioma intestinal en humanos. Adicionalmente, elaborar un flujo de procesamiento de datos bioinformáticos, capaz de generar visualizaciones de alfa y beta diversidad y asignar taxonomía a secuencias de gen 16S rRNA utilizando una base de datos pública de ratones cuya dieta incluye diferentes dosis de fructooligosacáridos o extracto de *Hylocereus undatus*.

1.5. Objetivos específicos

- Adaptar las técnicas WoE e IV a una revisión sistemática en las ciencias biológicas que permita relacionar el consumo de diferentes hidratos de carbono (oligosacáridos y polisacáridos) con la composición del microbioma intestinal.
- Construir un flujo de procesamiento de datos bioinformáticos que sea capaz de generar visualizaciones de alfa y beta diversidad, así como asignar taxonomía a bases de datos que contengan secuencias de gen 16S rRNA pertenecientes a microbiota intestinal.
- Desarrollar una revisión sistemática de la literatura actual, tomando en cuenta los 5 años previos al 9 de marzo de 2021, evaluando los cambios en el microbioma intestinal tras el consumo de hidratos de carbono específicos, usando la herramienta SPIDER^{18,19} para revisiones sistemáticas cumpliendo con las recomendaciones de las guías PRISMA.
- Establecer el poder predictivo del consumo de diferentes hidratos de carbono, clasificados según su estructura general y la procedencia de dichas moléculas, ya sea que se encuentren presentes en los alimentos, o que se utilicen como ingredientes funcionales y aditivos, sobre diferentes variables de diversidad bacteriana que forman parte de la microbiota intestinal, utilizando los artículos de la revisión sistemática.
- Determinar si algunos grupos de hidratos de carbono tienen influencia sobre la abundancia de diferentes *phylum* y géneros bacterianos.
- Experimentar el flujo de procesamiento de datos bioinformáticos en una base de datos pública de ratones cuya dieta incluye diferentes dosis de *H. undatus* y fructooligosacáridos.

1.6. Justificación

En la actualidad existen muchas metodologías para caracterizar la composición del microbioma intestinal. Sin embargo, dichas metodologías en pocas ocasiones son comparables entre sí debido a varios factores. Entre estos factores se encuentran el uso de diferentes especies en el modelo experimental, las condiciones experimentales, las técnicas de secuenciación utilizadas tanto de genoma completo como de gen 16S rRNA, las bases de datos y programas bioinformáticos para asignar taxonomía, que son diversos y se encuentran en constante actualización^{15,17,20}.

Además, la asociación entre la microbiota y los hidratos de carbono es complicada de interpretar por varias razones, entre las cuales se incluyen las fuentes de hidratos de carbono, y las concentraciones utilizadas en cada estudio.

Para poder concluir, es fundamental comprender las técnicas bioinformáticas avanzadas que permiten la caracterización de la microbiota a partir del secuenciamiento del gen 16S rRNA o de genoma completo.

Mediante la aplicación de las técnicas WoE-IV y la técnica de binarización de variables, el presente proyecto busca mejorar la comprensión de cómo la dieta, a partir del consumo de diferentes carbohidratos, modifica la composición de la microbiota intestinal. Dichas metodologías fueron desarrolladas en la década de 1950 con el objetivo de resolver problemas de clasificación en el análisis de créditos bancarios y predecir un resultado específico ⁴.

Al observar los datos que se obtienen de un análisis de microbioma intestinal, el tipo de datos en forma y objetivo es similar a las metodologías de clasificación crediticia, puesto que la abundancia relativa de cada género o *phylum* microbiano se puede binarizar de la misma forma que las variables económicas. El uso de técnicas estadísticas aplicadas, que no se habían utilizado en este tipo de revisión, permitiría obtener mejores conclusiones y podría indicar nuevas líneas de investigación para así, buscar eventualmente modular la microbiota intestinal generando intervenciones dietéticas con un mejor impacto sobre la salud del hospedero ^{3,6,21-24}.

El proyecto de investigación aquí presente, es relevante debido a la creciente evidencia que sugiere que la composición de la dieta tiene un impacto sobre la microbiota intestinal que a su vez tiene influencia sobre la salud sistémica del hospedero ^{3,25-27}.

Existe evidencia acerca del papel de la dieta en la modulación de la composición de la microbiota intestinal, siendo quizá el factor modificable, que permita modificarla de forma más significativa ³. Uno de los componentes más importantes son los hidratos de carbono que llegan al intestino grueso sin digerir, ya que son fuente importante de nutrientes para los microorganismos allí presentes presentando un efecto modulador sobre el microbioma intestinal.

Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la influencia de los hidratos de carbono en la microbiota intestinal, se han centrado en la evaluación de un alimento específico o un hidrato de carbono específico, sin adoptar una perspectiva global. Por lo anterior existe una necesidad de realizar una revisión sistemática exhaustiva, utilizando técnicas estadísticas como WoE-IV, para identificar los hidratos de carbono que podrían tener un impacto significativo en la composición de la microbiota intestinal.

2. Marco teórico

2.1. El uso de algoritmos computacionales en las revisiones sistemáticas

2.1.1. Revisión sistemática

Una revisión sistemática es un tipo de investigación que busca identificar, evaluar y sintetizar toda la evidencia disponible en torno a una pregunta o tema de investigación específica y bien delimitada ^{19,28}.

Consiste en una metodología rigurosa para encontrar la literatura existente, extraer su información, clasificarla y sintetizarla para llegar a conclusiones. Implica necesariamente la búsqueda en diferentes bases de datos, la determinación de palabras claves para determinar una consulta o “search query”, la evaluación de la calidad de dichos estudios, la síntesis de la información en una forma transparente y libre de sesgos metodológicos.

En una revisión sistemática se deben determinar criterios de inclusión y exclusión, así como los métodos para analizar la literatura. Los resultados se pueden sintetizar de manera narrativa, o en caso de que las metodologías sean comparables, será posible hacer un metaanálisis ²⁹.

Las revisiones sistemáticas son ampliamente utilizadas en temas relacionados con la salud y llevan consigo un nivel de evidencia tal, que pueden ayudar a la creación de guías de prácticas clínicas y tomas de decisiones. También se utilizan en otras áreas como ciencias sociales y ambientales para evaluar la efectividad de intervenciones ³⁰.

2.1.2. Jerarquía de la evidencia científica

La jerarquía de la evidencia científica se utiliza en la investigación científica para clasificar los diferentes estudios dependiendo de la confiabilidad de sus resultados y el nivel de evidencia que aportan (Figura 1), entre más arriba se encuentre un tipo de estudio en la pirámide, se considera que la evidencia obtenida es más fuerte ²⁹. A continuación se describen cada uno de los niveles representados en la Figura 1.

Jerarquía de la evidencia científica



Figura 1: Jerarquía de la evidencia científica (Adaptado de S. Wallace y col, 2022) ²⁹

a) Metaanálisis y Revisiones Sistemáticas (01)

Son el nivel más alto de evidencia científica ya que agrupan datos de múltiples estudios para proveer un análisis completo tratando de dar respuesta a una pregunta de investigación en particular. Se considera que son menos propensos a tener sesgos y deben seguir ciertas reglas al momento de ser elaborados, dichas reglas se encuentran estandarizadas en documentos de acceso público, el más conocido y utilizado es el “PRISMA statement” ²⁸ (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) ³⁰ o en el caso de revisiones elaboradas en el área de salud, también se pueden seguir los lineamientos de Cochrane, mismos que piden registrar el protocolo y actualizar los resultados con el paso del tiempo ³¹.

Al plantear una pregunta de investigación para la realización de una revisión sistemática, se debe utilizar una herramienta para estandarizar la búsqueda de la información. Esto asegura la inclusión del mayor número posible de artículos relevantes y minimiza la posibilidad de exclusión de artículos potencialmente importantes. Para lo anterior, se han planteado tres estrategias principales, PICO, PICOS y SPIDER por sus siglas en inglés ¹⁹.

- PICO: “Population, Intervention, Comparison and Outcomes”, es decir: Población, Intervención, Comparación y Resultados.
- PICOS: En donde la S viene por “Study design”, es decir: Diseño del estudio o tipo de estudio.
- SPIDER: “Sample, Phenomenon of Interest, Design, Evaluation, Research type” es decir: Muestra, Fenómeno de Interés, Diseño experimental, Evaluación y Tipo de investigación. ^{30,31}

b) Ensayos aleatorios controlados (02)

Estos son estudios en los que se asigna a los participantes de manera aleatoria a un grupo control o uno con intervención para así medir los resultados. Se considera que son los más eficaces para evaluar la eficacia de una intervención en particular ²⁹.

c) Estudios de cohorte (03)

En estos estudios se sigue a un grupo de individuos a lo largo del tiempo para observar la incidencia de un efecto en particular, son útiles para medir la asociación entre un factor de riesgo y un efecto ²⁹.

d) Estudios transversales (04)

Se utilizan para medir la prevalencia de un efecto y exposición en un punto en el tiempo, son útiles para medir asociaciones entre variables, pero no pueden establecer causalidad ²⁹. Por ejemplo, pueden identificar una asociación entre el consumo de un hidrato de carbono específico y la mejora de la salud gastrointestinal pero no pueden confirmar que el consumo de dicho hidrato de carbono sea la causa directa de la mejora en la salud gastrointestinal. Para establecer causalidad, se necesitan estudios adicionales, como ensayos aleatorios controlados.

e) Estudios de caso-control (05)

Son estudios que comparan individuos con un resultado en particular (casos) con otros que no tienen dicho resultado (controles) y buscan diferencias de exposición entre esos dos grupos, son útiles para buscar factores de riesgo o protección ²⁹.

f) Reportes de caso y series de caso (06)

Son aquellos que describen casos individuales o un grupo pequeño de casos, son útiles para generar hipótesis, pero no permiten generalizar resultados ²⁹.

g) Estudios de ciencia básica y ciencia traslacional (07)

La ciencia básica consiste en estudios de laboratorio, *in vitro* o en animales para lograr entender un fenómeno. La ciencia traslacional busca cerrar la brecha entre la ciencia básica y la aplicación en salud, se usa para generar formas de prevenir, diagnosticar o tratar ciertas enfermedades, esta implica estudios en laboratorio, animales y estudios clínicos en humanos ²⁹.

2.1.3. “Weight of evidence” / “Information value”

La comparación entre la evidencia obtenida de diferentes estudios puede ser complicada debido a las diversas metodologías utilizadas, sin embargo, una propuesta es la binarización de los datos, a modo de no tomar en cuenta la magnitud del efecto, sino la aparición o falta de dicho efecto. Para la realización de este tipo de análisis, se han desarrollado diferentes técnicas, entre las cuales se encuentran el WoE y el IV ⁵.

La categorización de variables y la binarización de los datos puede facilitar el uso de algoritmos especializados para comparar información perteneciente a un amplio rango de temas, incluyendo estudios cuya metodología puede tener diferencias metodológicas importantes, formalmente ambos términos se pueden definir de la siguiente forma:

La categorización de variables es el proceso de dividir un grupo de variables en categorías basándose en sus características. El proceso es utilizado en análisis estadístico y manejo de datos para organizar y analizar mejor los datos ³².

La binarización de datos es una técnica de procesamiento que involucra convertir variables categóricas o continuas en una variable que puede únicamente tomar dos valores. En algunos casos, esto involucra la creación de diferentes variables para cada categoría de la variable original ³³.

Sin embargo, confiar únicamente en estas técnicas puede dejar pasar ciertos patrones o repeticiones en los datos. Para superar dicha limitación, el uso de WoE- IV ha sido sugerido. El WoE es una transformación que usa el número de “bins” o eventos en los que la variable independiente puede afectar a la variable de respuesta. IV es una técnica que se obtiene del WoE que identifica las variables importantes dentro de un modelo predictivo ³⁴. Estos valores se calculan de la forma siguiente ⁵.

$$WoE_i = \log \left(\frac{\frac{N_i}{\sum_{i=1}^n N_i}}{\frac{P_i}{\sum_{i=1}^n P_i}} \right)$$

Ecuación 1: Weight of evidence

Donde:

- WoE_i es la medida de la contribución de una variable predictora en el análisis.
- N_i es la frecuencia con la que ocurren juntas la variable de respuesta y la variable predictora en el análisis.
- P_i es la frecuencia con la que ocurre la variable de respuesta en el análisis.

$$IV = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{N_i}{\sum_{i=1}^n N_i} - \frac{P_i}{\sum_{i=1}^n P_i} \right) W_oE_i \right]$$

Ecuación 2: Information Value

Donde:

- IV es la medida del valor de la información.
- W_oE_i es la medida de la contribución de una variable predictora en el análisis.
- $\frac{N_i}{\sum_{i=1}^n N_i}$ es la frecuencia con la que ocurren juntas la variable de respuesta y la variable predictora en el análisis.
- $\frac{P_i}{\sum_{i=1}^n P_i}$ es la frecuencia con la que ocurre la variable de respuesta en el análisis.

Las técnicas antes mencionadas son útiles para evaluar el IV de variables independientes, también conocidas como variables predictivas, contra variables potencialmente dependientes, también llamadas variables de respuesta ³⁵, permitiendo así la selección de variables binarias que pueden predecir un resultado específico ⁶⁻⁸.

En los últimos años, este enfoque se ha aplicado exitosamente para comparar entre diferentes ensayos clínicos, incluso generando metodologías que unifican el uso de estas técnicas.

Entre las limitaciones de este modelo se encuentran que asume una relación entre dos variables, pero puede pasar por alto interacciones con otras variables. Así mismo, este modelo únicamente funciona para variables binarias, no para variables continuas.

A continuación, se definirán los conceptos bioinformáticos pertinentes para la realización de este trabajo.

2.2. Secuenciación genética y Bioinformática

La bioinformática es el campo interdisciplinar que aplica los métodos y herramientas computacionales para analizar e interpretar datos biológicos. Involucra el desarrollo y uso de programas y algoritmos para recolectar, almacenar, analizar y visualizar la información biológica.

De acuerdo con Luscombe y colaboradores, 2001³⁶: La bioinformática es la conceptualización de la biología en términos de macromoléculas y la aplicación de técnicas informáticas provenientes de disciplinas tales como las matemáticas o las ciencias computacionales para organizar la información asociada a dichas macromoléculas a gran escala ³⁶.

En la actualidad, la bioinformática juega un rol crítico en áreas como las actualmente conocidas “Ciencias OMICAS”, aquellas que estudian las moléculas biológicas a gran escala utilizando técnicas de alto rendimiento, tales como la proteómica, genómica, transcriptómica, metabolómica y en la biología de sistemas, habilitando a los investigadores a comprender mejor la estructura, función y evolución de los sistemas biológicos ³⁷. Para el estudio del microbioma intestinal, en la actualidad, se utilizan principalmente las siguientes técnicas de secuenciación.

2.2.1. Tipos de secuenciación

a) Secuenciación de gen 16s rRNA

La secuenciación del gen 16S rRNA es una técnica utilizada en biología molecular para identificar y clasificar las bacterias basadas en la secuencia del gen completo o una región específica de dicho gen. Este gen, está presente en todas las bacterias, pero al mismo tiempo su secuencia varía entre las diferentes especies bacterianas, permitiendo así identificarlas. El gen 16S rRNA es altamente conservado, lo que significa que es relativamente similar entre todas las especies bacterianas, pero difiere en sitios específicos para cada especie ^{16,38}.

Para la secuenciación, como ya se mencionó antes, se puede identificar el gen 16S rRNA completo, o ciertas regiones hipervariables, en el caso del análisis del microbioma intestinal, las regiones de interés son la región V3 y V4 las más comúnmente utilizadas ^{39,40}.

El gen 16S rRNA tiene nueve regiones hipervariables que comprenden de V1 a V9. Para el análisis de microbioma intestinal se utilizan principalmente las regiones V3 y V4, ya que tienen suficiente variabilidad para la diferenciación a diferentes niveles taxonómicos, incluso especie, pero también son lo suficientemente constantes, lo que hace posible su amplificación con primers comerciales diseñados para géneros que se sabe pueden estar presentes en el intestino. Además, dichas regiones, cuando se amplifican juntas producen un fragmento de al menos 300 pares de bases ^{14,41}.

El proceso de secuenciación, para analizar la microbiota intestinal o fecal, implica la extracción de ADN de una muestra de heces o de los microorganismos adheridos al tejido intestinal, amplificarlo utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente secuenciarlo utilizando tecnologías de “High- throughput” tales como Illumina o Nanopore ⁴².

b) Secuenciación de genoma completo

La secuenciación de genoma completo, o WGS por sus siglas en inglés consiste en la utilización de “primers” aleatorios, para secuenciar regiones que se traslapan en el genoma para después ensamblarlos utilizando herramientas bioinformáticas. Entre las ventajas que esta metodología tiene, se encuentran que la taxonomía se puede asignar de una forma más precisa y definida al nivel de especie e incluso de cepa. Sin embargo, es una técnica cara y que requiere un poder de cómputo mayor para ser interpretada ⁴⁰.

A partir de la información de secuencias obtenidas mediante estos procesos, se obtienen grandes cantidades de texto con secuencias genéticas, que no pueden ser interpretadas a simple vista o con programas computacionales comunes, estas se deben analizar desde diferentes perspectivas para caracterizar así la microbiota intestinal.

2.2.2. Parámetros que se utilizan en el análisis e interpretación del microbioma intestinal

Los parámetros utilizados en el análisis e interpretación del microbioma intestinal sirven para analizar la complejidad del ecosistema microbiano, entre ellos se incluyen los árboles filogenéticos, la composición taxonómica y la diversidad microbiana, tanto a nivel evolutivo o microbiano, como al compararla entre diferentes hospederos.

a) Árbol filogenético

Los árboles evolutivos o filogenéticos son representaciones que muestran la relación evolutiva entre diferentes especies o taxones de microorganismos. Se construyen a partir de datos moleculares o morfológicos, como secuencias de ADN. En el análisis del microbioma intestinal permiten analizar y predecir las funciones de las comunidades microbianas que se encuentran en el tracto gastrointestinal. También permiten conocer las posibles rutas metabólicas que se llevan a cabo en un taxon específico y obtener información al combinar esto con otras ciencias omicas como metagenómica o metabolómica ³⁷.

b) Alfa diversidad

Es una medida que se utiliza para describir la diversidad y riqueza de un microbioma tomando en cuenta una sola muestra. Es una medida que observa los diferentes taxones presentes en una muestra y que tan uniformemente están distribuidos. En general se utilizan diferentes índices para observarla y compararla con los datos obtenidos de otras muestras, el más común es el Índice de Shannon.

Una mayor alfa diversidad indica un mayor número de taxones microbianos y mayor abundancia relativa en la muestra, es decir mayor cantidad de especies y sub-especies de microorganismos. Se utiliza para conocer información en estudios de microbioma como la respuesta a cambios medioambientales, por ejemplo, dentro del microbioma intestinal, para conocer la respuesta a cambios de edad, fármacos, suplementos, cambios dietéticos entre otros.⁴³

- Índice de Shannon

El Índice de Shannon (Ecuación 3) toma en cuenta el número de especies y su abundancia relativa en una comunidad (microbioma). Se calcula de la siguiente manera:

$$H = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$$

Ecuación 3: Índice de Shannon

Donde p_i es la proporción de individuos en la comunidad que pertenecen al número total de especies especie. Su rango máximo es el número total de especies en la comunidad. Un valor de cero indicaría que la comunidad contiene únicamente una especie ^{44,4545}

- Beta diversidad

La beta diversidad es una medida de la variación en la composición de especies entre dos muestras (esto puede ser hábitats, lugares, grupos experimentales o cambios a lo largo del tiempo). Al igual que la alpha diversidad utiliza una variedad de índices entre los que se encuentran el índice Jaccard, Distancia de Bray-Curtis y Unifrac ponderado y no ponderado ⁴⁶.

- Índice de Jaccard

Es un coeficiente de similitud que no toma en cuenta la abundancia del taxon, sino que toma en cuenta la presencia o ausencia de dicho taxon en una muestra ⁴⁶. Se representa de la siguiente forma (Ecuación 4):

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A| + |B| - |A \cap B|}$$

Ecuación 4: Índice de Jaccard

Donde:

Se dividen el número de elementos en común sobre el número de elementos diferentes entre las muestras.

- La distancia de Bray-Curtis

Es una medida de similitud o diferencia entre dos muestras, toma en cuenta tanto la presencia como la abundancia de un taxon ⁴⁶, se calcula de la siguiente forma (ecuación 5):

$$BC_d = \frac{\sum |x_i - x_j|}{\sum (x_i + x_j)}$$

Ecuación 5: Distancia de Bray-Curtis

Donde:

$|x_i - x_j|$ es la resta de la abundancia de una especie en una muestra al compararla con otra muestra.

$\sum(x_i + x_j)$ es la sumatoria de la abundancia de dicha especie en las diferentes muestras.

- Unifrac

Es una métrica que calcula las diferencias entre las comunidades microbianas basándose en su cercanía filogenética⁴⁷⁻⁵¹. Existen dos formas de calcularlo, ponderado (ecuación 7) o no ponderado (ecuación 6). El Unifrac ponderado no toma en cuenta la abundancia, mientras que el no ponderado toma en cuenta la abundancia de diferentes taxones⁴⁶.

$$u = \frac{\sum_{i=1}^N l_i |A_i - B_i|}{\sum_{i=1}^N l_i \max(A_i - B_i)}$$

Ecuación 6: Unifrac no ponderado

Donde:

N es el número de nodos en el árbol filogenético

l_i es la distancia entre un nodo y el último punto compartido

A_i y B_i son indicadores que equivalen a 0 o 1 si en una comunidad (muestra) se encuentran descendientes de un nodo determinado

$$W = \frac{\sum_{i=1}^N LI \left| \frac{A_i}{A_T} - \frac{B_i}{B_T} \right|}{\sum_{j=1}^S L_j}$$

Ecuación 7: Unifrac ponderado

Donde:

N es el número de nodos en un árbol

LI es la distancia entre un nodo y el último punto compartido

L_j es la longitud total de la rama desde la raíz hasta la punta del árbol filogenético para la secuencia j

A_i y B_i son el número de secuencias de las comunidades microbianas que descienden del mismo nodo.

A_T y B_T el número total de secuencias en la comunidad A y en la comunidad B respectivamente

c) Agrupación de las secuencias: OTUS y ASV's

Para realizar una correcta clasificación de las secuencias se deben clusterizar o agrupar. La forma más común de agrupación son los OTU's (Operational Taxonomic Units) que son grupos de secuencias similares basadas en un límite de similitud, se han utilizado durante muchos años, pues los requerimientos a nivel de poder de cómputo disponible son menores, permitiendo generar agrupaciones que se pueden analizar ⁵².

Los ASV's (Amplicon Sequence Variants), también llamados previamente ZOTU's son una forma de agrupamiento más reciente que se basa en un algoritmo que toma en cuenta la secuencia exacta de cada lectura, se considera un método más preciso de agrupamiento e identificación porque son capaces de distinguir algunos de los errores de secuenciación ⁵³. A partir de ello podemos realizar el análisis taxonómico que se describe en la siguiente sección.

2.2.3. Análisis taxonómico

De acuerdo con la Real Academia Española, la taxonomía es la "ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación. Se aplica en particular, dentro de la biología, para la ordenación jerarquizada y sistemática, con sus nombres, de los grupos de animales y de vegetales". ⁵⁴.

La taxonomía es la disciplina biológica que identifica, describe y clasifica y nombra a las especies existentes y extintas. En la actualidad se enfrenta al reto de incorporar teorías, métodos y datos de disciplinas que estudian el origen, genética, límites y evolución de las especies. ⁵⁵

En el análisis bioinformático, la asignación de taxonomía se realiza para conocer la composición del microbioma con tanta exactitud y profundidad como sea posible, es decir, lo más cerca de la categoría taxonómica "especie", (Figura 2), que la profundidad de secuenciación lo permita. Lo anterior se realiza mediante la comparación de las secuencias obtenidas de una muestra con bases de datos existentes. Una vez que se tienen clusterizadas (agrupadas) las secuencias en ASV's u OTU's se debe asignar taxonomía a cada uno de éstos, para lo anterior se debe seleccionar la base de datos que mejor se adapte al tipo de secuencias que se tienen y los clasificadores que darán resultados adecuados.

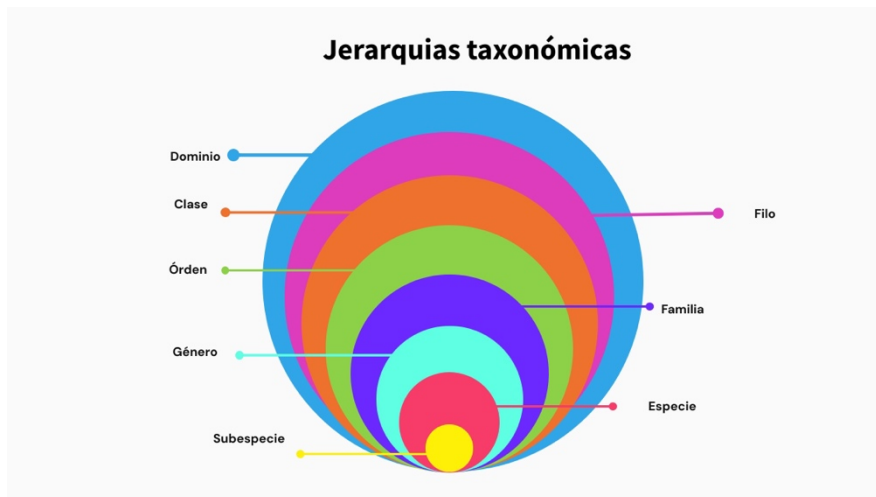


Figura 2: Jerarquías taxonómicas ^{56,57}

a) Principales bases de datos para análisis taxonómico

- SILVA

Esta base de datos contiene información de gen 16S rRNA para procariotas y 18S rRNA para eucariotas. Obtiene la información de Bergey's Taxonomic Outlines y de la "List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature" (LPSN) mientras que para las especies eucariotas se basa en la International Society of Protistologists (ISOP) ^{12,13,58}.

- Greengenes

Esta base de datos está dedicada a Bacterias y Arqueas, se basa en el mapeo de otras fuentes como National Center for Biotechnology Information (NCBI), y en la construcción de árboles filogenéticos, la base de datos no ha sido actualizada desde 2013 ^{12,59}.

- NCBI (National Center of Biotechnology Information)

Esta base de datos contiene los nombres de todos los organismos que se han enviado a NCBI y utiliza más de 150 fuentes, la base de datos se actualiza diariamente. Además de la información de 16S rRNA y genoma completo, contiene los nombres de cada especie, los linajes taxonómicos. Esta base de datos se encuentra almacenada en un servidor SQL ^{12,60}.

- EzBioCloud

Esta base de datos contiene secuencias de 16S rRNA, pero también secuencias de genoma completo tanto para bacterias como archeas y se actualiza constantemente ⁶¹.

- **TYGS (Type Genome Server)**

La base de datos y plataforma por un lado extrae las secuencias de 16S rRNA y posteriormente compara las lecturas con otros genomas para crear árboles filogenéticos basados en el genoma completo calculando la distancia con otros genomas y estableciendo umbrales de dDDH (DNA-DNA hibridación) para buscar el taxón más parecido a la lectura ⁶².

- **RDP (Ribosomal Database Project)**

Es una base de datos que contiene información de bacterias, arqueas y hongos. Al mismo tiempo contiene herramientas para la búsqueda de datos, clasificación taxonómica y construcción de árboles filogenéticos ¹².

b) Clasificadores y “pipelines” existentes

- **Qiime 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2)**

Es una plataforma gratuita, *open-source* diseñada para manejar bases de datos complejos. Tiene muchas herramientas y métodos programados para analizar, procesar, visualizar e interpretar datos relacionados con microbiología y microbioma ²⁰.

Así mismo, existe un flujo de trabajo o *pipeline* estándar que permite asignar taxonomía a secuencias de gen 16S rRNA con un clasificador basado en Naïve Bayes, uno de los más utilizados para modelos de *machine learning*, pues permite que se modifique la probabilidad representada de que ocurra un evento con información que se va adquiriendo, asumiendo que la ocurrencia de los eventos es independiente entre sí ⁶³.

- **Clasificadores binarios**

Los clasificadores binarios de Naïve Bayes, son modelos de aprendizaje supervisado que se basan en el teorema de Bayes para la clasificación de datos en dos categorías diferentes (en este caso corresponde a esta taxonomía o no) ⁶⁴. El teorema de Bayes describe la probabilidad de un evento basándose en el conocimiento previo de condiciones que podrían estar relacionadas con este evento, se utiliza para calcular la probabilidad de que una secuencia pertenezca a una categoría en función de las bases nitrogenadas que tiene ⁶⁵. En el caso de los modelos Naïve se asume que las características son independientes entre sí para simplificar los cálculos del modelo y que así se pueda entrenar con mayor rapidez y menor cantidad de datos. Este tipo de clasificadores disminuyen considerablemente el poder de cómputo necesario para asignar taxonomía ⁶⁶.

- **Mothur**

Es un programa bioinformático que se utiliza para analizar secuencias de 16S rRNA, provee muchas herramientas y métodos que permiten procesar, analizar y visualizar los datos generados por diferentes plataformas de secuenciación.

Permite controlar la calidad de las lecturas, clusterización, creación de árboles filogenéticos y la clasificación basada en Bayes desarrollado por RDP entre otras herramientas ^{67,68}.

Lo anterior es de gran importancia para estudios de microbioma, donde la precisión y la calidad del análisis de secuencias es crucial para entender la composición y funciones de las comunidades bacterianas.

2.3. Microbiota y microbioma

2.3.1. Microbiota

La microbiota se refiere a una comunidad de microorganismos que habitan un ambiente específico ⁶⁹. Particularmente, a aquellos que residen en el tracto gastrointestinal humano, se les conoce como la microbiota intestinal humana.

2.3.2. El microbioma intestinal humano

El microbioma intestinal humano, se estima que tiene en promedio 150 veces más genes que el genoma humano y que contiene unos 10^{14} microorganismos que pertenecen a diferentes especies ^{21,70} que habitan en diferentes secciones del tracto intestinal.

Cada sección intestinal alberga una composición única de microorganismos que desempeñan diferentes roles. El intestino delgado tiene una diversidad de bacterias que incluye principalmente *Firmicutes* como *Lactobacillus* y *Streptococcus*, y *Bacteroidetes* como *Prevotella*. Estas bacterias contribuyen a la digestión y absorción de nutrientes⁷¹.

Los géneros más encontrados en el intestino delgado de acuerdo con Blaut ⁷²son:

- *Firmicutes: Streptococcus, Lactobacillus, Coprococcus, Megasphaera, Brevibacillus, Veillonella, Gemella*
- *Bacteroidetes: Porphyromonas, Prevotella*
- *Actinobacteria: Actinomyces*
- *Fusobacteria: Leptotrichia, Fusobacterium*
- *Proteobacteria: Neisseria, Haemophilus*

El colon es el segmento más densamente poblado del tracto gastrointestinal, con una predominancia de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. En esta región, las bacterias desempeñan funciones cruciales en la fermentación de fibras dietéticas, la producción de ácidos grasos de cadena corta, y la modulación del sistema inmunológico⁷³. De acuerdo con Blaut ⁷², los géneros que se han encontrado con mayor frecuencia en el colon son los siguientes:

- *Firmicutes* (<50%): *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Butyrivibrio*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Subdoligranulum*, *Anaerostipes*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*
- *Bacteroidetes* (<40%): *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Alistipes*
- *Proteobacteria* (<2%): *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Desulfovibrio*, *Bilophila*
- *Actinobacteria* (<10%): *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *Collinsella*, *Adlercreutzia*, *Slackia*, *Eggerthella*
- *Fusobacteria* (<2%): *Fusobacterium*
- *Verrucomicrobia* (<3%): *Akkermansia*

2.3.3 Microbioma

Por otro lado, existen muchas definiciones de microbioma, pero para los propósitos de este proyecto se utilizará la de Laderberg y McCray ³⁷, pues es la más aceptada en la actualidad, y describe el microbioma como “La comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que residen en un lugar del cuerpo o en un ambiente específico”.

Otra definición que es importante mencionar define al microbioma como “Una comunidad microbiana característica que ocupa un hábitat con propiedades fisicoquímicas específicas y razonablemente bien definido” ⁷⁴.

a) La composición general del microbioma intestinal

El dominio más estudiado que se encuentra en el microbioma intestinal es “bacteria”. Se ha demostrado que la presencia de algunos filos, familias, géneros y especies en el intestino grueso se asocian con un riesgo aumentado o disminuido de desarrollar ciertas enfermedades y con el estado de salud general del hospedero (Figura 3) ⁷⁵⁻⁸¹.

Los filos bacterianos más importantes que se encuentran en el intestino humano son: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Spirochaetes* ⁸² de los anteriores, los más abundantes son *Firmicutes* y *Bacteroidetes* que representan a más del 87% de la microbiota intestinal total ⁸³⁻⁸⁷.

b) Factores que modifican el microbioma intestinal

Existen un amplio rango de factores que influyen la microbiota y el microbioma intestinal, (Figura 3). Los factores que pueden modificar la microbiota se pueden clasificar como no modificables: incluyendo la genética del hospedero ⁸⁸, la colonización temprana ⁸⁹, la alimentación temprana ^{22,90,91}, situación habitacional ⁹², tener hermanos mayores ⁷⁶, mascotas ⁸⁹, el consumo de ciertos medicamentos, especialmente antibióticos ⁹³, y los factores modificables como la dieta y el estilo de vida en general ⁹⁴.

Dentro de los factores modificables, la dieta, especialmente los hidratos de carbono contenidos en ella parecen tener un efecto significativo en la modulación del microbioma intestinal ⁹⁵.

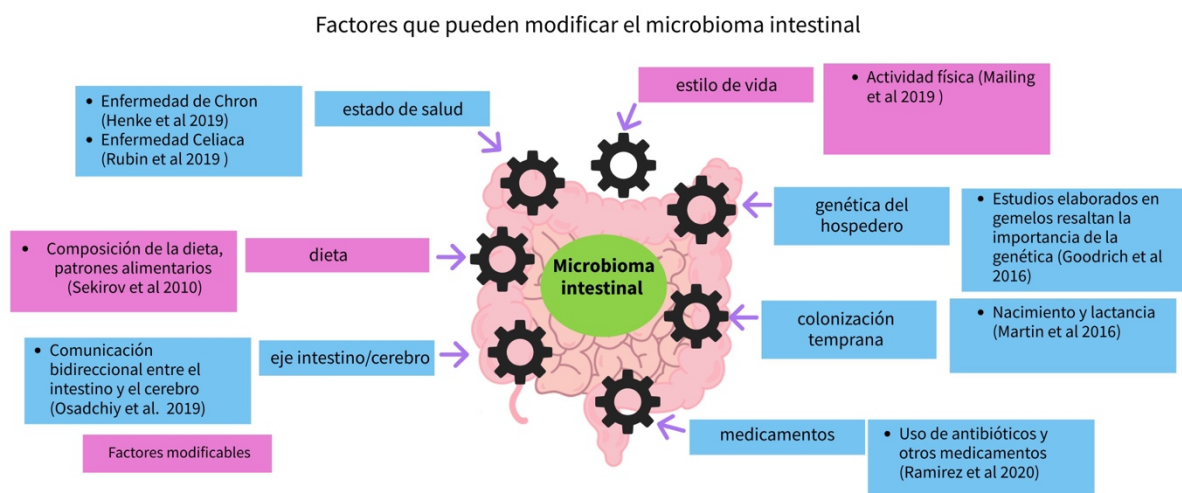


Figura 3: Factores que pueden modificar el microbioma intestinal ⁹⁶

2.4. Hidratos de carbono

2.4.1 Clasificación general de los hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son la fuente principal de energía para los seres humanos, debido a que estas sustancias son relativamente fáciles de romper y obtener energía de ellas comparadas con otros macronutrientes ⁹.

Su fórmula general es $C_n(H_2O)_n$; sus propiedades químicas, fisicoquímicas y biológicas están determinadas por su estructura molecular. Por ejemplo, la celulosa y el almidón son ambos polímeros de glucosa, pero sus diferentes estructuras moleculares resultan en propiedades diferentes, afectando incluso su digestibilidad. Para efectos de esta tesis se utilizarán las clasificaciones de Toussaint y col ⁹⁷ y de Leong y col ⁹ que dividen a los hidratos de carbono en azúcares, oligosacáridos y polisacáridos. También se tomará en cuenta la clasificación de Sajilata y col ⁹⁸ para los azúcares simples, (Figura 4).

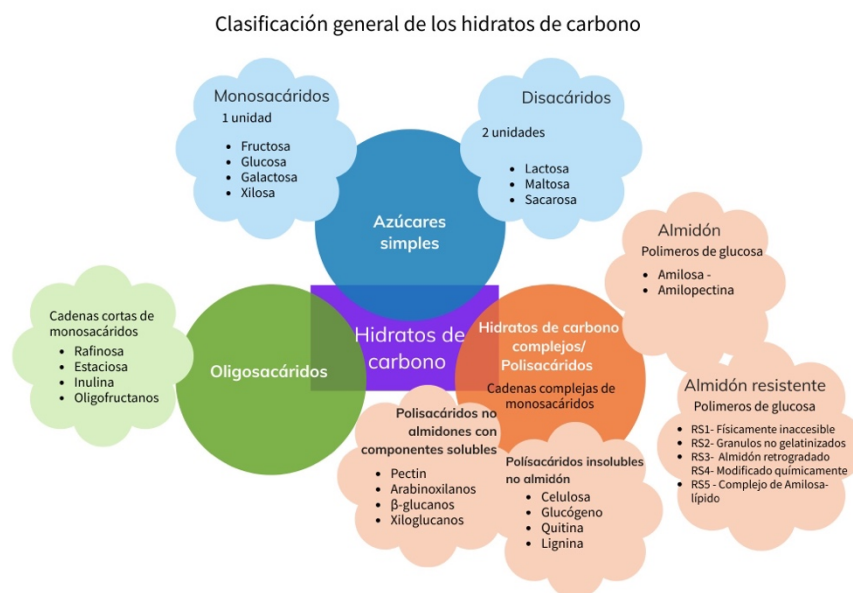


Figura 4: Clasificación general de los hidratos de carbono ⁹⁶

a) Azúcares (monosacáridos y disacáridos)

Los azúcares son hidratos de carbono simples que se absorben en los primeros minutos tras la ingesta. Los monosacáridos y disacáridos son tipos de hidratos de carbono simples, que están compuestos de una o dos moléculas de azúcares. Los ejemplos más comunes de monosacáridos son la glucosa y la fructosa, mientras que los ejemplos más comunes de disacáridos son la sacarosa (azúcar de mesa) y la lactosa ⁹⁹.

Estos compuestos se encuentran comúnmente en frutas y son absorbidos por el intestino delgado como una fuente inmediata de energía. Los disacáridos normalmente son hidrolizados por las enzimas presentes en el intestino delgado, pero en los casos que estas enzimas no se encuentren disponibles, por ejemplo, en el caso de la intolerancia a la lactosa cuando hay una deficiencia de la enzima lactasa, estos compuestos llegarán al intestino grueso, en donde serán degradados por la microbiota intestinal ⁹⁹.

b) Oligosacáridos

Los oligosacáridos, como la inulina y los fructanos, se encuentran en fuentes vegetales y no son digeribles por las enzimas humanas presentes en el intestino delgado. En cambio, estos compuestos llegan al intestino grueso sin digerir, en donde su hidrólisis depende de las enzimas denominadas glucósido hidrolasas (GHs) producidas por la microbiota intestinal. Es decir, no son digeridas por los humanos, sino fermentadas por la microbiota intestinal ¹⁰⁰.

c) Polisacáridos-no almidones con componentes solubles

A este grupo de polisacáridos se les conoce como fibras solubles, en esta clasificación se encuentra la pectina, que es un polisacárido soluble en agua, se encuentran en las paredes celulares de los vegetales, pueden ser parcialmente hidrolizadas por enzimas humanas en el intestino delgado, pero, casi en todas las ocasiones, una parte importante llega al colon ¹⁰¹, algo similar sucede con los beta glucanos, polisacáridos no amiláceos que se encuentran en cereales como el trigo, centeno y la avena. Los arabinosilanos y xiloglucanos son hidratos de carbono compuestos que también se encuentran en fuentes vegetales y llegan al intestino grueso sin digerir.

d) Polisacáridos-no almidones insolubles

Los polisacáridos no almidones o no amiláceos, como la quitina, pueden no ser digeribles por los seres humanos ni por la microbiota intestinal y salen del tracto gastrointestinal intactos, contribuyendo en el proceso de digestión únicamente de manera física ¹⁰².

e) Almidones y almidones resistentes

Los almidones pueden ser los hidratos de carbono más comunes, contrario a lo que anteriormente se pensaba no todos los almidones son digeridos fácilmente en el tracto gastrointestinal humano. De acuerdo con Sajilata y col ⁹⁸ los hidratos de carbono se pueden clasificar según el tiempo que se requiere para realizar su hidrólisis enzimática.

- Almidones rápidamente digeribles – Se hidrolizan en menos de 20 minutos de digestión enzimática.
- Almidones lentamente digeribles – Se absorben en el intestino delgado, hidrolizándose en menos de 100 minutos de digestión enzimática.
- Almidones resistentes – No se hidrolizan tras 120 minutos de incubación enzimática. Estos pueden ocurrir de manera natural, como en el caso del almidón de papa ¹⁰³, pero también pueden ocurrir como resultado del procesamiento de alimentos, tanto en la transformación causada por diferentes técnicas culinarias, como en los tipos de procesamiento que se utilizan a nivel industrial. Existen cinco tipos de almidones resistentes, dependiendo de la razón por la cual, dicha molécula resiste la hidrólisis ⁹.

- Tipo 1: Se encuentra protegido por la matriz del alimento.
- Tipo 2: No ha sido gelatinizado.
- Tipo 3: Ha sido retrogradado debido a cambios de temperatura, por ejemplo, procesos de calentamiento y enfriamiento en múltiples ocasiones.
- Tipo 4: Ha sido modificado químicamente, ahora tiene enlaces que no son α 1-4 ni α 1-6, lo que hace que las enzimas presentes no sean capaces de degradarlo.
- Tipo 5: Son hidratos de carbono que se encuentran unidos a otros compuestos, por ejemplo, lípidos formando complejo amilosa-lípido ¹⁰⁴.

2.4.2. Los hidratos de carbono como componentes de los alimentos

Históricamente, los alimentos con un alto contenido de hidratos de carbono (cereales, tubérculos, leguminosas, frutas y vegetales, así como otros alimentos con un contenido interesante de hidratos de carbono como los hongos (macromicetos y micromicetos), las algas y alimentos de origen animal, sin parte importante de la dieta humana. En algunos casos, estas fuentes de hidratos de carbono se han convertido en parte de la cultura gastronómica tradicional o incluso han sido adoptados por la medicina tradicional ¹⁰⁵.

En años recientes, el efecto del consumo de hidratos de carbono sobre la salud, así como sobre el microbioma intestinal y las interacciones que puede generar con el hospedero, ha ganado la atención de investigadores en el ámbito de la medicina y la nutrición. Existe un creciente interés en estudiar los hidratos de carbono que se encuentran en fuentes alimentarias variadas, tales como cereales, tubérculos y leguminosas que se cocinan y procesan en diferentes formas, así como aquellos que se consideran ingredientes bioactivos y aquellos que se utilizan como aditivos alimentarios ¹⁰.

a) Hidratos de carbono como componentes funcionales o bioactivos

Los compuestos bioactivos son sustancias que tienen un efecto sobre las funciones biológicas y metabólicas, teniendo el potencial de impactar la salud humana de manera positiva ¹⁰⁶.

Como un resultado del avance en las tecnologías para el procesamiento de alimentos y la evolución de la medicina tradicional, en la actualidad, existen ciertos hidratos de carbono que se incorporan a los alimentos como ingredientes funcionales, esperando que traigan consigo un beneficio para el consumidor ¹⁰⁷.

Varias especies vegetales y de hongos macromicetos han sido consideradas por su potencial para sanar o tratar ciertos padecimientos y se han convertido en parte de la medicina tradicional de diferentes culturas, tales como *Dendrobium sonia* ¹⁰⁸, algas marinas ¹⁰⁹, extractos de pepinos de mar ¹¹⁰, *H. undatus* ¹, entre otros. En algunos casos, estas sustancias también se agregan a los alimentos o suplementos para obtener beneficios a la salud. El interés científico por estas sustancias ha aumentado llevando a descubrir que, en algunos casos, como los antes mencionados, algunas de estas sustancias pueden estar generando cambios en el ambiente gastrointestinal e influenciando la salud del hospedero.

Algunos de los carbohidratos funcionales que han sido estudiados como moduladores del microbioma intestinal son: *H. undatus*¹¹¹, *Artemisia ordosica*¹¹², *Cyclocarya paliurus*¹¹³, *Enteromorpha clathrata*¹¹⁴, y el sulfato de condroitina un polisacárido de origen animal que se encuentra comúnmente en el tejido conectivo de los animales¹¹⁵.

b) Hidratos de carbono como aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios, son sustancias que modifican alguna propiedad de los alimentos, ya sean sus características sensoriales o de conservación. Existe un amplio rango de hidratos de carbono utilizados como aditivos alimentarios para modificar las propiedades físicas de los alimentos procesados, tales como viscosidad, textura, capacidad de formar geles, emulsionantes, estabilizantes, control de cristalización entre otros. Estos hidratos de carbono forman polímeros largos que se clasifican como hidrocoloides¹¹⁶.

Estos hidrocoloides a base de hidratos de carbono han sido evaluados en búsqueda de efectos toxicológicos y aprobados por entidades internacionales, estableciendo su ingesta diaria admisible o dejándola libre cuando la sustancia se considera segura GRAS, por sus siglas del inglés Generally Recognized As Safe^{117,118}. Algunos ejemplos son la goma guar¹¹⁹, almidón de taro⁷³, pectina¹²⁰, almidón de papa¹²¹, y el almidon transglicosilado¹²².

3. Metodología

3.1. Parte 1 Revisión sistemática

3.1.1. Estrategia de búsqueda

La revisión sistemática se llevó a cabo utilizando la herramienta SPIDER^{18,19}, que es un marco para sintetizar la evidencia cualitativa, que se utiliza para revisiones sistemáticas, particularmente en ciencias sociales y en investigación de salud. Se eligió esta herramienta, debido a que permite realizar revisiones sistemáticas de estudios cuyos resultados no pueden ser comparados de forma directa y numérica, como se puede observar en la Tabla 1 en donde se explica a detalle su funcionamiento. El fenómeno de interés son los posibles cambios que pueden ocurrir en el microbioma intestinal cuando los hidratos de carbono (oligosacáridos y polisacáridos) con diferentes propiedades, funciones y orígenes son consumidos.

El diseño de la revisión incluye estudios que se llevaron a cabo hasta cinco años antes de la fecha de inicio de la revisión debido a que la comparabilidad de los resultados no podía asegurarse previo a este tiempo, dado que las técnicas de secuenciación y las bases de datos utilizadas como referencia para elaborar el análisis taxonómico han cambiado significativamente en los últimos años.

Adicionalmente, los tiempos de intervención menores a 14 días de consumo continuo del hidrato del carbono seleccionado en cada estudio, se excluyeron para así asegurar que se observan las variaciones en la microbiota intestinal o fecal de forma adecuada tomando como referencia el análisis de Schlomann y col, 2019¹²³. Los artículos que analizan el consumo de monosacáridos y disacáridos también se excluyeron, pues estas sustancias son digeridas antes de llegar al intestino grueso y los mecanismos por los que podrían modificar el microbioma intestinal son mucho más complejos y deben analizarse desde el punto de vista metabolómico. También se excluyeron todas las intervenciones que usaban aditivos cuya composición no fuera de oligosacáridos o polisacáridos.

Se incluyeron en la selección únicamente los artículos, que aparecieron en la búsqueda, que involucraban a humanos o a mamíferos en el laboratorio que pudieran proveer información relevante y comparable con la microbiota intestinal humana. Los estudios en neonatos se excluyeron, con el objetivo de comparar únicamente microbiotas maduras. Los modelos realizados en padecimientos específicos sin un grupo de intervención sano, también fueron excluidos para evitar variables confusoras. Así mismo, los artículos de revisión, aquellos que utilizaron técnicas *in vitro* o aquellos con propósitos veterinarios también fueron excluidos.

Para los propósitos de esta revisión, solo aquellos artículos con metodologías de secuenciación masiva, tales como 16S rRNA o secuenciación de genoma completo fueron incluidos.

Tabla 1: Descripción de la herramienta SPIDER

DESCRIPCIÓN DE HERRAMIENTA SPIDER		
S	Muestra (Sample)	Muestras de microbiota fecal o intestinal de humanos o animales relevantes para estudios preclínicos en humanos
P I	Fenómeno de interés (Phenomenon of interest)	Investigar los cambios que ocurren en la composición del microbioma intestinal relacionados con intervenciones dietéticas con diferentes oligosacáridos y polisacáridos que se pueden encontrar de forma natural en los alimentos, son añadidos como aditivos alimentarios o se consideran ingredientes funcionales que se encuentran en la naturaleza.
D	Diseño (Design)	<p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Artículos escritos en inglés publicados en los últimos cinco años (previo a la realización de la búsqueda). ○ Estudios preclínicos (en modelos murinos) o clínicos (modelos humanos). ○ Estudios que tienen grupos experimentales con individuos sanos, excluyendo aquellos en los que todos los grupos de intervención tienen patologías intrínsecas o estas han sido generadas para el modelo experimental mediante modificación genética, administración de sustancias o intervenciones en la dieta. ○ Diseño experimental con un periodo mínimo de intervención de 14 días incluyendo el hidrato de carbono en la dieta. ○ Uso de técnicas moleculares para secuenciación tales como 16S rRNA o secuenciación de genoma completo. <p>Criterios de exclusión</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Estudios elaborados en neonatos. ○ Intervenciones que utilicen mono y disacáridos como intervención experimental ○ Estudios cuya intervención se relacione con aditivos alimentarios que no sean polisacáridos. ○ Artículos de revisión y modelos que usan técnicas <i>in vitro</i> ○ Estudios clínicos con enfoque veterinario ○ Artículos que se llevaron a cabo en modelos de enfermedad sin un grupo sano con la intervención.
E	Evaluación (Evaluation)	Composición del microbioma fecal o intestinal.
R	Tipo de investigación (Research type)	Cuantitativa

3.1.2. Búsqueda

La búsqueda se redactó de la siguiente forma:

```
((("gut microbiome"[Title]) OR ("gut microbiota"[Title]) OR (faecal microbiota[Title]) OR (faecal microbiome[Title]) OR (fecal microbiota[Title]) OR (fecal microbiome[Title]) ) AND ( (food additive[Title]) OR (dietary fiber[Title]) OR (polysaccharide[Title]) OR (polysaccharide[Title]) OR (oligosaccharide[Title]) OR (starch[Title]) OR (maltodextrin[Title]) ))) NOT ("in vitro"[Title]) NOT (review[Title]).
```

Se llevó a cabo el día 09/03/2021 utilizando dos bases de datos diferentes: Scopus y PubMed, de acuerdo con las recomendaciones de Siddaway y col, 2019³⁰.

Se generó una visualización del panorama científico utilizando el software VOSviewer software Mac versión 1.6.16^{124,125} para analizar los resúmenes o "abstracts" obtenidos de la búsqueda y visualizar las palabras clave más importantes.

3.1.3. Tamizaje

Los artículos duplicados se eliminaron y aquellos que permanecieron fueron eliminados y aquellas entradas restantes fueron revisadas para verificar que el título y la metodología fueran acorde con el interés y objetivo del artículo científico. Aquellos artículos restantes fueron filtrados de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión (Tabla 1).

3.1.4. Síntesis de la información y categorización de las variables

Los artículos que cumplieron con los criterios de inclusión y no tuvieron ninguno de los criterios de exclusión fueron leídos a profundidad para comprender la metodología de investigación, la intervención dietética, la fuente de los hidratos de carbono y los resultados obtenidos de dicha intervención.

Posteriormente los artículos se etiquetaron para categorizar la información de acuerdo con la función o funciones de los hidratos de carbono (componente de los alimentos, aditivo alimentario o hidrato de carbono funcional). También se clasificaron tomando en cuenta las propiedades y estructura química de los hidratos de carbono presentes en dicha intervención.

Finalmente, se tomaron los datos de las bacterias o taxones reportados a nivel de filo, orden, familia, género y especie cuya abundancia relativa fue significativamente diferente del grupo control.

Subsecuentemente, esta información se categorizó en variables binarias para así, comparar los estudios que cumplieron con los criterios antes establecidos, y sobrellevar las diferencias metodológicas que existieron entre ellos.

Para los propósitos de este estudio, las variables se dividieron en dos clasificaciones principales:

- **Variables predictivas:** Son las que se definieron como variables independientes y se subdividen en dos categorías:
 - **Tipo 1: Uso del hidrato de carbono:** aditivo alimentario, hidrato de carbono funcional o componente de los alimentos.
 - **Tipo 2: Descripción general del hidrato de carbono:** polisacárido sulfatado, fructano, inulina, oligosacárido, polisacárido, almidón, almidón gelatinizado, almidón resistente, fibra soluble, fibra insoluble y capacidad antioxidante.

- **Variables de respuesta o variables tipo 3:** estas son las variables de diversidad bacteriana (BDV) por sus siglas en inglés "*Bacterial Diversity Variables*". Se definen como taxones bacterianos cuya abundancia relativa mostró un cambio significativo comparado con el grupo control tras la intervención.

Las variables independientes se transformaron en variables binarias mediante un proceso de binarización, en el que la presencia de ese uso o característica del hidrato de carbono se le asignó el valor de uno "1" y a la ausencia se le asignó el valor de cero "0".

Estas variables no se definieron como mutuamente excluyentes, por ejemplo, una intervención puede contener un alimento específico que sea rico en almidón, pero al mismo tiempo rico en inulina. Otro ejemplo sería que un hidrato de carbono específico puede ser utilizado como aditivo alimentario, pero también puede encontrarse de forma natural dentro de algún alimento.

En cuanto a las variables de diversidad bacteriana (BDV) cada una se subdividió en dos categorías, el aumento y la disminución de dicho taxon bacteriano al comparar al grupo experimental con el grupo control, de este modo se logró la creación de una tabla que contiene únicamente variables binarias.

Las BDV que únicamente aparecieron en uno de los 47 artículos fueron excluidas, debido a que no se contaban con datos suficientes para llevar a cabo el análisis estadístico sobre ellas. Para efectos de este trabajo, se definirá un "Bin" como la coocurrencia de una variable predictiva y de una variable de respuesta.

3.1.5. Análisis estadístico y co-ocurrencia de variables categóricas

Finalmente, un análisis de WoE-IV se llevó a cabo, utilizando cada BDV como variable de respuesta y las variables tipo 1 y 2 como variables predictivas. Los resultados de IV se obtuvieron para cada par de variables y aquellos con un valor de IV arriba de 0.5 y al menos dos bins se discutieron de forma profunda.

El análisis estadístico y matemático se llevó a cabo utilizando Python 3.10.4 ¹²⁶ y se implementó a través de un Jupyter notebook ¹²⁷. Se utilizaron las librerías para Python Pandas ¹²⁸ para poder trabajar con la tabla de los datos y Numpy ¹²⁹ para realizar los cálculos matemáticos.

Utilizando el siguiente código desarrollado en colaboración con el Dr. José Gustavo Fuentes Cabrera.

```
df.columns=['additive','functional','food','mushroom','antioxidant','sulfated','fructan','inulin','oligosaccharides','polysaccharides','starch','gelatinized_starch','resistant_starch','insoluble_fiber','soluble_fiber','bacteroidetesfirmicutes','disminucion_firmicutes/bacteroidetes','firmicutes/bacteroidetes','disminucion_Actinobacteria','Actinobacteria','Actinobacteria_Bifidobacterium','disminucion_bacteroidetes','Bacteroidetes','Bacteroidetes_odoribacter','disminucion_Bacteroidetes_Bacteroidales_oscillospira','Bacteroidetes_Bacteroidales_oscillospira','disminucion_Bacteroidetes_Oscillospira_Ruminococcus','Bacteroidetes_Oscillospira_Ruminococcus','Bacteroidetes_Alistipes','disminucion_Bacteroidetes_bacteroides','Bacteroidetes_bacteroides','Bacteroidetes_prevotellaceae','Bacteroidetes_Prevotellaceae_prevotella','disminucion_Firmicutes','Firmicutes','disminucion_Firmicutes_Enterococcus','Firmicutes_Enterococcus','disminucion_Firmicutes_lactobacillus','Firmicutes_lactobacillus','Firmicutes_Clostridia','disminucion_Firmicutes_Clostridium','Firmicutes_Clostridium','disminucion_Firmicutes_Lachnospiraceae_blautia','Firmicutes_Lachnospiraceae_blautia','disminucion_Firmicutes_Ruminococcaceae','Firmicutes_Ruminococcaceae','Firmicutes_Ruminococcaceae_Faecalibacterium','disminucion_Firmicutes_Coproccus','Firmicutes_Coproccus','disminucion_Firmicutes_Lachnospira','Firmicutes_Lachnospira','disminucion_Firmicutes_Lachnospiraceae_unclassified','Firmicutes_Lachnospiraceae_unclassified','disminucion_Firmicutes_Anaerostipes','Firmicutes_Anaerostipes','Firmicutes_Roseburia','disminucion_Firmicutes_Turcibacter','Firmicutes_Turcibacter','dsminucion_Proteobacteria','Proteobacteria','disminucion_Proteobacteria_Sutterella','Proteobacteria_Sutterella','disminucion_Proteobacteria_Desulfovibrio','Proteobacteria_Desulfovibrio','disminucion_Proteobacteria_Helicobacter','Proteobacteria_Helicobacter','disminucion_Tenericutes','Tenericutes','disminucion_Verrucomicrobia_Akkermansia','Verrucomicrobia_Akkermansia','Verrucomicrobia_Akkermansia_muciniphila']
```

```
objetivo = 'Actinobacteria_Bifidobacterium'
predictoras = [c for c in df.columns if c!=objetivo]

def calculo_valor_informacion(df,variable,objetivo):
    aux = df[[variable,objetivo]].copy().assign(n=1)
    aux =
aux.pivot_table(index=variable,columns=objetivo,values='n',aggfunc='sum',fill_value=0)
    for i in range(2):
        aux[i]/=aux[i].sum()

aux['woe'] = np.log(aux[0]/aux[1])
```

```
aux['iv'] = (aux[0]-aux[1])*aux['woe']  
return variable,aux['iv'].sum()
```

```
IV = pd.DataFrame(map(lambda  
variable:calculo_valor_informacion(df,variable,objetivo),  
predictoras),columns=['predictora','valor de la información'])
```

```
IV.replace({np.inf:np.nan}).dropna().sort_values(by='valor de la  
información',ascending=False)
```

3.2. Parte 2 Análisis bioinformático de microbioma intestinal de una base de datos pública generada a partir de una intervención murina con Fructooligosacáridos y extracto de *H. undatus*

3.2.1. Selección de base de datos a trabajar

A partir de los artículos que formaron parte de la revisión sistemática, se seleccionó una base de datos pública a la que se tuviera fácil acceso y el método de secuenciamiento fuera 16S rRNA a modo de contar con el poder de cómputo necesario para elaborar un algoritmo que permitiera el análisis de los diferentes índices de alfa y beta diversidad, así como la asignación taxonómica utilizando la base de datos SILVA 132 ^{13,58}.

El artículo 38 cuya base de datos se utilizó fue “Effects of Plant Oligosaccharides Derived from Dragon Fruit on Gut Microbiota in Proximal and Distal Colon of Mice” ¹, un estudio publicado en 2020 en el cual se trataron 25 ratones divididos en 5 subgrupos según la dosis y tipo de polisacáridos de intervención.

- Grupo 1: Control, se administró agua destilada (DW), por sus siglas en inglés
- Grupo 2: Fructooligosacáridos (FOS), por sus siglas en inglés 1000 mg/kg (FOS 1000)
- Grupo 3: Oligosacáridos de fruto del dragón o *H. undatus* (DFO), por sus siglas en inglés 100 mg/kg (DFO 100)
- Grupo 4: Oligosacáridos de fruto del dragón o *H. undatus* 500 mg/kg (DFO 500)
- Grupo 5: Oligosacáridos de fruto del dragón o *H. undatus* 1000 mg/kg (DFO 1000)

En el artículo se utilizó el método de secuenciación Illumina Miseq¹⁴ y la base de datos Greengenes para asignar taxonomía ⁵⁹.

3.2.2. Obtención y organización de los datos

De acuerdo con lo mencionado en el artículo, los datos se encontraron en el repositorio de NCBI SRA con el número de acceso PRJNA516321 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA516321>, únicamente se trabajó con los datos disponibles en la página antes mencionada.

Se creó una tabla para el uso de los datos, tomando en cuenta el tiempo de exposición a la intervención y el grupo al que pertenecía cada muestra/individuo, (Tabla 5 en la sección de resultados).

3.2.3. Desarrollo de algoritmo computacional para análisis del microbioma

a) Preparación de los datos

Para el desarrollo del algoritmo se utilizó el software QIIME2 versión 2023.7^{17,20}

Los datos, obtenidos del repositorio del NCBI en el formato fastq.gz, se importaron al software con el siguiente algoritmo:

```
qiime tools import \  
  --type 'SampleData[SequencesWithQuality]' \  
  --input-path manifest.tsv \  
  --output-path single-end-demux.qza \  
  --input-format SingleEndFastqManifestPhred33V2
```

Los datos que se obtuvieron fueron sencillos “single-end”, es decir solamente se obtuvieron lecturas en una dirección del ADN que va de 5’ – 3’. Posteriormente se generó una tabla con los datos sintetizados para su análisis con el algoritmo, que generó además una visualización, (Tabla 6 y Figura 7) en la sección de resultados.

```
Qiime demux summarize \  
  --i-data single-end-demux.qza \  
  --o-visualization demux
```

Posteriormente se estandarizó la longitud de las lecturas a 300 bases nitrogenadas, se filtró la calidad, se removieron todas las lecturas con alta probabilidad de ser quimeras (secuencias ensambladas de forma errónea durante la secuenciación) y se obtuvo una tabla de “secuencias significativas”, es decir aquellas que pasaron el proceso de filtrado, con el programa denoise-16s¹³⁰.

```

Qiime deblur denoise-16S \
  --i-demultiplexed-seqs single-end-demux.qza \
  --p-trim-length 300 \
  --p-sample-stats \
  --p-jobs-to-start 32 \
  --o-stats deblur-stats.qza \
  --o-representative-sequences rep-seqs-deblur.qza \
  --o-table table-deblur.qza

```

Se obtuvo una visualización de los números de secuencias que se perdieron en cuanto a tamaño, y probabilidad de quimera, así como las frecuencias de cada lectura:

```

qiime deblur visualize-stats \
  --i-deblur-stats deblur-stats.qza \
  --o-visualization deblur-stats.qzv

```

Se generó una tabla con las secuencias representativas:

```

qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data rep-seqs-deblur.qza \
  --o-visualization rep-seqs-deblur.qzv

```

Y una tabla en la que se puede observar el detalle de cuantas veces se observa cada secuencia representativa en cada muestra:

```

qiime feature-table summarize \
  --i-table table-deblur.qza \
  --m-sample-metadata-file metadata2.tsv \
  --o-visualization table-deblur2.qzv

```

Posteriormente se alinearon las secuencias utilizando el programa Mafft ¹³¹

```

Qiime alignment mafft \
  --i-sequences rep-seqs-deblur.qza \
  --o-alignment aligned_rep_seqs.qza

```

Se cubrieron las posiciones alineadas que fueron altamente variables, debido a que estas se considera que generan pérdida de precisión en el resultado final

```

Qiime alignment mask \
  --i-alignment aligned_rep_seqs.qza \
  --o-masked-alignment masked_aligned_rep_seqs.qza

```

Se utiliza el programa FastTree para generar un árbol filogenético ¹³²

```

Qiime phylogeny fasttree \
  --i-alignment masked_aligned_rep_seqs.qza \
  --o-tree unrooted_tree

```

El árbol filogenético se centra para asignar una “raíz” en donde se encuentra la mayor distancia de extremo a extremo

```

Qiime phylogeny midpoint-root \
  --i-tree unrooted_tree.qza \

```

```
        --o-rooted-tree rooted_tree
qiime metadata tabulate \
  --m-input-file metadata2.tsv \
  --o-visualization tabulated-metadata2.qzv
```

b) Análisis de alfa y beta diversidad

Se analizaron los datos con el programa core-metrics de la siguiente manera para el análisis de la beta diversidad, se dividieron las muestras primero según el hidrato de carbono administrado y posteriormente según el grupo experimental al que pertenecen:

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic \
--i-phylogeny rooted_tree.qza \
--i-table table-deblur.qza \
--p-sampling-depth 2500 \
--m-metadata-file metadata2.tsv \
--output-dir core_metrics_results2
```

A modo de obtener las siguientes métricas:

- Tabla rarificada
- Índice de Faith
- Vector de características observadas
- Índice de Shannon
- Índice de uniformidad
- Unifrac ponderado
- Unifrac no ponderado
- Índice de Jaccard
- Distancia de Bray-Curtis
- ANCOM de unifrac no ponderado
- ANCOM de unifrac ponderado
- ANCOM Jaccard
- ANCOM Bray Curtis
- Gráfica tridimensional de no ponderado
- Gráfica tridimensional de unifrac ponderado
- Gráfica tridimensional de Índice de Jaccard
- Gráfica tridimensional de la distancia de Bray-Curtis

Alfa diversidad utilizando el índice de Faith

Para el análisis de alfa diversidad se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ¹³³, que es un análisis de varianza para datos no paramétricos, para todos los grupos y para cada grupo. Se analizó la significancia estadística del índice de Faith usando el siguiente programa:

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
--i-alpha-diversity core_metrics_results2/faith_pd_vector.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--o-visualization core_metrics_results2/faith_pd_group_significance
```

Alfa diversidad basada en el número de secuencias observadas

Se analizó la alfa diversidad basándose en las secuencias observadas sobre el total de las secuencias significativas, ya filtradas, y realizando una prueba de Kruskal-Wallis ¹³³ para todos los grupos y comparando cada grupo de la siguiente forma:

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
--i-alpha-diversity core_metrics_results2/observed_features_vector.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--o-visualization core_metrics_results2/observed_features_group_significance
```

Alfa diversidad basada en el índice de uniformidad de las secuencias

Se analizó la alfa diversidad basándose en la uniformidad de las secuencias observadas y realizando una prueba de Kruskal-Wallis ¹³³ para todos los grupos y comparando cada grupo de la siguiente forma:

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
--i-alpha-diversity core_metrics_results2/evenness_vector.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--o-visualization core_metrics_results2/evenness_significance
```

Alfa diversidad utilizando el índice de Shannon

Se obtuvo el índice de Shannon y se analizó la diferencia entre las muestras realizando la prueba de Kruskal-Wallis ¹³³ para todos los grupos y comparando cada grupo de la siguiente forma:

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
--i-alpha-diversity core_metrics_results2/42urtis42_vector.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--o-visualization core_metrics_results2/42urtis42_significance
```

Análisis de rarefacción

El cálculo y análisis de la alfa rarefacción se utilizó para determinar si la profundidad de secuenciamiento y de análisis fue la adecuada

```
Qiime diversity alpha-rarefaction \  
--i-table core_metrics_results2/rarefied_table.qza \  
--i-phylogeny rooted_tree.qza \  
--p-max-depth 2500 \  
--m-metadata-file metadata3.tsv \  
--o-visualization 42urtti-rarefaction.qzv
```

PERMANOVA

Es un método no paramétrico para la comparación de agrupaciones multivariantes, aprovecha permutaciones para buscar diferencias entre las medidas centrales de los grupos, sin depender de la normalidad de los datos.

Se hace generando una matriz de la medida de distancia (en este caso las medidas de beta diversidad) de datos multivariantes. En segundo lugar se divide la varianza total de los datos en componentes atribuidos a los diferentes grupos. Posteriormente se realiza un número limitado de permutaciones (en este caso 999) de los grupos para crear una distribución estadística (Pseudo F) bajo la hipótesis nula (no hay diferencia significativa entre los grupos). Cada permutación implica barajar las etiquetas de los grupos y recalcular Pseudo F.

Pseudo F es similar a la estadística F en el ANOVA pero se basa en las distancias entre los datos. Finalmente se calcula el Valor P en el que se comparan las estadísticas pseudo F de todos los datos con la distribución de las Pseudo F de las permutaciones. El valor P es la proporción de estadísticas Pseudo F permutadas que son iguales o mayores que la original. En general se rechaza la hipótesis nula cuando el valor P es menor o igual a 0.05

El único supuesto de este modelo es que los datos dentro de cada grupo son intercambiables bajo una hipótesis nula, es decir las observaciones son independientes y tienen distribuciones similares. Es un método relativamente sencillo de interpretar ya que prueba directamente la hipótesis nula comparando los datos originales con una distribución de referencia generada a través de permutaciones.

Beta diversidad usando la distancia de Bray-Curtis

La Beta diversidad se analizó con los siguientes algoritmos, es importante formar conjuntos de muestras para este tipo de análisis, en este caso las muestras se agruparon de dos formas, según el grupo experimental y según el polisacárido administrado en la intervención. Para el análisis de la distancia de Bray-Curtis se generó el siguiente algoritmo. La prueba utilizada para determinar si existe diferencia entre los grupos con significancia estadística fue la PERMANOVA¹³⁴, el uso de esta prueba estadística (ANOVA con permutación) se debe a que las medidas de Beta diversidad son medidas de distancia entre muestras en el árbol filogenético, evitando hacer suposiciones de normalidad u homogeneidad de varianzas.

```

Qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core_metrics_results2/bray_curtis_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata2.tsv \
--m-metadata-column FOS/DFO \
--o-visualization bray_curtis-poli-significance.qzv

```

```

qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core_metrics_results2/bray_curtis_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata2.tsv \
--m-metadata-column Group \
--o-visualization bray_curtis-group-significance.qzv

```

Beta diversidad usando el Índice de Jaccard

Se obtuvo el índice de Jaccard, y se analizó la diferencia entre los conjuntos de muestras realizando una PERMANOVA ¹³⁴ para todos los conjuntos y comparando entre ellos de la siguiente forma:

```

qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core_metrics_results2/jaccard_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata2.tsv \
--m-metadata-column FOS/DFO \
--o-visualization jaccard-poli-significance.qzv

```

```

qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core_metrics_results2/jaccard_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata2.tsv \
--m-metadata-column Group \
--o-visualization jaccard-group-significance.qzv

```

Análisis de beta diversidad usando la distancia Unifrac no ponderada

Se obtuvo la distancia, y se analizó la diferencia entre los conjuntos de muestras realizando una PERMANOVA ¹³⁴ para todos los conjuntos y comparando entre ellos de la siguiente forma:

```

qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core_metrics_results2/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata2.tsv \
--m-metadata-column FOS/DFO \
--o-visualization unweighted-unifrac-poli-significance.qzv

```

```

qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core_metrics_results2/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata2.tsv \
--m-metadata-column Group \
--o-visualization unweighted-unifrac-group-significance.qzv

```

Análisis de Beta diversidad usando la distancia Unifrac ponderada

Se obtuvo la distancia, y se analizó la diferencia entre los conjuntos de muestras realizando una PERMANOVA ¹³⁴ para todos los conjuntos y comparando entre ellos de la siguiente forma:

```
qiime diversity beta-group-significance \  
--i-distance-matrix core_metrics_results2/weighted_unifrac_distance_matrix.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column FOS/DF0 \  
--o-visualization weighted-unifrac-poli-significance.qzv
```

```
qiime diversity beta-group-significance \  
--i-distance-matrix core_metrics_results2/weighted_unifrac_distance_matrix.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization weighted-unifrac-group-significance.qzv
```

c) Desarrollo de clasificador de Naïve-Bayes para asignar taxonomía utilizando la base de datos SILVA132

Se utilizó la base de datos SILVA 132 ^{13,58}, utilizando el archivo diseñado especialmente para el software Qiime 2, se descargaron e importaron los archivos correspondientes a la base de datos que contiene las secuencias y taxonomía para gen 16S rRNA.

Importación a Qiime2 del archivo de secuencias de la base de datos

```
qiime tools import \  
--type 'FeatureData[Sequence]' \  
--input-path  
/Users/lorenapatriciamoraflores/Downloads/SILVA_132_QIIME_release/rep_set/rep_set_16S_only/99/silva_132_99_16S.fna \  
--output-path /Users/lorenapatriciamoraflores/dragonfruit/silva132_99
```

Importación a Qiime2 del archivo correspondiente a taxonomía de la base de datos

```
qiime tools import \  
--type 'FeatureData[Taxonomy]' \  
--input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat \  
--input-path  
/Users/lorenapatriciamoraflores/Downloads/SILVA_132_QIIME_release/taxonomy/16S_only/99/taxonomy_7_levels.txt \  
--output-path  
/Users/lorenapatriciamoraflores/dragonfruit/silva132_99_ref_taxonomy.qza
```

Extracción de las secuencias tomando en cuenta los primers de secuenciación que se utilizaron en la experimentación

Este paso busca crear secuencias de referencia que tengan una longitud máxima de 300 pares de bases (bp), se eligió este valor pues al analizar la calidad de las lecturas y alinearlas se determinó que era la longitud idónea. Así mismo, las lecturas fueron generadas de manera experimental en la plataforma Illumina, y es el estándar de la longitud de secuencia que se obtiene.

La longitud de 300 bp es prácticamente la misma que más del 99.9% de las secuencias filtradas que forman el archivo de secuencias representativas de la experimentación ⁶⁵.

```
qiime feature-classifier extract-reads \
--i-sequences silva132_99.qza \
--p-f-primer CCTACGGGNGGCWGCAG \
--p-r-primer GACTACHVGGGTATCTAATCC \
--p-trunc-len 300 \
--o-reads ref_seqs
```

Entrenamiento del clasificador

Se busca entrenar el clasificador utilizando un modelo de Naïve-Bayes uno de los modelos de machine learning o aprendizaje automatizado con menor requerimiento de poder de cómputo, pero que busca reducir el tiempo y poder de cómputo requerido para asignar taxonomía a cada una de las secuencias ⁶⁵. El algoritmo Naïve-Bayes es capaz de manejar de forma eficaz grandes volúmenes de datos categóricos (en este caso secuencias). Se eligió este método de entrenamiento del modelo pues se adaptaba al poder de cómputo que se tenía disponible durante la realización de este trabajo.

```
Qiime feature-classifier fit-classifier-I-bayes \
--i-reference-reads ref_seqs.qza \
--i-reference-taxonomy silva132_99_ref_taxonomy.qza \
--o-classifier classifier.qza
```

d) Análisis taxonómico

Tras obtener el clasificador entrenado utilizando el modelo de Naïve-Bayes, se puede proceder a la asignación de taxonomía para cada una de las secuencias presentes en el archivo rep utilizando el clasificador entrenado a las secuencias representativas: masked_aligned_rep_seqs.qza ¹³⁵

```
qiime feature-classifier classify-sklearn \
--i-classifier classifier.qza \
--i-reads rep_seqs-deblur.qza \
--o-classification taxonomy.qza
```

```
qiime metadata tabulate \
--m-input-file taxonomy.qza \
--o-visualization taxonomy.qzv
```

Creación de gráfica de barras representando la taxonomía

```
qiime taxa barplot \  
--i-table core_metrics_results/rarefied_table.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--o-visualization taxa_bar_plots2.qzv
```

Análisis de composición bacteriana por nivel taxonómico

Para este análisis se empleó ANCOM “Analysis of compositions of microbioms”⁴¹, el cual fue aplicado individualmente para cada grupo experimental según el tipo de polisacárido añadido a la dieta. De este modo, se identificaron taxones bacterianos cuya abundancia mostró diferencias significativas entre los grupos analizados.

ANCOM es un método estadístico utilizado para detectar taxones con abundancia diferente entre muestras. Se realiza con una tabla de abundancias relativas de taxones de diferentes muestras, se hace una transformación logarítmica de dicha tabla utilizando una ANOVA, se realizan comparaciones pareadas de los rangos logarítmicos entre grupos o condiciones lo que resulta en un grupo de pruebas estadísticas pareadas para cada taxon y finalmente se le aplica una prueba de hipótesis múltiple.

Los supuestos de este modelo son que asume que las muestras son independientes. Las limitaciones de este modelo son su sensibilidad a la presencia de ceros, lo que requiere filtrar estos datos, y que se puede requerir un alto poder computacional en bases de datos largas con demasiados taxones.

En este caso se utilizó ANCOM ya que la base de datos es relativamente pequeña y la cantidad de ASVs presente es limitada. A pesar de que es un estudio longitudinal, muy pocos ASVs mostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo, a modo que se decidió no realizar otro tipo de prueba estadística.

Nivel 2 – filo

```
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table tabla-nivel-2.qza \  
--o-composition-table comp-pseuto-nivel2.qza
```

```
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel2.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column FOS/DFO \  
--o-visualization ancom2_poli.qzv
```

```
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel2.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization ancom2_grupo.qzv
```

Nivel 3 clase

```
qiime taxa collapse \  
--i-table table-deblur.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-level 3 \  
--o-collapsed-table tabla-nivel-3.qza  
  
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table tabla-nivel-3.qza \  
--o-composition-table comp-pseuto-nivel3.qza  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel3.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column FOS/DFO \  
--o-visualization ancom3_poli.qzv  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel3.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization ancom3_grupo.qzv
```

Nivel 4 – órden

```
qiime taxa collapse \  
--i-table table-deblur.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-level 4 \  
--o-collapsed-table tabla-nivel-4.qza  
  
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table tabla-nivel-4.qza \  
--o-composition-table comp-pseuto-nivel4.qza  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel4.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column FOS/DFO \  
--o-visualization ancom4_poli.qzv  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel4.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization ancom4_grupo.qzv
```

Nivel 5 – Familia

```
qiime taxa collapse \  
--i-table table-deblur.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-level 5 \  
--o-collapsed-table tabla-nivel-5.qza  
  
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table tabla-nivel-5.qza \  
--o-composition-table comp-pseuto-nivel5.qza  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel5.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column FOS/DFO \  
--o-visualization ancom5_poli.qzv  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel5.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization ancom5_grupo.qzv
```

Nivel 6 – género

```
qiime taxa collapse \  
--i-table table-deblur.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-level 6 \  
--o-collapsed-table tabla-nivel-6.qza  
  
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table tabla-nivel-6.qza \  
--o-composition-table comp-pseuto-nivel6.qza  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel6.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column FOS/DFO \  
--o-visualization ancom6_poli.qzv  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel6.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization ancom6_grupo.qzv
```

Nivel 7 – Especie

```
qiime taxa collapse \  
--i-table table-deblur.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-level 7 \  
--o-collapsed-table tabla-nivel-7.qza
```

```
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table tabla-nivel-7.qza \  
--o-composition-table comp-pseuto-nivel7.qza
```

```
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel7.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column FOS/DF0 \  
--o-visualization ancom7_poli.qzv
```

```
qiime composition ancom \  
--i-table comp-pseuto-nivel7.qza \  
--m-metadata-file metadata2.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization ancom7_grupo.qzv
```

4. Resultados

4.1. Parte 1 Revisión sistemática

4.1.1. Estrategia de búsqueda y búsqueda

La estrategia de búsqueda lanzó un total de 284 artículos, de los cuales, el motor de búsqueda Scopus mostró 255 y el motor PubMed 150. De los anteriores, 121 artículos se encontraron duplicados.

Con los artículos resultantes se obtuvo un modelo de panorama científico (Figura 5) , del que se puede consultar una versión interactiva en:

https://app.vosviewer.com/?json=https://drive.google.com/uc?id=1vGFc1sE_zyTH-uGcvguk1j3PrYp6Gpcc

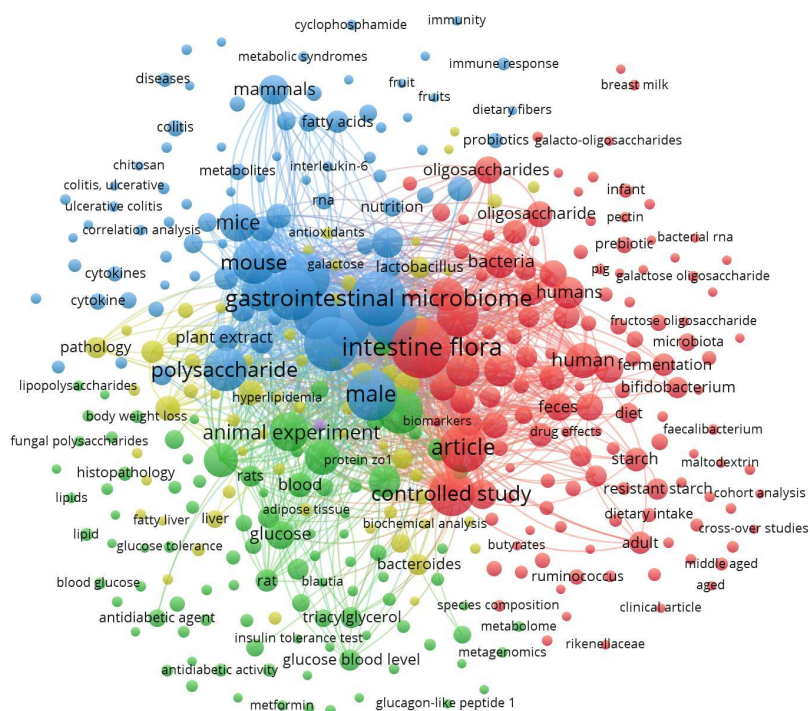


Figura 5: Panorama científico – Co-ocurrencia de términos que aparecen juntos en los documentos arrojados por los buscadores. Se pueden observar 4 principales grupos: rojo (microbiota humana), azul (modelos murinos) verde (estudios metabólicos) y amarillo (modelos patológicos).

4.1.2. Tamizaje

Un total de 47 artículos se incluyeron en el estudio, es decir tras remover los artículos duplicados de las dos bases de datos, el 16.5% de los 284 artículos fueron incluidos en el análisis.

De los artículos resultantes, el 47.2% se excluyeron debido a que el estudio se realizó en un modelo de enfermedad o problema de salud sin un grupo de intervención sano del que se pudieran extraer resultados.

El 13% de los estudios se excluyó debido a que la experimentación se llevó a cabo utilizando técnicas microbiológicas tradicionales para caracterizar la microbiota intestinal o debido a que el tiempo de intervención fue menor a 14 días; el 7.7% de los estudios se excluyó debido a que se llevó a cabo *in vitro*, el 6.7% de los estudios utilizó metodologías con miras a conocer la microbiota desde un punto de vista veterinario o marino, el 5.6% de las publicaciones fueron revisiones literarias y el 2.8% de los estudios fueron llevados a cabo en neonatos humanos, cuya microbiota no es estable y no se puede comparar con un microbioma maduro, finalmente un artículo no estaba escrito en inglés.

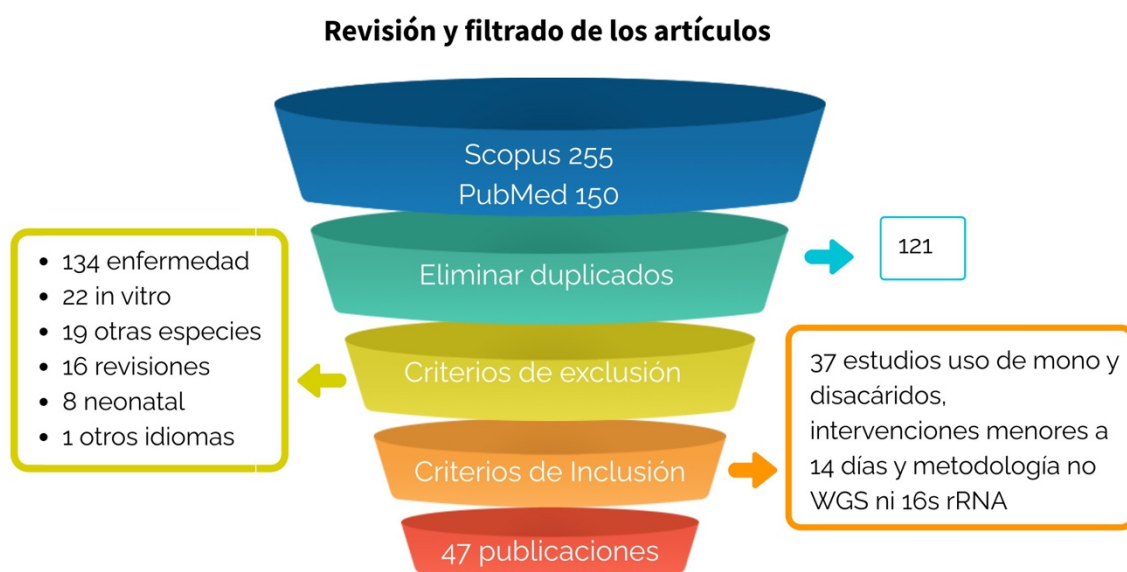


Figura 6: Revisión y tamizaje de los artículos

Algunos ejemplos de estudios que se mostraron en la búsqueda, pero no cumplieron con los criterios de inclusión fueron:

- Estudios sin un grupo de intervención sano ¹³⁶⁻¹⁴⁰.
- Estudios en bebés recién nacidos ^{141,142}.
- Estudios que se llevaron a cabo en otras especies con un punto de vista veterinario ^{102,143,144}.

De los 47 artículos que se incluyeron en la revisión,

- 36 fueron estudios en animales, es decir, 75.6% ^{1,73,111,112,114,115,120–122,145–171, 119,172–181}. Además, 34 de ellos hablan de hidratos de carbono funcionales (72.4%); ^{1,73,111,112,114,115,119–121,145,146,148,150,152,154,155,157–161,163,164,167–170,172–176,179,182}.
- 31 sobre hidratos de carbono que se encuentran de forma natural en los alimentos (66%); ^{1,73,111,114,115,120,121,146,148,150,151,153,155–159,161,162,164,165,168,170,171,173,175–178,181,183}.
- 12 son acerca de hidratos de carbono que se utilizan como aditivos alimentarios (25.5%) ^{73,119–122,153,162,164,166,167,173,178}.

Es importante mencionar que estas tres categorías no son mutuamente excluyentes. Una síntesis de los artículos evaluados y las razones de exclusión se puede observar en la sección de resultados del presente documento (Figura 6).

a) Síntesis de la información y categorización de las variables

Para la construcción de la matriz de variables categóricas, las variables tipo 1 y 2 se extrajeron del texto y se incluyeron como posibles variables predictivas (Tabla 2), para el caso de las variables tipo 3 (BDV) se identificaron un total de 74 variables, sin embargo, 43 de estas fueron eliminadas del análisis puesto que solamente eran mencionadas en una publicación, dejando únicamente 31 BDV para el análisis utilizando WoE-IV como posibles variables de respuesta, (Tabla 3).

Tabla 2: Variables categóricas utilizadas como posibles variables predictivas

TIPO	NOMBRE DE LA VARIABLE	NÚMERO DE APARICIONES	REFERENCIAS
1	Hidratos de carbono como aditivos alimentarios	12	73,119–122,153,162,164,166,167,173,178
1	Hidratos de carbono como componentes funcionales (hidratos de carbono funcionales)	34	1,73,111,112,114,115,119–121,145,146,148,150,152,154,155,157–161,163,164,167–170,172–176,179,182
1	Hidratos de carbono que se encuentran en alimentos de forma natural	31	1,73,111,114,115,120,121,146,148,150,151,153,155–159,161,162,164,165,168,170,171,173,175–178,181,183
2	Hidratos de carbono provenientes de hongos	3	157,159,171
2	Hidratos de carbono con capacidad antioxidante reportada en el artículo original	10	112–114,145,146,148,152,158,159,171

TIPO	NOMBRE DE LA VARIABLE	NÚMERO DE APARICIONES	REFERENCIAS
2	Hidratos de carbono sulfatados	3	115,145,154
2	Fructanos	4	1,172,176,179
2	Inulina	4	149,172,176,179
2	Oligosacáridos	11	1,111,115,120,152,155,163,166,168,170,179
2	Polisacáridos	18	112,114,145,146,148,150,154,157-160,162,164,165,169,171,173,177
2	Almidón	11	73,121,122,147,151,153,173-175,177,178
2	Almidón gelatinizado	3	73,147,151
2	Almidón resistente	11	121,122,147,153,167,173-175,177,178,180
2	Fibra insoluble	11	146,147,149,150,154,156,161,165,167,168,181
2	Fibra soluble	16	119,120,146,147,149,150,154,155,161,165-167,169,176,179,181

Tabla 3: Aumento y disminución reportada de variables de diversidad bacteriana (BDVs) utilizadas como variables de respuesta.

Variables de diversidad bacteriana (BDV)	Disminución	Aumento
<i>Actinobacteria</i>	1 ¹⁵⁸	3 ^{119,168,184}
<i>Actinobacteria_Bifidobacterium</i>	n/a	13 ^{1,73,111,114,120,147,152,170,172,174,176,177,179}
<i>Bacteroidetes</i>	2 ^{153,175}	8 ^{112,120,151,156,157,161,164,167}
<i>Bacteroidetes Odoribacter</i>	2 ^{115,156}	n/a
<i>Bacteroidetes_Bacteroidales_oscillospira</i>	n/a	2 ^{160,164}
<i>Bacteroidetes_Oscillospira_Ruminococcus</i>	n/a	4 ^{112,166,177,180}
<i>Bacteroidetes_Alistipes</i>	n/a	2 ^{112,156}
<i>Bacteroidetes_Bacteroides</i>	n/a	7 ^{147,149,154,166,168-170}
<i>Bacteroidetes_Prevotellaceae</i>	n/a	3 ^{115,148,180}
<i>Bacteroidetes_Prevotellaceae_Prevotella</i>	n/a	4 ^{73,147,155,160}
<i>Firmicutes</i>	9 ^{120,151,156,157,164,165,167,168,181}	4 ^{148,151,153,175}
<i>Firmicutes_Enterococcus</i>	3 ^{1,120,154}	n/a
<i>Firmicutes_Lactobacillus</i>	3 ^{111,112,145}	10 ^{1,114,115,120,148,152,162,168-170}
<i>Firmicutes_Clostridia</i>	n/a	2 ^{153,160}
<i>Firmicutes_Clostridium</i>	2 ^{168,170}	2 ^{173,181}
<i>Firmicutes_Lachnospiraceae_Blautia</i>	3 ^{150,173,178}	n/a
<i>Firmicutes_Ruminococcaceae_Faecalibacterium</i>	n/a	2 ^{177,179}
<i>Firmicutes_Coproccoccus</i>	2 ^{178,179}	n/a
<i>Firmicutes_Lachnospira</i>	2 ^(172,178)	n/a
<i>Firmicutes_Roseburia</i>	n/a	3 ^{112,154,177}
<i>Firmicutes_Turicibacter</i>	n/a	2 ^{121,154}
<i>Proteobacteria</i>	2 ^{151,171}	2 ^{148,165}
<i>Proteobacteria_Sutterella</i>	n/a	2 ^{73,121}
<i>Proteobacteria_Desulfovibrio</i>	n/a	2 ^{115,166}
<i>Tenericutes</i>	3 ^{121,158,179}	n/a
<i>Verrucomicrobia_Akkermansia</i>	n/a	3 ^{121,148,161}
<i>Verrucomicrobia_Akkermansia_Muciniphila</i>	n/a	2 ^{114,180}

Tabla 4: Aumento y disminución reportada de variables de diversidad bacteriana (BDVs) utilizadas como variables de respuesta.

4.1.3. Análisis estadístico y co-ocurrencia de variables categóricas

Como se mencionó previamente, a partir de una revisión manual, se obtuvo el número de bins o repeticiones para cada combinación de variable predictiva y BDV; posteriormente se realizó el cálculo para obtener su puntaje de valor de la información (IV). La (Tabla 4) presenta el número de bins para cada par de variables que obtuvieron un puntaje de IV de al menos 0.5.

Tabla 5: Variables predictivas y de respuesta con valor de la Información (IV) y repeticiones

Variable predictiva	Variable de respuesta BDV	Valor de la información (IV)	Bins o repeticiones	Referencias
Polisacáridos sulfatados	<i>Lactibacillus</i> reducción	1.808	1	145
Almidón gelatinizado	<i>Prevotella</i> aumento	1.781	2	73,147
Fructanos	<i>Faecalibacterium</i> aumento	1.435	1	179
Polisacáridos sulfatados	<i>Desulfovibrio</i> aumento	1,398	1	115
Polisacáridos de hongos	<i>Proteobacteria</i> reducción	1.398	1	171
Almidón gelatinizado	<i>Proteobacteria</i> reducción	1.398	1	151
Polisacáridos sulfatados	<i>Turicibacter</i> aumento	1.398	1	154
Polisacáridos sulfatados	<i>Odoribacter</i> aumento	1.397	1	115
Fructanos	<i>Coprococcus</i> aumento	1.144	1	179
Inulina	<i>Faecalibacterium</i> aumento	1.144	1	179
Oligosacáridos	<i>Lactobacillus</i> aumento	1.051	6	1,115,120,152,168,170
Fibra insoluble	<i>Actinobacteria</i> aumento	0.95	2	168,185
Almidón	<i>Blautia</i> disminución	0.948	2	120,173
Almidón resistente	<i>Blautia</i> disminución	0.948	2	120,173
Oligosacáridos	<i>Enterococcus</i> disminución	0.947	2	1,120
Almidón resistente	<i>Firmicutes</i> aumento	0.947	2	153,175
Almidón	<i>Firmicutes</i> aumento	0.947	2	153,175
CH como aditivos alimentarios	<i>Blautia</i> disminución	0.842	2	173,178
CH encontrados en alimentos	<i>Bacteroides</i> aumento	0.828	2	168,170
Fibra insoluble	<i>Bacteroides</i> aumento	0.828	4	147,149,154,168
Fibra insoluble	<i>Firmicutes</i> disminución	0.754	5	156,165,167,168,181

Variable predictiva	Variable de respuesta BDV	Valor de la información (IV)	Bins o repeticiones	Referencias
Fibra soluble	<i>Bacteroides</i> aumento	0.729	5	147,149,154,166,169
Polisacáridos sulfatados	<i>Roseburia</i> aumento	0.677	1	154
Polisacáridos sulfatados	<i>Enterococcus</i> disminución	0.676	1	154
Inulina	<i>Bifidobacterium</i> aumento	0.538	3	172,176,179
Fructanos	<i>Enterococcus</i> disminución	0.509	1	1
Fibra soluble	<i>Actinobacteria</i> aumento	0.500	2	119,146

4.2. Parte 2 Análisis bioinformático de microbioma intestinal de una base de datos pública generada a partir de una intervención murina con Fructooligosacáridos y extracto de *H. undatus*

4.2.1. Obtención y organización de datos

Con los datos obtenidos se creó la tabla de datos generales para cada muestra (Tabla 5), a esta tabla se le conocerá más adelante como metadata.tsv

Tabla 6: Metadatos utilizados para el análisis del microbioma intestinal

#SampleID	Ratón	Días	Dosis mg/kgpeso/día	sitio	FOS/DFO	Grupo
SRR8468866	1	7	500	distal colon fecal	DFO	DFO_500_T1
SRR8468867	2	7	1000	proximal colon fecal	DFO	DFO_1000_T1
SRR8468868	3	7	0	proximal colon fecal	CONTROL	DW_T1
SRR8468869	4	7	100	proximal colon fecal	DFO	DFO_100_T1
SRR8468870	5	7	100	distal colon fecal	DFO	DFO_100_T1
SRR8468871	6	7	500	distal colon fecal	DFO	DFO_500_T1
SRR8468872	7	7	1000	proximal colon fecal	FOS	FOS_1000_T1
SRR8468873	8	7	0	distal colon fecal	CONTROL	DW_T1
SRR8468874	9	7	1000	distal colon fecal	DFO	DFO_1000_T1
SRR8468875	10	7	1000	distal colon fecal	FOS	FOS_1000_T1

#SampleID	Ratón	Días	Dosis mg/kgpeso/día	sitio	FOS/DFO	Grupo
SRR8468876	11	14	500	proximal fecal	colon DFO	DFO_500_T2
SRR8468877	12	14	1000	proximal fecal	colon DFO	DFO_1000_T2
SRR8468878	13	14	0	proximal fecal	colon CONTROL	DW_T2
SRR8468879	14	14	100	proximal fecal	colon DFO	DFO_100_T2
SRR8468880	15	14	100	distal colon fecal	DFO	DFO_100_T2
SRR8468881	16	14	500	distal colon fecal	DFO	DFO_500_T2
SRR8468882	17	14	1000	proximal fecal	colon FOS	FOS_1000_T2
SRR8468883	18	14	0	distal colon fecal	CONTROL	DW_T2
SRR8468884	19	14	1000	distal colon fecal	DFO	DFO_1000_T2
SRR8468885	20	14	1000	distal colon fecal	FOS	FOS_1000_T2

4.2.2. Desarrollo de algoritmo computacional para análisis de microbioma de ratón

a) Preparación de los datos

Tras importar los datos al software se obtuvo una tabla descriptiva, en la que se puede observar cuántas secuencias se obtuvieron por cada una de las muestras

Tabla 7: Número de secuencias por muestra

ID de la muestra	Número de secuencias
SRR8468873	912416
SRR8468866	822540
SRR8468874	741294
SRR8468867	692800
SRR8468871	638470
SRR8468881	635900
SRR8468885	604242
SRR8468869	557674
SRR8468878	538534
SRR8468876	508218
SRR8468882	507630
SRR8468879	503212
SRR8468883	493854
SRR8468868	482638
SRR8468872	480984

ID de la muestra	Número de secuencias
SRR8468875	469430
SRR8468880	455444
SRR8468884	443012
SRR8468877	442726
SRR8468870	436752

Y a manera descriptiva se obtuvo el siguiente histograma (Figura 7) todas las muestras contaron con un mínimo de 436,752 secuencias

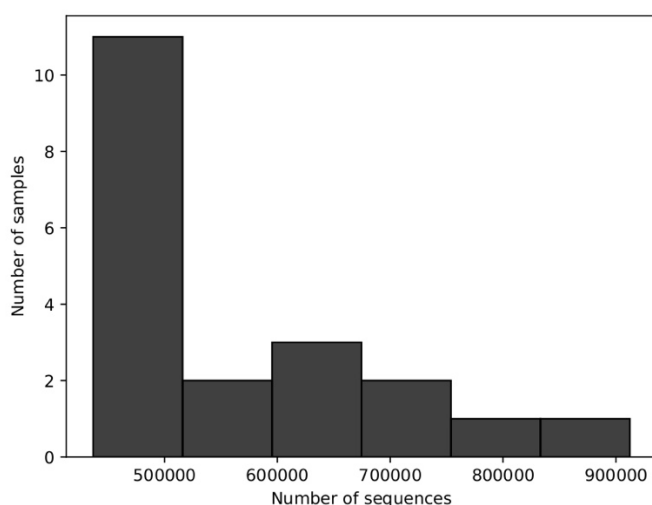


Figura 7: Histograma que representa el número de secuencias por muestra.

Después de la limpieza inicial de las secuencias, se implementaron varios controles de calidad para disminuir la probabilidad de error en los datos. Estos controles incluyen la eliminación de secuencias de baja calidad o demasiado cortas o largas (errores en el secuenciamiento), así como la eliminación de secuencias con errores en los adaptadores y se eliminaron quimeras que se forman de manera normal durante las reacciones de PCR utilizadas para la secuenciación. Se obtuvo una tabla que permite observar el número de secuencias que no pasaron los diferentes controles de calidad y cuántas secuencias permanecieron para el análisis en cada muestra (Figura 8).

	sample-id	reads-raw	fraction-artifact-with-minsize	fraction-artifact	fraction-missed-reference	unique-reads-derep	reads-derep	unique-reads-deblur	reads-deblur	unique-reads-hit-artifact	reads-hit-artifact	unique-reads-chimeric	reads-chimeric	unique-reads-hit-reference	reads-hit-reference
0	SRR8468877	442726	0.965276	0.0	0.000000	3089	15373	874	3643	0	0	246	491	270	2535
1	SRR8468882	507630	0.964370	0.0	0.000000	3881	18087	1204	4593	0	0	386	768	329	2945
10	SRR8468870	436752	0.912170	0.0	0.000000	6447	38360	1535	8126	0	0	627	1781	327	5323
11	SRR8468874	741294	0.910218	0.0	0.000000	10220	66555	1539	11861	0	0	700	2441	326	8506
12	SRR8468867	692800	0.902229	0.0	0.000000	10416	67736	2234	13965	0	0	893	2550	402	9745
13	SRR8468880	455444	0.899002	0.0	0.000000	6831	45999	1144	9150	0	0	253	765	422	7519
14	SRR8468872	480984	0.898866	0.0	0.000000	7745	48644	1915	11038	0	0	743	1801	394	7786
15	SRR8468885	604242	0.896616	0.0	0.000000	9150	62469	1999	12163	0	0	881	2612	351	8119
16	SRR8468871	638470	0.888668	0.0	0.000184	10610	71082	2277	14242	0	0	1002	3379	381	9227
17	SRR8468866	822540	0.885156	0.0	0.000138	13300	94464	2560	18227	0	0	1143	3699	420	12723
18	SRR8468881	635900	0.879541	0.0	0.000000	9645	76600	1137	12165	0	0	362	1371	360	10038
19	SRR8468884	443012	0.869739	0.0	0.000000	7200	57707	947	10614	0	0	209	1023	357	8904
2	SRR8468879	503212	0.934054	0.0	0.000333	6191	33185	1754	7557	0	0	638	1542	368	4631
3	SRR8468868	482638	0.933963	0.0	0.000333	6011	31872	1600	7348	0	0	543	1341	365	4771
4	SRR8468873	912416	0.933770	0.0	0.000000	10656	60429	2338	12167	0	0	941	2898	375	7439
5	SRR8468878	538534	0.929590	0.0	0.000000	6578	37918	1589	7776	0	0	581	1423	358	5205
6	SRR8468875	469430	0.928927	0.0	0.000000	5993	33364	1574	7669	0	0	614	1488	334	5056
7	SRR8468883	493854	0.927325	0.0	0.000000	6014	35891	1295	7170	0	0	530	1589	275	4702
8	SRR8468869	557674	0.918330	0.0	0.000000	7913	45545	2130	10316	0	0	810	2139	376	6442
9	SRR8468876	508218	0.912543	0.0	0.000380	7587	44447	2247	10234	0	0	889	2334	379	6079

Figura 8: Análisis de secuencias que se pueden utilizar para el análisis del microbioma tras filtración y control de calidad.

b) Análisis de alfa y beta diversidad

- Alfa diversidad utilizando el índice de Faith

En el análisis del índice de Faith, se observa que el valor p es de 0.406, es decir, no se puede observar diferencia significativa en la alfa diversidad de los grupos.

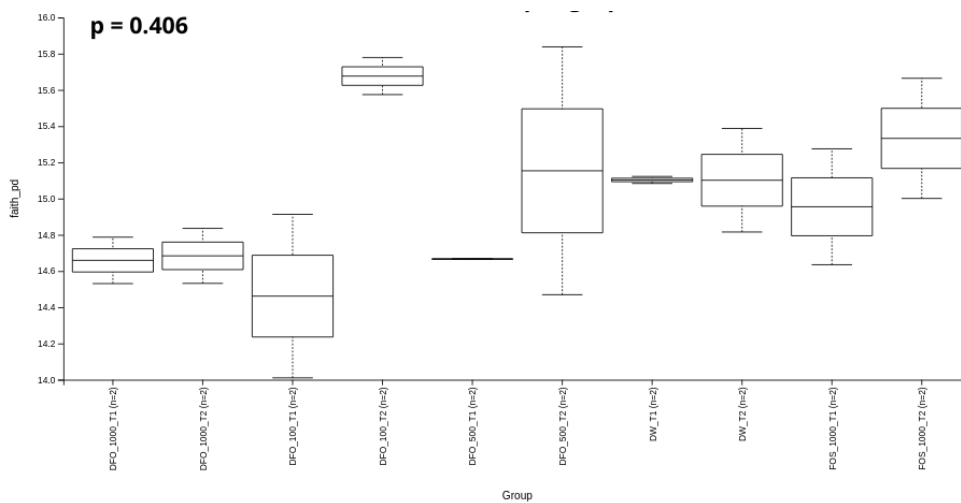


Figura 9: Alfa diversidad por índice de Faith

- Alfa diversidad basada en el índice de uniformidad de las secuencias

En el análisis de alfa diversidad por uniformidad, se observa que el valor p es de 0.480, es decir, no se puede observar diferencia significativa en la alfa diversidad de los grupos.

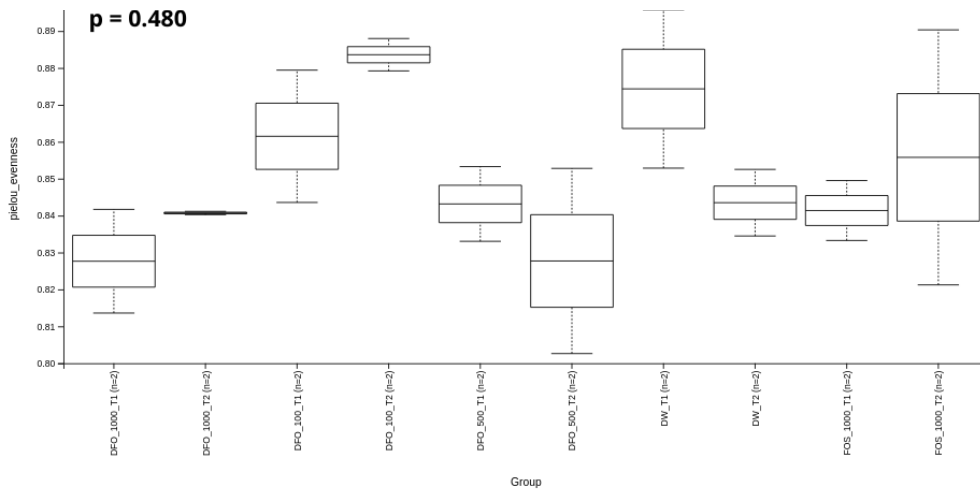


Figura 10: Análisis de alfa diversidad por uniformidad

- Alfa diversidad basada en el índice de Shannon

En el análisis del índice de Shannon, se observa que el valor p es de 0.494, es decir, no se puede observar diferencia significativa en la alfa diversidad de los grupos.

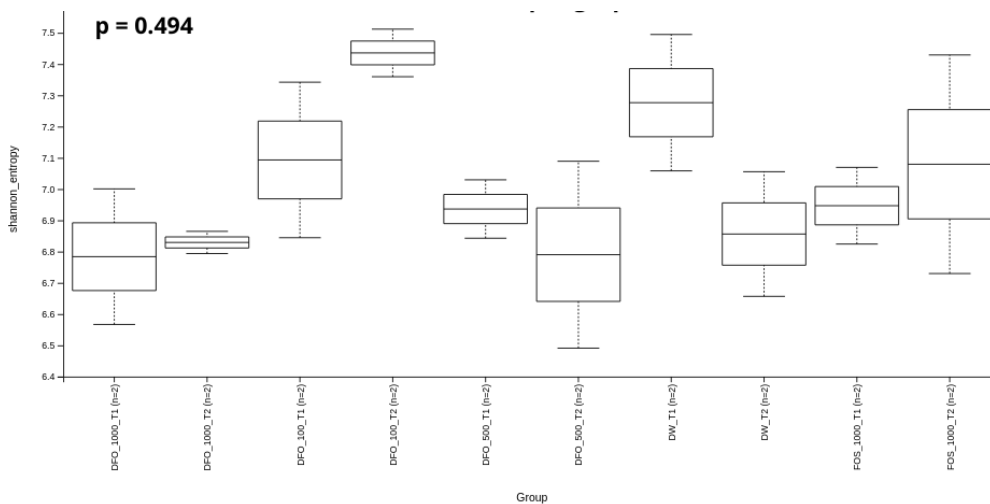


Figura 11: Análisis por grupo de alfa diversidad por Índice de Shannon

- **Alfa diversidad basada en el número de secuencias observadas y profundidad de secuenciamiento**

En este análisis se puede observar la cantidad de secuencias observadas de acuerdo con la profundidad de secuenciamiento, en cada muestra. Se observa un comportamiento de asíntota horizontal al llegar a un número máximo “features” o secuencias representativas lo que indica que se está trabajando con una profundidad de secuenciamiento adecuada (figura 12).

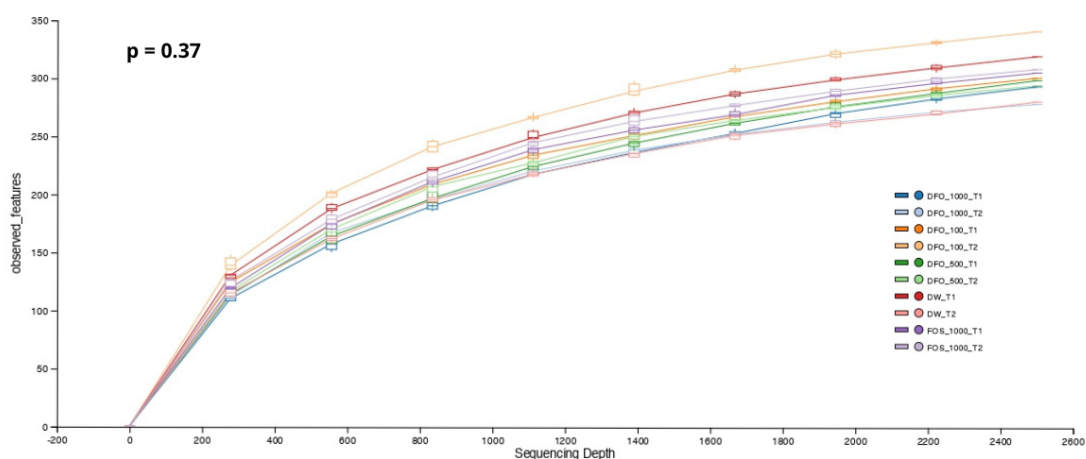


Figura 12: Alfa diversidad por profundidad de secuenciamiento y secuencias observadas

- **Beta diversidad usando la distancia de Bray-Curtis**

El análisis de beta diversidad de acuerdo con el polisacárido utilizado no mostró diferencia significativa entre los polisacáridos administrados: Oligosacárido de fruto del dragón, Fructooligosacáridos (FOS) o el grupo control (DW).

En el caso de la distancia de Bray Curtis no se observó una diferencia significativa tras realizar una PERMANOVA con 999 permutaciones, obteniéndose un valor p de 0.715.

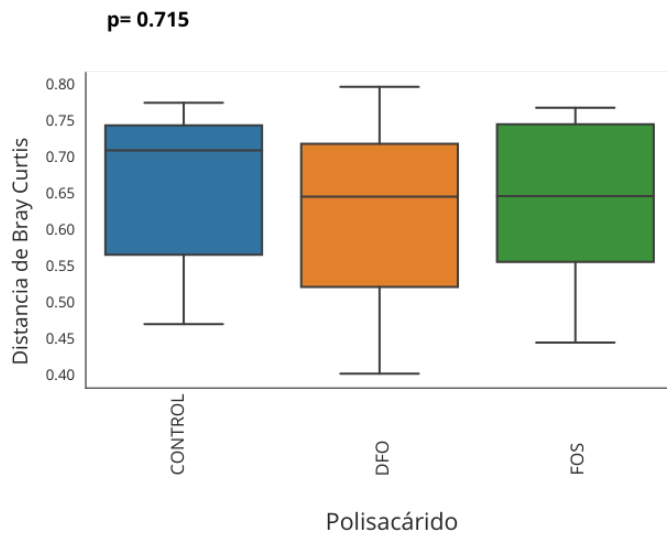


Figura 13: Análisis de beta diversidad por distancia de Bray Curtis dividiendo las muestras de acuerdo con el polisacárido utilizado

Un resultado similar se obtuvo al analizar la beta diversidad, al agrupar por polisacárido, utilizando el índice de Jaccard $p= 0.836$, Unifrac no ponderado $p= 0.836$ y Unifrac ponderado $p= 0.804$.

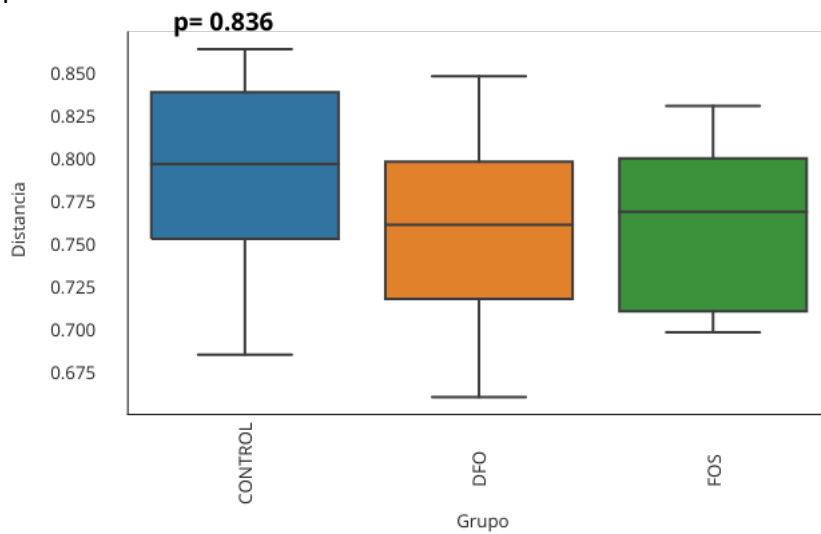


Figura 14: Análisis de beta diversidad por Índice de Jaccard dividiendo las muestras de acuerdo con el polisacárido utilizado

- **Beta diversidad usando la distancia de Bray-Curtis**

Al dividir las secuencias por grupo, se observaron diferencias significativas al comparar los resultados con el grupo control en el tiempo inicial (Control_T1), $p < 0.001$ tras realizar una PERMANOVA con 999 permutaciones.

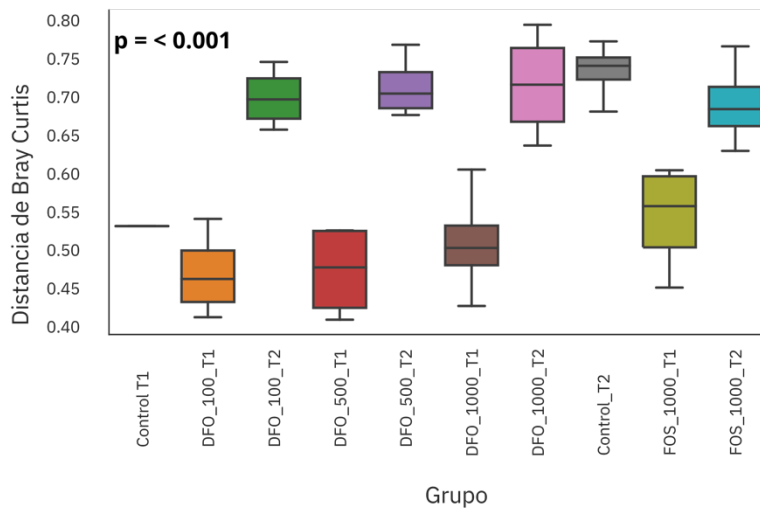


Figura 15: Beta diversidad por distancia de Bray Curtis dividiendo las muestras por grupo experimental

- **Beta diversidad usando el Índice de Jaccard**

Un resultado similar se obtuvo al realizar el mismo análisis, pero utilizando el índice de Jaccard con un valor $p < 0.001$

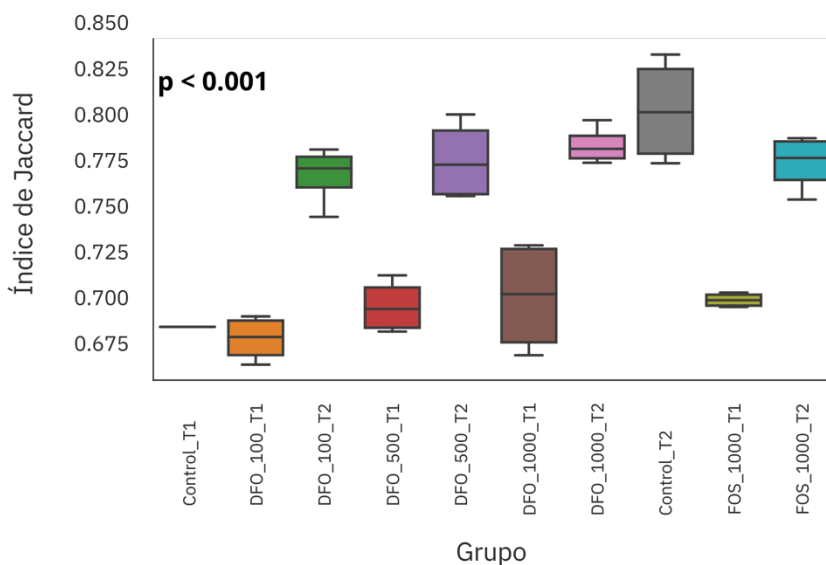


Figura 16: Análisis de beta diversidad por índice de Jaccard dividiendo las muestras según el grupo experimental

- **Análisis de beta diversidad usando la distancia Unifrac no ponderada**

Al utilizar la distancia Unifrac no ponderada y el mismo método estadístico (PERMANOVA con 999 permutaciones) se obtiene un valor p de $p < 0.001$

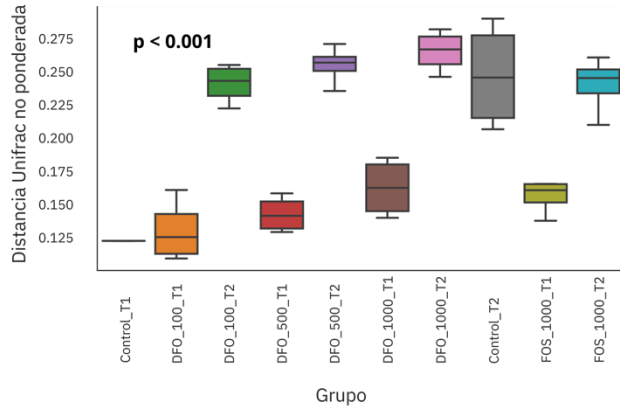


Figura 17: Análisis de beta diversidad por distancia Unifrac no ponderada dividiendo las muestras según el grupo experimental

- **Análisis de beta diversidad usando la distancia Unifrac ponderada**

Al utilizar la distancia Unifrac ponderada y el mismo método estadístico (PERMANOVA con 999 permutaciones) se obtiene un valor p de $p < 0.001$.

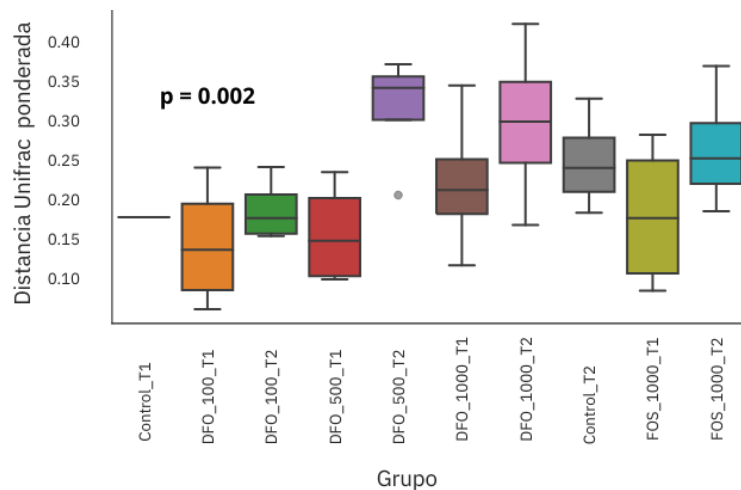


Figura 18: Análisis de beta diversidad por distancia Unifrac ponderada dividiendo las muestras según el grupo experimental

c) Análisis taxonómico

El análisis de taxonomía, como se mencionó en la sección de metodología se realizó usando como referencia la base de datos Silva 132 ^{13,58}:

- Análisis de composición bacteriana por nivel taxonómico
- Nivel 2 – filo

Los filo dominantes fueron *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. No se encontró ninguna diferencia significativa entre los taxones bacterianos a nivel filo encontrados en cada grupo.

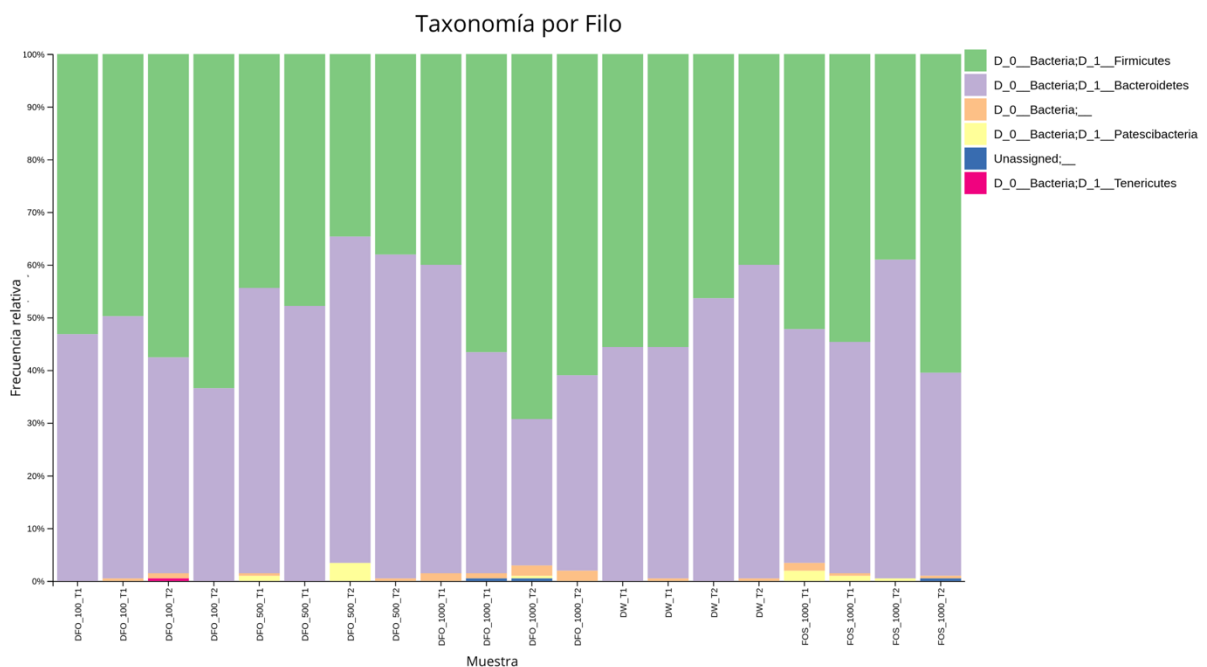


Figura 19: Asignación taxonómica por muestra, nivel filo

- Nivel 3 Clase

Las clases dominantes fueron *Bacteroidia*, *Clostridia* y *Bacili*.

Se encontró una diferencia significativa en la clase *Bacteroidia*, perteneciente al filo *Bacteroidetes*, siendo ligeramente mayor en DFO_1000_T2 al comparar entre grupos con DFO_500_T2 utilizando una prueba de Krsukal-Wallis con prueba de Dunn $p=0.029$.

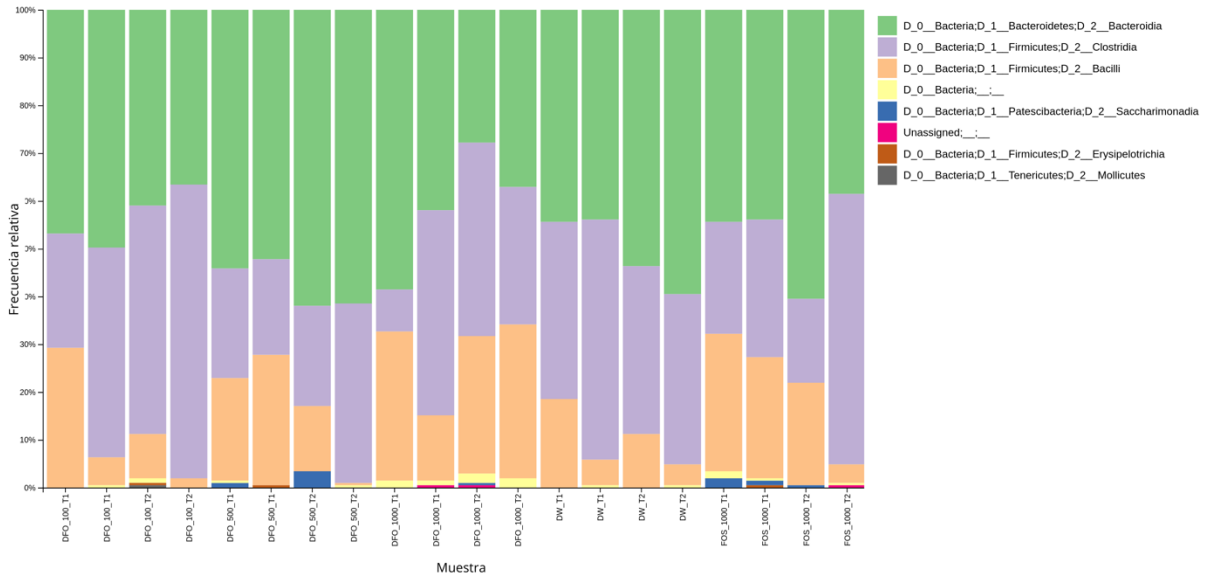


Figura 20: Asignación taxonómica por muestra nivel Clase

- Nivel 4 – Orden

Los órdenes dominantes fueron *Bacteroidales*, *Clostridiales* y *Lactobacillales*, el único que mostró diferencias significativas al comparar entre grupos fue *Bacteroidales*, perteneciente al filo *Bacteroidetes*, siendo consistentes con los resultados que se obtuvieron en el nivel taxonómico anterior.

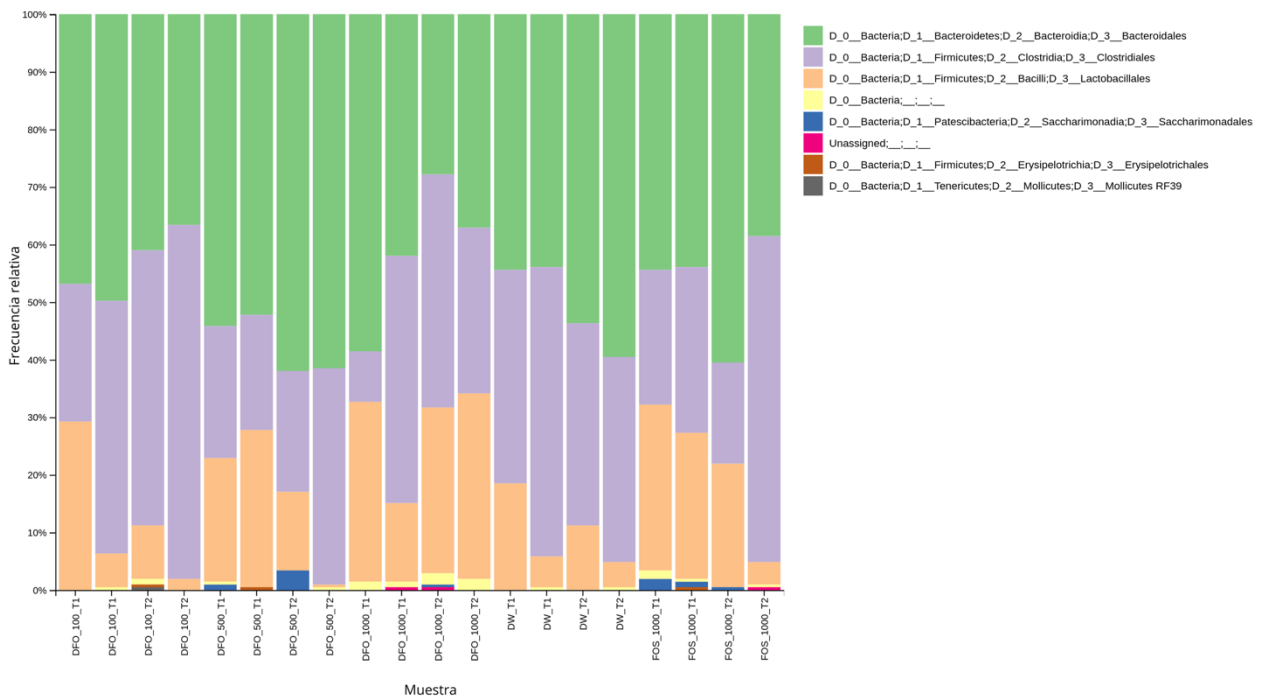
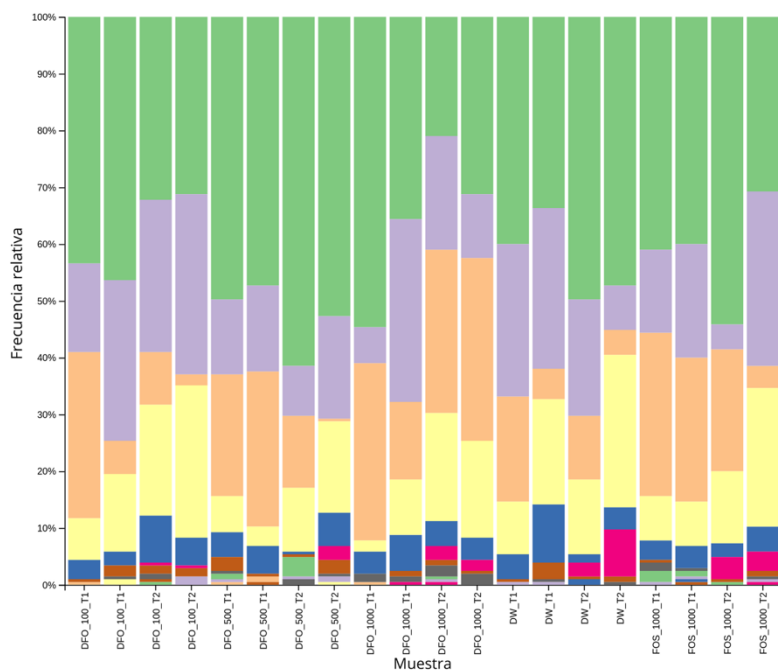


Figura 21: Asignación taxonómica por muestra nivel Orden

- Nivel 5 – Familia

Las familias dominantes incluyeron: *Muribaculaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* y *Prevotellaceae*. La única familia que mostró diferencia significativa fue *Prevotellaceae*, no encontrándose en los grupos DW_T1 (control 7 días), DFO_100_T1, DFO_500_T1, DFO_1000_T1 y FOS_1000_T1 mientras que se encuentra en todos los grupos correspondientes al T2 (14 días), incluido el control.



- D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Bacteroidaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Prevotellaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiales vadinBB60 group
- D_0_Bacteria; ; ; ;
- D_0_Bacteria;D_1_Patescibacteria;D_2_Saccharimonadia;D_3_Saccharimonadales;D_4_Saccharimonadaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII
- D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales; ;
- Unassigned; ; ; ;
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae
- D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_uncultured Firmicutes bacterium

Figura 22: Asignación taxonómica por muestra nivel familia

- Nivel 6 – Género

A nivel de género se observan diferencias significativas en *Rominococcus 1* que se encuentra presente en el grupo DFO_100_T2, DFO_1000_T2, DW_T2 y FOS_1000_T2 y se encuentra completamente ausente en todos los grupos pertenecientes a T1 (7 días) y en el grupo DFO_500_T2.

Para el género *Prevotellaceae UCG-001*, se encuentra un comportamiento similar al observado en la familia *Prevotellaceae*, es decir se encuentra presente en todos los grupos correspondientes a T2 y ausente en todos los grupos pertenecientes a T1.

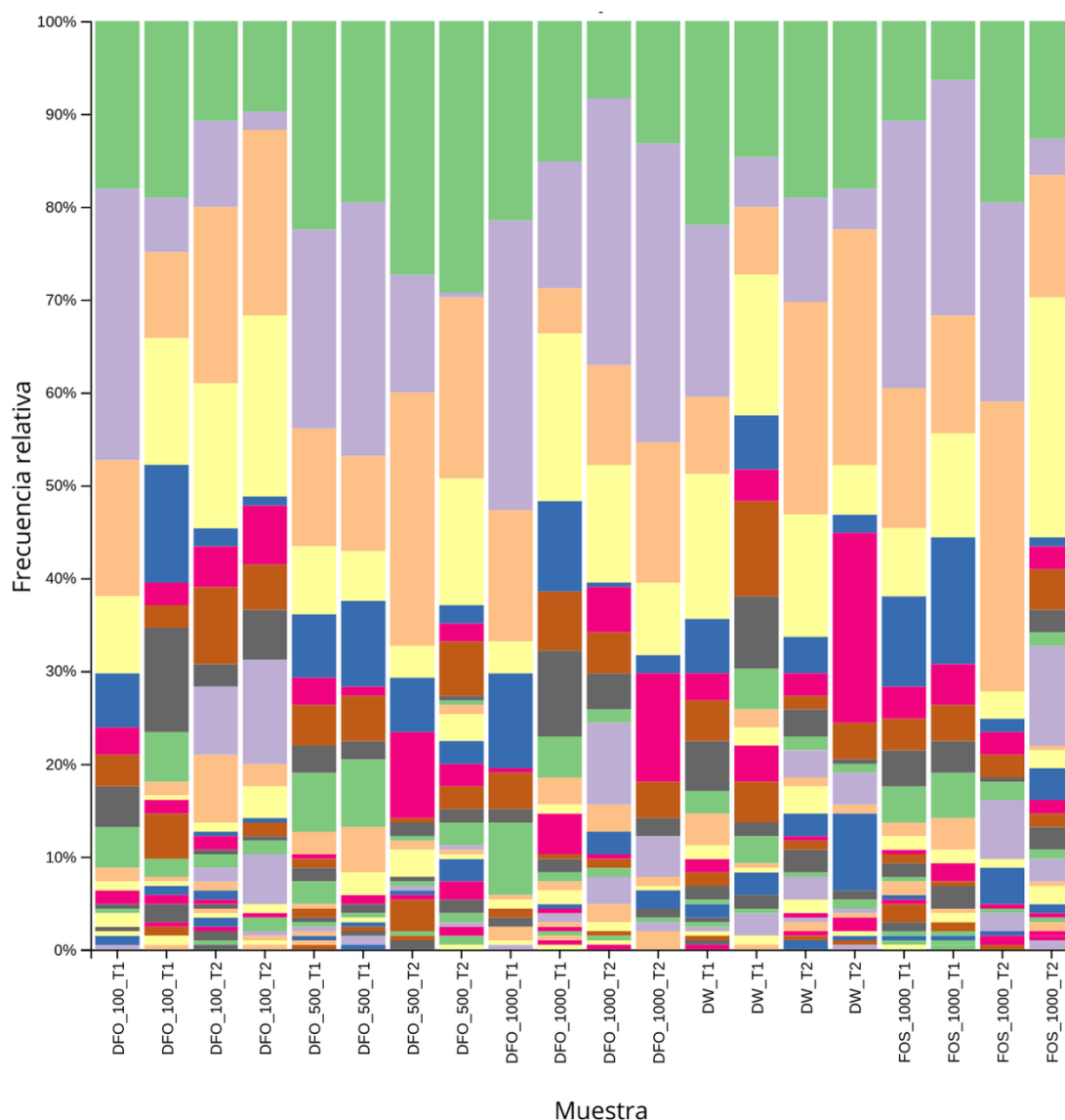


Figura 23: Asignación taxonómica por muestra nivel Género

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_uncultured Bacteroida
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae;D_5_Lactobacillus
 D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_uncultured bacterium
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;__
 D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_mouse gut metagenor
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-0
 D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Bacteroidaceae;D_5_Bacteroides
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae NK4A136
 D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;__
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcus 1
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_[Eubacterium] xylanophilum
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_uncultured
 D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Prevotellaceae;D_5_Prevotellaceae UCG-00
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Anaerotruncus
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Oscillibacter
 D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_Muribaculum
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiales vadinBB60 group;D_5_uncultured bac
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminiclostridium 6
 D_0_Bacteria;__;__;__;__
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;__
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminiclostridium
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminiclostridium 9
 D_0_Bacteria;D_1_Patescibacteria;D_2_Saccharimonadia;D_3_Saccharimonadales;D_4_Saccharimonadaceae;D_5_C:
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Intestinimonas
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae;D_5_uncultured
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-0
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-0
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Roseburia
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-0
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_uncultured
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Tyzzereella
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Negativibacillus
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Butyricoccus
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_[Eubacterium] nodatum group
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae FCS020 c
 D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae;D_5_Alistipes
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;__;__
 Unassigned;__;__;__;__
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_[Eubacterium] coprostanol
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae;D_5_Streptococcus
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_uncultured
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae NK4A2
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Marvinbryantia
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnoclostridium
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_uncultured ba
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminiclostridium 5
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_Family XIII AD3011 group
 D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_uncultured Firmicutes bacterium;D_5_uncult.
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae UCG-006
 D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_GCA-900066575

- Nivel 7 – Especie

A nivel de especie, no se encontraron diferencias significativas con suficiente profundidad de secuenciamiento para ser mencionadas.

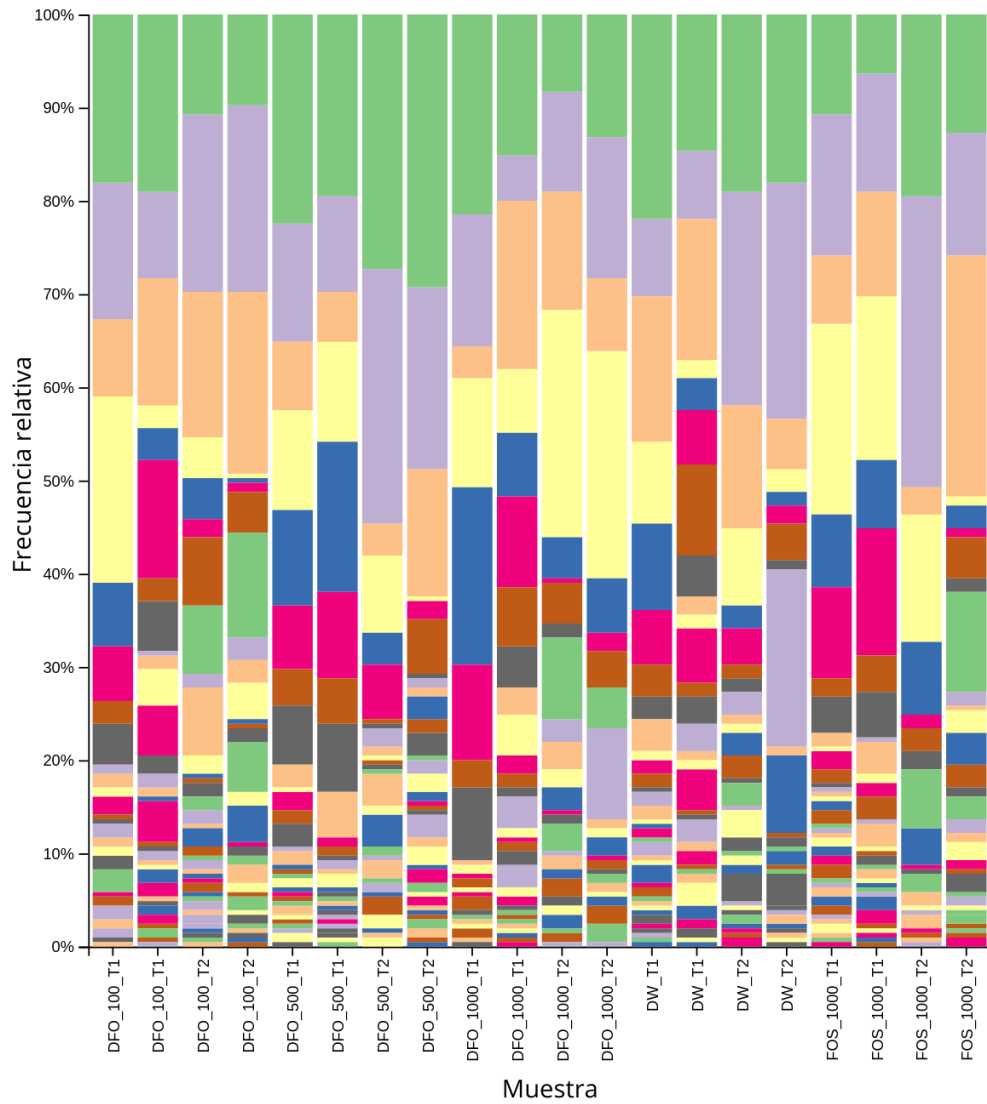


Figura 24: Asignación taxonómica por muestra nivel Especie

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_uncultured Bacteroidales bacterium;D_6_uncultured E

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_uncultured bacterium;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae;D_5_Lactobacillus;D_6_Lactobacillus johnsonii

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae;D_5_Lactobacillus;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_mouse gut metagenome;D_6_mouse gut metagenom

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Bacteroidaceae;D_5_Bacteroides;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcus 1;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-014;D_6_unidentified

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_[Eubacterium] xylanophilum group;D_6_uncultured bacteriu

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae NK4A136 group;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Prevotellaceae;D_5_Prevotellaceae UCG-001;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae NK4A136 group;D_6_Lachnospiraceae b

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_Muribaculum;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiales vadinBB60 group;D_5_uncultured bacterium;D_6_uncultured bacteriu

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-005;D_6_uncultured Clostridiales bacteriu

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Anaerotruncus;D_6_Anaerotruncus sp. G3(2012)

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-014;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_uncultured;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-014;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Oscillibacter;D_6_unidentified

D_0_Bacteria;D_1_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae;D_5_Lactobacillus;D_6_Lactobacillus murinus

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-009;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_uncultured;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Oscillibacter;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae NK4A136 group;D_6_uncultured bacteriu

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Intestinimonas;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Bacteroidaceae;D_5_Bacteroides;D_6_Bacteroides caecimuris

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcus 1;D_6_Ruminococcus flavefaciens

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae;D_5_uncultured;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae NK4A136 group;D_6_Clostridiales bacter

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-014;D_6_uncultured rumen bact

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-009;D_6_unidentified

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-014;D_6_uncultured Acetivibrio s

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Anaerotruncus;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Patescibacteria;D_2_Saccharimonadia;D_3_Saccharimonadales;D_4_Saccharimonadaceae;D_5_Candidatus Saccharimonas;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae NK4A136 group;D_6_unidentified

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-005;D_6_uncultured Clostridiales

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-010;D_6_uncultured organism

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-005;D_6_uncultured bacterium enrichr

D_0_Bacteria;D_1_Patescibacteria;D_2_Saccharimonadia;D_3_Saccharimonadales;D_4_Saccharimonadaceae;D_5_Candidatus Saccharimonas;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-010;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Tyzerella;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_uncultured;D_6_unidentified

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Roseburia;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-005;D_6_uncultured Clostridiales bacteriu

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Negativibacillus;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Butyricoccus;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae FCS020 group;D_6_mouse gut metagen

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae NK4A136 group;D_6_uncultured Clostridi

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_;

Unassigned;D_1_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_[Eubacterium] nodatum group;D_6_uncultured organism

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae;D_5_Alistipes;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Roseburia;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_[Eubacterium] coprostanoligenes group;D_6_gut metagen

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae;D_5_Streptococcus;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_uncultured;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae NK4A214 group;D_6_uncultured bacte

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Marvinbryantia;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_uncultured;D_6_Clostridium sp. Culture-41

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_uncultured;D_6_Clostridium sp. Clone-47

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Intestinimonas;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Roseburia;D_6_Clostridium sp. Clone-44

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_uncultured bacterium;D_6_uncultured bacteriu

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-006;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnoclostridium;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae;D_5_Alistipes;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_Family XIII AD3011 group;D_6_uncultured Clostridiales bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_uncultured Firmicutes bacterium;D_5_uncultured Firmicutes bacterium;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-009;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_uncultured;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae;D_5_Muribaculum;D_6_Parabacteroides sp. YL27

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_uncultured;D_6_;

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnoclostridium;D_6_Dorea sp. 5-2

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Lachnospiraceae UCG-006;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_GCA-90066575;D_6_uncultured bacterium

D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_[Eubacterium] nodatum group;D_6_;

5. Discusión

5.1. Parte 1 Revisión sistemática

La tendencia de los artículos que se incluyeron en la revisión sistemática que se desprendió como publicación de este trabajo doctoral indica un interés científico, en identificar los hidratos de carbono que podrían tener aplicaciones nutracéuticas o médicas; en otras palabras, los hidratos de carbono funcionales.

Adicionalmente la proporción de artículos con un diseño experimental que utilizaron los hidratos de carbono como aditivos alimentarios, indica un interés en conocer el posible impacto de estas moléculas en el microbioma intestinal. Es importante recalcar que las variables denominadas como “uso del hidrato de carbono” no son mutuamente excluyentes; los hidratos de carbono pueden tener una funcionalidad como aditivos alimentarios y simultáneamente contribuir a mejorar la salud del hospedero y encontrarse de forma natural en alimentos, tal es el caso de la goma guar y las pectinas^{101,119,120,186}.

El análisis que se llevó a cabo, indica que la estructura del hidrato de carbono tiene un valor de la información (IV) importante para predecir modificaciones en la composición del microbioma intestinal, como se puede observar en la (Tabla 4). Los diferentes almidones, polisacáridos sulfatados, fructanos e inulinas tienen diferentes IV's al compararlos con Variables de Diversidad Bacteriana.

Basado en los estudios que se incluyen, se observó que los taxones bacterianos que se modifican en la mayor cantidad de intervenciones dietéticas y estudios pertenecientes a la revisión sistemática son el filo *Firmicutes* y los 72 géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, mencionados 12 veces cada uno. Se obtuvieron altos IV's únicamente en los niveles taxonómicos de filo y género, para los niveles orden, clase, familia y especie los datos encontrados fueron insuficientes para lograr un resultado significativo.

El análisis realizado en nivel filo mostró que la abundancia de *Firmicutes* disminuyó en nueve estudios e incrementó en cuatro. La disminución se observó con los hidratos de carbono inulina y almidón resistente en ratas¹⁶⁷ oligosacáridos de pectina en ratones¹²⁰, camote morado en ratones¹⁶⁴, un polisacárido aislado de *Flammulina velutipes* en ratas¹⁵⁷, un oligosacárido feruloilado extraído de fibra de maíz en ratas¹⁶⁸, almidón de trigo en ratas¹⁵¹, fibra dietética insoluble de orujo de pera en ratas¹⁵⁶, cerdos alimentados con una dieta rica en celulosa y xilosa¹⁶⁵ y una intervención dietética rica en fibra aplicada en humanos¹⁸¹. El aumento de este mismo filo se observó en almidones resistentes en ratones¹⁵³, polisacárido extraído de *Lycium barbarum* en ratones¹⁴⁸, almidón resistente en adultos humanos sanos¹⁷⁵ y en dietas enriquecidas con almidón de trigo en humanos,¹⁵¹ cuyas características se reportan en la (Tabla 4).

Al hablar del género *Lactobacillus*, que pertenece al filo *Firmicutes*, dos de los estudios mostraron una disminución en este género, con la ingesta de polisacárido proveniente de *A. ordoisca* en ratas¹¹² y de polisacárido extraído de *Sargassum fusiforme* en ratones¹⁴⁵.

Mientras que el resto de los estudios en que este género cambió reportó un aumento de su abundancia relativa posterior a la ingesta de diferentes hidratos de carbono, tal es el caso de los oligosacáridos de pectina en ratones ¹²⁰, polisacárido de viruta de bambú en ratones ¹⁶², polisacárido extraído de *L. barbarum* en ratones ¹⁴⁸, oligosacáridos de manano en ratones ¹⁵², oligosacáridos derivados de pitahaya (*H. undatus*) en ratones ¹, oligosacáridos de fibra de maíz en ratas ¹⁶⁸, galacto oligosacáridos en ratones ¹⁷⁰ y sulfato de condroitina en ratones ¹¹⁵. Estas observaciones serán discutidas más adelante de acuerdo con el tipo de polisacárido que se utilizó en cada estudio o intervención (Tabla 4).

La abundancia del género *Bifidobacterium* aumentó por la ingesta de harina y almidón extraídos del tubérculo taro en ratas ⁷³, oligosacáridos de pectina en ratones ¹²⁰, oligosacáridos de manano en ratones ¹⁵², almidón resistente en adultos humanos ¹⁷⁴ e inulina de cadena larga en un estudio de envejecimiento hecho en humanos ¹⁷⁶ (Tabla 4).

Posteriormente, se observó que la abundancia de los filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* fue modificada en 10 estudios, con 2 mostrando un decremento y 8 un incremento del primero. Una disminución se observó en almidón resistente físicamente inaccesible en ratones ¹⁵³ y almidón resistente en adultos humanos ¹⁷⁵. Un incremento se observó en ratas alimentadas con inulina y con almidón resistente ¹⁶⁷ en ratones alimentados con oligosacáridos de pectina ¹²⁰, ratones alimentados con camote morado ¹⁶⁴, ratas suplementadas con polisacárido de *A. ordosica* ¹¹², ratas suplementadas con polisacárido aislado de *F. velutipes* ¹⁵⁷, ratas alimentadas con aislado de fibra dietética proveniente de residuos de camote ¹⁶¹, almidón gelatinizado incluido en dietas de ratones ¹⁵¹ y fibra dietética de pera administrada a ratas ¹⁵⁶ (Tabla 4).

Las siguientes secciones analizarán con detalle los cambios observados en géneros y filo específicos basados en la clasificación de los polisacáridos estudiados.

5.1.1. Polisacáridos sulfatados

Los polisacáridos sulfatados obtuvieron un IV de 1.808 (Tabla 4), como variable predictora para la reducción de *Lactobacillus*, estos resultados se observan en el estudio de Chen y colaboradores ¹⁰⁹, utilizando polisacáridos de *S. fusiforme* en ratones y en el estudio de Chen y colaboradores ¹⁴⁵ en donde, se suplementó la alimentación de ratas con fucoidan y la abundancia de este mismo filo disminuyó significativamente.

Sin embargo, esta tendencia es diferente de la revisión elaborada por Gotteland y colaboradores ¹⁸⁷, que sugiere que el consumo de polisacáridos sulfatados puede generar un incremento en la abundancia de este filo.

Los polisacáridos sulfatados también mostraron un IV alto 1.397 (Tabla 4), como variable predictora de un aumento en *Odoribacter*, mismo que se observa en el estudio de Shang ¹¹⁵ utilizando sulfato de condroitina. Este IV únicamente se sostiene por un bin y ninguna otra referencia se encontró en la literatura para discutir más a fondo esta relación.

Los hidratos de carbono sulfatados, también obtuvieron un IV de 1.398 (Tabla 4), como una variable predictiva para el aumento en la abundancia de *Turicibacter*, tal como se menciona en el estudio de Zhu y colaboradores ¹⁵⁴, en donde se alimentó a ratones con polisacáridos sulfatados provenientes de pepinos de mar y se obtuvo el ya mencionado resultado. *Turicibacter* es un género de bacteria que produce ácidos grasos de cadena corta y parecen tener heredabilidad de generación en generación, es decir, las madres parecen heredarlo a los hijos, de acuerdo con el estudio de Goodrich y colaboradores ⁸⁸. Este género mostró diferencia significativa contra el grupo control en dos de los 47 estudios que se incluyeron en la revisión sistemática.

También fue posible observar un IV de 1.398 (Tabla 4), y un único bin al predecir el aumento de *Desulfovibrio* utilizando polisacáridos sulfatados ¹¹⁵. Este género de bacterias Gram negativas son reductoras de sulfato para producir sulfuro de hidrógeno ¹⁸⁸ lo que son capaces de hacer en presencia de hidratos de carbono sulfatados. Este taxon bacteriano es considerado como indeseable en el microbioma intestinal, puesto que tiene un impacto negativo en la composición general del microbioma y la salud del hospedero.

5.1.2. Almidón gelatinizado.

El segundo IV más alto obtenido de esta revisión (1.781) con dos repeticiones (Tabla 4), se obtuvo al evaluar almidón gelatinizado como variable predictiva para un aumento en la abundancia de *Prevotella*. La co-ocurrencia de este tipo de polisacárido con el incremento de la abundancia del género *Prevotella* se encontró en ⁷³, donde las ratas alimentadas con almidón y harina de taro, mostraron un incremento significativo de *Prevotella* comparadas con el grupo control.

Lo mismo sucedió en el estudio de Pi y colaboradores ¹⁴⁷ en donde cerdos alimentados con almidón de maíz mostraron un incremento significativo en el mismo género. La tendencia se repitió con el estudio de Liu y colaboradores ¹⁶¹, mismo que no es parte de la revisión sistemática puesto que se realizó *in vitro*.

El género *Prevotella* es interesante como parte del microbioma intestinal. Por un lado, se ha correlacionado una mayor abundancia de este género con dietas basadas en plantas y estilos de vida rurales, ¹⁸⁹, en donde se comparan diferentes condiciones de vida en Estados Unidos de América y Papua Nueva Guinea observando que la microbiota intestinal asociada a dichos factores ambientales es diferente.

La abundancia relativa de *Prevotella* también es diferente según la adopción de algunos factores dietéticos adoptados, tal como la dieta mediterránea, lo que se observa, por ejemplo, en el estudio de De Filippis y colaboradores ¹⁹⁰

Como se ha mencionado, este género se ha reportado que correlaciona en varios estudios con un impacto benéfico en el sistema inmune, pero por el otro lado, algunas especies y cepas pertenecientes a este género han sido asociadas con un riesgo incrementado de ciertas condiciones de salud, por ejemplo, *Prevotella copri* ha sido asociada con inflamación intestinal

y resistencia a la insulina ¹⁹¹, con artritis reumatoide ¹⁹² y se ha observado que causa modificaciones en la respuesta inflamatoria ¹⁹³. Adicionalmente, *P. copri* junto con otras especies son más abundantes en personas que viven con VIH-1¹⁹⁴. Estos hallazgos, junto con la alta diversidad genética del género, ha llevado a la definición de algunas especies y cepas pertenecientes a *Prevotella* como posibles “patobiontes”, o patógenos oportunistas ¹⁹⁵.

El almidón gelatinizado también obtuvo un alto IV 1.398 (Tabla 4), como una variable predictiva para la reducción de la abundancia de *Proteobacteria*, como se puede encontrar en el estudio de Do y colaboradores ¹⁵¹, en el cual se encuentra que las dietas que contienen almidón gelatinizado de trigo se correlacionaron con una disminución en *Proteobacteria*. Una alta abundancia de este filo ha sido ligada a la incapacidad del hospedero de mantener un microbioma intestinal saludable, indicando que una alta prevalencia de *Proteobacteria* puede indicar disbiosis ¹⁹⁶.

El papel de *Proteobacteria* en el microbioma intestinal se discute en los estudios de Zhang y colaboradores ¹⁹⁷, Wang y colaboradores ¹⁹⁸, Everard y colaboradores (a)¹⁹⁹ y (b) ²⁰⁰, Ridaura y colaboradores ²⁰¹ Larsen y colaboradores ¹⁹⁵ y Xiuyin Zhang y colaboradores ²⁰². También es importante que la especie *Escherichia coli*, junto con todas sus cepas pertenecen al filo *Proteobacteria*.

5.1.3. Polisacáridos provenientes de hongos macromycetos

Los polisacáridos provenientes de macromicetos obtuvieron un alto IV 1.398 (Tabla 4) para la reducción de *Proteobacteria*. Este filo incluye bacterias patógenas, lo que sugiere que este grupo de polisacáridos podrían tener un efecto protector para evitar la disbiosis ^{171,196} lo que indirectamente mejoraría la salud del hospedero.

5.1.4. Oligosacáridos

Un alto IV (1.051 y seis bins) (Tabla 4), se obtuvo al analizar oligosacáridos como variable predictiva para el aumento de la abundancia de *Lactobacillus*, los estudios que se tomaron en cuenta tienen fuentes de hidratos de carbono muy diferentes.

Todos los estudios incluidos se llevaron a cabo en modelos murinos: oligosacáridos de pectina ¹²⁰, manano ¹⁵², de *H. undatus* ¹, oligosacáridos feruloilados de almidón de maíz ¹⁶⁸, galactooligosacáridos ¹⁷⁰ y de sulfato de condroitina ¹¹⁵.

Este género consiste en bacterias Gram positivas, algunas especies han mostrado tener actividad probiótica modificando el ambiente intestinal y la salud del hospedero ^{115,203–206}. El alto IV y número de bins es consistente con la idea de que los oligosacáridos vegetales pueden tener una función prebiótica ^{207–210}.

Los oligosacáridos también tienen un IV de 0.947 y dos bins (Tabla 4) para predecir una disminución de la abundancia de *Enterococcus*, un género que se considera está formado de microorganismos comensales ^{1,120}.

5.1.5. Fibra insoluble

La fibra insoluble tuvo un alto IV 0.95 y dos bins (Tabla 4) como variable predictiva para el aumento del filo *Actinobacteria*, los hidratos de carbono utilizados en estos estudios fueron los oligosacáridos feruloilados de fibra de maíz ¹⁶⁸ y polisacáridos solubles en soluciones alcalinas provenientes de *Arctium lappa* L. ¹⁴⁶. Este filo, junto con *Proteobacteria*, representa aproximadamente el 10% del microbioma intestinal y ha demostrado tener un rol crucial en la homeostasis intestinal ²¹¹.

También es importante mencionar que el género *Bifidobacterium* es parte de este filo. La fibra insoluble también tuvo un alto IV 0.828 y 4 bins (Tabla 4) al ser calculada como variable predictiva para el incremento de la abundancia de *Bacteroides* y un IV de 0.754 y 5 bins (Tabla 4) al ser utilizada como variable predictiva para a disminución de *Firmicutes*. Este resultado es importante, pues, lo anterior refuerza la ya conocida relación entre la fibra insoluble y este género.

5.1.6. Almidón

Un alto IV 0.947 y 2 bins (Tabla 4) se obtuvo al utilizar el almidón como variable predictiva para el aumento de *Firmicutes*, posiblemente debido a la inaccesibilidad física de los almidones resistentes. Los *Firmicutes* son bacterias Gram positivas, dentro de los que se encuentran algunas bacterias productoras de butirato ¹⁵³, el IV se mantiene cuando los almidones resistentes se toman en cuenta como variable predictiva, tal es el caso de los resultados de Kaur y colaboradores ¹⁵³; se cree que un aumento en la abundancia relativa de *Firmicutes*, lleva inevitablemente a una disminución en la abundancia relativa de *Bacteroidetes* ¹⁷⁵.

5.1.7. Fibra soluble

La fibra soluble tiene un IV de 0.729 y 5 bins (Tabla 4), como variable predictiva para un aumento en *Bacteroides*. El número de bins obtenido de la revisión, refuerza la asociación positiva entre este filo y la fibra soluble. El género *Bacteroides* tiene una gran capacidad de degradar diversos hidratos de carbono ²¹². La fibra soluble también tiene un IV de 0.500 y dos bins (Tabla 4) para funcionar como variable predictiva del incremento de *Actinobacteria*, filo importante para mantener la homeostasis intestinal ²¹¹.

5.1.8. Inulina

La inulina tiene un valor de IV de 0.537 y 3 bins (Tabla 4), para predecir un incremento en *Bifidobacterium*. Este género de microorganismos es considerado probiótico; un efecto que se observó en adultos mayores ¹⁷⁶, en un estudio clínico utilizando prebióticos derivados de inulina ¹⁷⁹ y en un estudio humano cruzado aleatorizado utilizando fructanos de tipo inulina provenientes de achicoria a través de “barras de snack” ¹⁷². Este efecto bifidogénico también ha sido observado en múltiples estudios *in vitro* ^{210,213}.

5.1.9. Hidratos de carbono como aditivos alimentarios o como componentes naturales de los alimentos

Las variables utilizadas para definir el uso de los hidratos de carbono como aditivo alimentario, hidrato de carbono funcional y componente alimentario no parecen tener un efecto significativo, o valor predictivo significativo sobre el microbioma intestinal. Aunque dichas variables aparecieron frecuentemente a lo largo de la revisión, únicamente tuvieron dos IV's altos; aditivos alimentarios con un poder predictivo para la reducción de *Blautia* 9.842 y 2 bins (Tabla 4).

Blautia es un género bacteriano que ha demostrado tener efectos probióticos, pero también ha demostrado que tiene correlación con algunas enfermedades cuando domina el microbioma intestinal. En la actualidad, es necesario realizar más investigación sobre este género, sus especies y cepas para comprender mejor el rol que juegan en el microbioma intestinal ²¹⁴.

La variable “hidratos de carbono como componentes naturales en alimentos” tuvo un valor alto de IV como predictora del incremento de *Bacteroides* 0.828 y 2 bins (Tabla 4), lo que se podría relacionar que la fibra soluble e insoluble se encuentran de forma natural en diferentes alimentos. *Bacteroides* es un género que metaboliza los hidratos de carbono de una forma muy eficiente y contiene especies que han demostrado tener un efecto probiótico ²¹⁵.

5.1.10. Hidratos de carbono como compuestos funcionales, hidratos de carbono funcionales

No se observó un alto IV para estas variables, posiblemente debido a que los compuestos funcionales interactúan de forma independiente con el microbioma intestinal modificando variables de diversidad bacteriana específicas.

En síntesis, algunos pares de variables predictivas y de respuesta tienen cuatro o más bins, tal es el caso de fibra insoluble con la reducción de *Firmicutes*, fibra soluble e insoluble con el aumento de *Bacteroides* y oligosacáridos con el aumento de *Lactobacillus*. Estas relaciones se han definido en múltiples estudios del microbioma intestinal.

Sin embargo, existen pares de variables con IV's altos y más de dos bins que no se reconocen en múltiples artículos de revisión, pudiendo indicar áreas de oportunidad para investigación futura. Por ejemplo, el almidón gelatinizado con el incremento de *Prevotella*, el almidón resistente con un incremento de *Firmicutes*; los hidratos de carbono sulfatados con un incremento en *Desulfovibrio*, *Turicibacter* y *Odoribacter* y una disminución en *Lactobacillus*; el almidón gelatinizado con una reducción de *Proteobacteria*; la inulina con un incremento de *Faecalibacterium*; almidón y almidón resistente con la disminución de *Blautia* y la inulina con un incremento de *Bifidobacterium* (Tabla 4).

5.2. Parte 2 Análisis bioinformático del microbioma intestinal de una base de datos pública generada a partir de una intervención murina con Fructooligosacáridos y extracto de *H. undatus*

5.2.1 Diferencias taxonómicas

El análisis de las diferencias taxonómicas entre los grupos definidos de acuerdo al tiempo de consumo de cada hidrato de carbono en la dieta de los individuos reveló resultados que podrían adjudicarse a la ingesta prolongada de los mismos tal y como se observa en los diferentes trabajos encontrados en la literatura revisada en la parte uno del éste trabajo.²¹⁶

Por ejemplo, a nivel de género, se pueden observar diferencias a lo largo del tiempo en *Ruminococcus 1*^{214,217}. Éste apareció en todos los grupos a partir de dos semanas de consumo de la dieta, lo que podría ser atribuible a la presencia prolongada o exposición de oligosacáridos que tuviesen un efecto positivo en la abundancia de este (cómo, celulosa o almidón resistente⁹⁸), lo que resalta, ya que tal género no se encontraba presente a los siete días de ingesta de la dieta.

Por otro lado, también podemos observar un comportamiento parecido pero a nivel de familia en *Prevotellaceae*¹¹⁵, en la cual el sub-grupo UCG-001 presenta un incremento de su abundancia a lo largo del tiempo en el punto T2, lo que posiblemente pudo suscitarse por la presencia de fibra soluble, almidones resistentes o gelatinizados de manera suficiente, ya que dicho fenómeno se observó en todos los conjuntos de sujetos, incluyendo el control, cuyas dietas contenían tales tipologías de oligosacáridos^{104,218}.

Se requerirá de mayor investigación para elucidar y confirmar los causales bioquímicos y celulares de dichos fenómenos, pero trabajos experimentales tales como los de Surono, I.S et al⁷³, o Peerakietkhajorn et al¹, respaldarían nuestras observaciones al haber obtenido incrementos de abundancia similares tanto de integrantes de la familia *Prevotellaceae* en un modelo animal mediante la inclusión en la dieta de harina de Taro (un vegetal abundante en

la región de Indonesia) en el primero, cómo el incremento de géneros *Lactobacillus* y *Bacteroides* mediante la ingesta de *Hylocerus undatus* o fruto del dragón, en el segundo.

Aun así, los cambios taxonómicos observados tanto en nuestro trabajo, como en el realizado por Peerakietkhajorn, son un indicio a que ciertamente existe una relación entre la composición del microbioma intestinal y los hidratos de carbono que se ingieren (en este caso, el extracto de fruto del dragón) ^{19920011,92,98,132,150}.

5.2.2 Alfa diversidad

Como resultado de nuestro análisis de diferentes factores de Alfa diversidad, tales como el Índice de Faith, la uniformidad de las secuencias y el Índice de Shannon, se podría concluir que no existe diferencia significativa entre los sujetos por agrupación o por hidrato de carbono consumido.

A priori, observaciones en la literatura contradicen nuestro resultado; por ejemplo, en el análisis de Alfa diversidad ejecutado en el trabajo de Peerakietkhajorn *et al*¹, se observan diferencias dentro de un rango de 0.81 y 0.89 en la uniformidad de secuencias, mientras que en nuestro trabajo observamos una diferencia de entre 0.37 a 0.49; y por otro lado, algo parecido ocurre con el Índice de Shannon; mientras que en nuestro trabajo no se observa diferencia significativa al obtener valores dentro del rango de 2.054 a 2.73. en el mismo trabajo de Peerakietkhajorn¹, se observaron resultados dentro del rango de 6.63 a 7.55.

Sin embargo, es importante detallar qué, como se mencionó previamente en el presente, existen dos métodos utilizados para la descripción de la Alfa diversidad; “Amplicon Sequence Variants” (ASVs)^{53,63,219} y “Operational Taxonomic Units” (OTUs)^{220,221}.

Nuestra evaluación se realizó mediante el uso de ASVs debido a que esta metodología, además de ser más reciente, se considera cuenta con mayor precisión puesto que permite agrupar secuencias cuya similitud se define a nivel de nucleótidos; mientras que OTUs conjunta las secuencias a partir de un porcentaje de similitud predefinida del total de cada secuencia, lo que podría afectar el resultado al ignorar potenciales errores en el procedimiento de secuenciación de estas¹³⁰.

Una vez mencionado esto, es que nosotros podríamos inferir que la diferencia entre nuestro resultado y lo observado en el trabajo de Peerakietkhajorn *et al*, podría atribuirse a que, en este último, el análisis se realizó mediante la aplicación de OTUs, y que, por lo tanto, nuestros resultados no son comparables puesto que la elección de cada método genera diferencias en la determinación de la alfa diversidad del microbioma¹.

Sin embargo, más adelante, si a partir del esperado incremento del uso de ASVs en otros trabajos de investigación se confirma la precisión e idoneidad de dicha técnica en el análisis de la Alfa diversidad del microbioma y, su uso sustituye a la aplicación de OTUs, nuestro resultado indicaría que la diferencia de la composición de la dieta por productos de origen

vegetal no tiene un impacto significativo en la alfa diversidad del microbioma al no modificar la cantidad de ASVs de cada muestra.^{63,130,219,222}

Por último, que no se observe diferencia significativa en la alfa diversidad tanto en el Índice de Faith ($p=0.406$), en análisis de uniformidad de secuencias ($p=0.408$), y el Índice de Shannon ($p=0.494$), robustece el resultado por ASVs y conlleva una señal para otra área de la ciencia, la metabolómica, en la que se pueda esclarecer las vías metabólicas que conllevan a la estabilidad de una alfa diversidad pero manteniendo el enriquecimiento microorganismos específicos tal y como se observa en el análisis taxonómico; y cómo más adelante discutiremos en la beta diversidad, y en la literatura (incluyendo la parte 1 de éste trabajo).^{73,84,223}

5.2.3 Beta diversidad

Nuestro resultado al analizar la Beta diversidad del microbioma, de manera similar a lo observado en el análisis de grupos taxonómicos, identificó una diferencia significativa en las métricas asociadas al agrupar a los sujetos por tiempo de ingesta de la dieta, mientras que no se encontró significancia estadística en la comparación de valores por criterios de agrupación de acuerdo con la composición de la dieta.

La diferencia significativa en métricas como la distancia de Bray Curtis, el Índice de Jaccard, la distancia Unifrac ponderada y la no ponderada; se observa entre las muestras obtenidas a los 7 días de ingesta de la dieta (T1), y las muestras obtenidas a los 14 días de exposición (T2).

Ésta observación es consistente con los resultados obtenidos en la investigación llevada a cabo por Peerakietkhajorn *et al*¹, reforzando la presunción de que el microbioma se modifica en el tiempo y las diferencias significativas aparecen tras un consumo prolongado de la dieta por el efecto que podrían tener procesos asociados como la producción de ácidos grasos de cadena corta, la adaptación microbiana al sustrato dietético y la proliferación diferencial de ciertas poblaciones microbianas en respuesta a la disponibilidad de nutrientes específicos, lo que tal y como se comentó previamente, sirve de señal para otras áreas de la ciencia para determinar los fenómenos metabólicos y celulares específicos que expliquen los resultados por los análisis bioinformáticos, como el desarrollado en éste trabajo, tanto en su parte 1 como en su parte 2, respecto a la conformación del microbioma^{73,84,160,224–226}.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos a partir de esta investigación no solo refuerzan el conocimiento existente o validan metodologías efectivas para el estudio del microbioma sino que también abre el interés para enfocar nuevas investigaciones que permitan potenciar el entendimiento tanto de cómo diversos nutrientes pueden modular la diversidad y composición del microbioma intestinal

6.1. Parte 1 Revisión Sistemática

Los resultados obtenidos a través de la metodología utilizada, por primera vez en el artículo de revisión sistemática, refuerzan observaciones previas que sugieren que el consumo de diferentes hidratos de carbono juega un rol importante en la homeostasis intestinal, mediante el impacto del microbioma intestinal.

Para comenzar, el uso de la herramienta SPIDER para determinar el enfoque específico de la revisión sistemática, definiendo el fenómeno de interés, los criterios de inclusión y exclusión, el tipo de investigación y un marco de trabajo adecuado para identificar las variables claves a binarizar para su posterior análisis con el WoE. Este enfoque sistemático garantizó un análisis exhaustivo y completo de la literatura, lo que permitió una comprensión global y la obtención de una matriz que trata de englobar la relación entre el consumo de hidratos de carbono y la composición del microbioma intestinal.

El uso del WoE como el enfoque estadístico primario permitió obtener resultados que se alinearan con relaciones ya conocidas entre hidratos de carbono específicos y su efecto en las Variables de diversidad Bacteriana (BDVs) y el microbioma intestinal, tal es el caso de los oligosacáridos y el incremento de *Lactobacillus*. El hecho de que estas relaciones fueran observadas y corroboradas mediante esta metodología, no únicamente fortalece el conocimiento previo, pero también provee evidencia de que la metodología es efectiva.

Además, la robustez de estos hallazgos no solamente refuerza el conocimiento existente, sino que también subraya la eficacia del enfoque analítico elegido. La evaluación sistemática de la evidencia, la síntesis de la información (binarización) y el tratamiento estadístico aplicado a los resultados congregados mediante la técnica del peso de la evidencia (WoE- IV) lo que permitió detectar algunas variables que no habían sido resaltadas, agrupar ciertos tipos de hidratos de carbono, qué tanto la dieta puede modificar la composición del microbioma y resaltar ciertos grupos que no se les había dado importancia en estudios donde se probaron algunos tipos de hidratos de carbono.

Sin embargo, tanto la metodología de análisis, como los resultados obtenidos, podrían abrir un interés de investigación para continuar alimentando el modelo y así establecer o reforzar

relaciones entre diferentes hidratos de carbono y diversos taxones bacterianos, así como replicar este tipo de análisis en otros temas

Al binarizar las variables, se reducen el número de valores que pueden tener los diferentes parámetros y se pueden comparar estudios con variaciones metodológicas, agrupándolos por similitud de los hidratos de carbono utilizado en cada artículo.

6.2. Parte 2 Análisis bioinformático del microbioma intestinal de una base de datos pública generada a partir de una intervención murina con Fructooligosacáridos y extracto de *H. undatus*

El estudio bioinformático de la alfa y beta diversidad del microbioma intestinal en respuesta a diferentes tipos de hidratos de carbono demuestra que existe una compleja interacción entre la dieta y la composición del microbioma. Gracias al análisis se identificaron los taxones bacterianos presentes en cada una de las muestras pertenecientes a la base de datos, así como se obtuvieron los valores para diferentes índices de la alfa y beta diversidad.

El análisis de estos valores sugiere que la alfa diversidad se mantuvo estable durante la intervención, no necesariamente indica una falta de respuesta a la ingesta del hidrato de carbono, puesto que se observaron cambios tanto en la beta diversidad como en el análisis taxonómico.

Por otro lado, el análisis de la beta diversidad reveló cambios en el tiempo de exposición a los diferentes hidratos de carbono. Lo anterior sugiere que se debe considerar la temporalidad de la intervención, pues un tiempo más prolongado puede generar la aparición de ciertos grupos debido a la adaptación del microbioma y la degradación de los hidratos de carbono.

A través del uso de una base de datos pública se logró construir un flujo de procesamiento de datos bioinformáticos que es capaz de generar visualizaciones de alfa y beta diversidad, y también puede asignar taxonomía a partir de una base de datos que contiene secuencias de gen 16S rRNA.

7. Referencias

- (1) Peerakietkhajorn, S.; Jeanmard, N.; Chuenpanitkit, P.; K-da, S.; Bannob, K.; Khuituan, P. Effects of Plant Oligosaccharides Derived from Dragon Fruit on Gut Microbiota in Proximal and Distal Colon of Mice. *Sains Malays* **2020**, *49* (3), 603–611. <https://doi.org/10.17576/jsm-2020-4903-15>.
- (2) Villanueva-Millán, M. J.; Pérez-Matute, P.; Oteo, J. A. Gut Microbiota: A Key Player in Health and Disease. A Review Focused on Obesity. *J Physiol Biochem* **2015**, *71* (3), 509–525. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0390-3>.
- (3) Sekirov, I.; Russell, S. L.; Antunes, L. C. M.; Finlay, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease Gut Microbiota in Health and Disease. **2010**, 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
- (4) *Weight of Evidence (WOE) and Information Value (IV) Explained*. <https://www.listendata.com/2015/03/weight-of-evidence-woe-and-information.html> (accessed 2022-04-27).
- (5) Rosenblatt, E. Calculating Weight of Evidence and Information Value. In *Credit Data and Scoring*; Elsevier, 2020; pp 99–104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818815-6.00012-1>.
- (6) Rocca, M.; Morford, L. R. L.; Blanset, D. L.; Halpern, W. G.; Cavagnaro, J.; Bowman, C. J. Applying a Weight of Evidence Approach to the Evaluation of Developmental Toxicity of Biopharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2018**, *98* (July), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.006>.
- (7) Tintó-Moliner, A.; Martin, M. Quantitative Weight of Evidence Method for Combining Predictions of Quantitative Structure-Activity Relationship Models. *SAR QSAR Environ Res* **2020**, *31* (4), 261–279. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2020.1725116>.
- (8) Dekant, W.; Bridges, J. A Quantitative Weight of Evidence Methodology for the Assessment of Reproductive and Developmental Toxicity and Its Application for Classification and Labeling of Chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2016**, *82*, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.09.009>.
- (9) Leong, S. Y.; Duque, S. M.; Abduh, S. B. M.; Oey, I. Carbohydrates. In *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*; Elsevier, 2019; pp 171–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00006-8>.
- (10) Coker, J. K. Carbohydrates Great and Small , from Dietary Fiber to Sialic Acids : How Glycans Influence the Gut Microbiome and Affect Human Health ABSTRACT. *Gut Microbes* **2021**, *13* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1869502>.
- (11) Flint, H. J.; Scott, K. P.; Duncan, S. H.; Louis, P.; Forano, E. Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut. *Gut Microbes* **2012**, *3* (4). <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>.
- (12) Balvočiute, M.; Huson, D. H. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - How Do These Taxonomies Compare? *BMC Genomics* **2017**, *18*. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>.
- (13) Yilmaz, P.; Parfrey, L. W.; Yarza, P.; Gerken, J.; Pruesse, E.; Quast, C.; Schweer, T.; Peplies, J.; Ludwig, W.; Glöckner, F. O. The SILVA and “All-Species Living Tree Project (LTP)” Taxonomic Frameworks. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>.
- (14) Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library. *Illumina.com* **2013**, No. B, 1–28.

- (15) Hall, M.; Beiko, R. G. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2018; Vol. 1849, pp 113–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8728-3_8.
- (16) Jovel, J.; Patterson, J.; Wang, W.; Hotte, N.; O’Keefe, S.; Mitchel, T.; Perry, T.; Kao, D.; Mason, A. L.; Madsen, K. L.; Wong, G. K. S. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front Microbiol* **2016**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00459>.
- (17) Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Walters, W. A.; González, A.; Caporaso, J. G.; Knight, R. Using QIIME to Analyze 16s rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. *Curr Protoc Microbiol* **2012**, No. SUPPL.27, 1–20. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01e05s27>.
- (18) Cooke, A.; Smith, D.; Booth, A. Beyond PICO: The SPIDER Tool for Qualitative Evidence Synthesis. *Qual Health Res* **2012**, 22 (10), 1435–1443. <https://doi.org/10.1177/1049732312452938>.
- (19) Methley, A. M.; Campbell, S.; Chew-Graham, C.; McNally, R.; Cheraghi-Sohi, S. PICO, PICOS and SPIDER: A Comparison Study of Specificity and Sensitivity in Three Search Tools for Qualitative Systematic Reviews. *BMC Health Serv Res* **2014**, 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12913-014-0579-0>.
- (20) Bolyen, E.; Rideout, J. R.; Dillon, M. R.; Bokulich, N. A.; Abnet, C. C.; Al-Ghalith, G. A.; Alexander, H.; Alm, E. J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; Bai, Y.; Bisanz, J. E.; Bittinger, K.; Brejnrod, A.; Brislawn, C. J.; Brown, C. T.; Callahan, B. J.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Chase, J.; Cope, E. K.; Da Silva, R.; Diener, C.; Dorrestein, P. C.; Douglas, G. M.; Durall, D. M.; Duvallet, C.; Edwardson, C. F.; Ernst, M.; Estaki, M.; Fouquier, J.; Gauglitz, J. M.; Gibbons, S. M.; Gibson, D. L.; Gonzalez, A.; Gorlick, K.; Guo, J.; Hillmann, B.; Holmes, S.; Holste, H.; Huttenhower, C.; Huttley, G. A.; Janssen, S.; Jarmusch, A. K.; Jiang, L.; Kaehler, B. D.; Kang, K. Bin; Keefe, C. R.; Keim, P.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koester, I.; Kosciulek, T.; Kreps, J.; Langille, M. G. I.; Lee, J.; Ley, R.; Liu, Y.-X.; Loftfield, E.; Lozupone, C.; Maher, M.; Marotz, C.; Martin, B. D.; McDonald, D.; McIver, L. J.; Melnik, A. V.; Metcalf, J. L.; Morgan, S. C.; Morton, J. T.; Naimey, A. T.; Navas-Molina, J. A.; Nothias, L. F.; Orchanian, S. B.; Pearson, T.; Peoples, S. L.; Petras, D.; Preuss, M. L.; Pruesse, E.; Rasmussen, L. B.; Rivers, A.; Robeson, M. S.; Rosenthal, P.; Segata, N.; Shaffer, M.; Shiffer, A.; Sinha, R.; Song, S. J.; Spear, J. R.; Swafford, A. D.; Thompson, L. R.; Torres, P. J.; Trinh, P.; Tripathi, A.; Turnbaugh, P. J.; Ul-Hasan, S.; van der Hooft, J. J. J.; Vargas, F.; Vázquez-Baeza, Y.; Vogtmann, E.; von Hippel, M.; Walters, W.; Wan, Y.; Wang, M.; Warren, J.; Weber, K. C.; Williamson, C. H. D.; Willis, A. D.; Xu, Z. Z.; Zaneveld, J. R.; Zhang, Y.; Zhu, Q.; Knight, R.; Caporaso, J. G. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **2019**, 37 (8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- (21) Zhu, B.; Wang, X.; Li, L. Human Gut Microbiome: The Second Genome of Human Body. *Protein Cell* **2010**, 1 (8), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0093-z>.
- (22) Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochemical Journal* **2017**, 474 (11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>.
- (23) Yamashiro, Y. Gut Microbiota in Health and Disease. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2018. <https://doi.org/10.1159/000481627>.
- (24) Han, M.; Wang, C.; Liu, P.; Li, D.; Li, Y.; Ma, X. Dietary Fiber Gap and Host Gut Microbiota. *Protein Pept Lett* **2017**, 24 (5), 388–396. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170220113312>.
- (25) Yan, F.; Polk, D. B. Probiotics and Immune Health. *Curr Opin Gastroenterol* **2011**, 27 (6), 496–501. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834baa4d>.

- (26) Lloyd-Price, J.; Abu-Ali, G.; Huttenhower, C. The Healthy Human Microbiome. *Genome Med* **2016**, *8* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>.
- (27) Clemente, J. C.; Ursell, L. K.; Parfrey, L. W.; Knight, R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>.
- (28) *PRISMA statement*. <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/>.
- (29) Wallace, S. S.; Barak, G.; Truong, G.; Parker, M. W. Hierarchy of Evidence Within the Medical Literature. *Hosp Pediatr* **2022**, *12* (8), 745–750. <https://doi.org/10.1542/hpeds.2022-006690>.
- (30) Siddaway, A. P.; Wood, A. M.; Hedges, L. V. How to Do a Systematic Review: A Best Practice Guide for Conducting and Reporting Narrative Reviews, Meta-Analyses, and Meta-Syntheses. *Annu Rev Psychol* **2019**, *70* (1), 747–770. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010418-102803>.
- (31) *About Cochrane Reviews | Cochrane Library*. <https://www.cochranelibrary.com/about/about-cochrane-reviews> (accessed 2023-10-02).
- (32) Kruschke, J. K. Models of Categorization. *The Cambridge handbook of computational psychology* **2008**, 267–301.
- (33) Hammer, P. L.; Bonates, T. O. Logical Analysis of Data—An Overview: From Combinatorial Optimization to Medical Applications. *Ann Oper Res* **2006**, *148* (1), 203–225. <https://doi.org/10.1007/s10479-006-0075-y>.
- (34) Fan, L.; Ding, Y. Research on Risk Scorecard of Sick Building Syndrome Based on Machine Learning. *Build Environ* **2022**, *211* (83), 108710. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2021.108710>.
- (35) Siddiqi, N. *Credit Risk Scorecards: Developing and Implementing Intelligent Credit Scoring*; Wiley : Danvers MA, USA, 2006; Vol. 1.
- (36) Luscombe, N. M.; Greenbaum, D.; Gerstein, M. What Is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. *Methods Inf Med* **2001**, *40* (04), 346–358. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1634431>.
- (37) Lederberg, B. J.; McCray, A. T. ' Ome Sweet ' Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* **2001**, *15* (7), 8.
- (38) Lane, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*; Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds.; John Wiley and Sons: New York, 1991; pp 115–175.
- (39) Fuks, G.; Elgart, M.; Amir, A.; Zeisel, A.; Turnbaugh, P. J.; Soen, Y.; Shental, N. Combining 16S rRNA Gene Variable Regions Enables High-Resolution Microbial Community Profiling. *Microbiome* **2018**, *6* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0396-x>.
- (40) Ranjan, R.; Rani, A.; Metwally, A.; McGee, H. S.; Perkins, D. L. Analysis of the Microbiome: Advantages of Whole Genome Shotgun versus 16S Amplicon Sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *469* (4), 967–977. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083>.
- (41) Mandal, S.; Van Treuren, W.; White, R. A.; Eggesbø, M.; Knight, R.; Peddada, S. D. Analysis of Composition of Microbiomes: A Novel Method for Studying Microbial Composition. *Microb Ecol Health Dis* **2015**, *26* (0). <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>.
- (42) Reuter, J. A.; Spacek, D. V.; Snyder, M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell* **2015**, *58* (4), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>.

- (43) Hughes, J. B.; Hellmann, J. J.; Ricketts, T. H.; Bohannon, B. J. M.; Sinclair, L.; Osman, O. A.; Bertilsson, S.; Eiler, A.; Sala, V.; De Faveri, E.; Li, C.; Lim, K. M. K.; Chng, K. R.; Nagarajan, N.; Nishida, S.; Ono, Y.; Sekimizu, K.; Hanning, I.; Diaz-Sanchez, S.; Smith, L. B.; Kasai, S.; Scott, J. G.; Chu, Z.-J.; Wang, Y.-J.; Ying, S.-H.; Wang, X.-W.; Feng, M.-G.; Benelli, G.; Lo Iacono, A.; Canale, A.; Mehlhorn, H.; Aldersley, A.; Champneys, A.; Homer, M.; Robert, D.; Ferguson, L. V.; Heinrichs, D. E.; Sinclair, B. J.; Ott, B. M.; Cruciger, M.; Dacks, A. M.; Rio, R. V. M.; Andreadis, S. S.; Michaelakis, A. Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity MINIREVIEW Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol* **2016**, *10* (1), 4399–4406. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4399>.
- (44) Allen, B.; Kon, M.; Bar-Yam, Y. A New Phylogenetic Diversity Measure Generalizing the Shannon Index and Its Application to Phyllostomid Bats. *Am Nat* **2009**, *174* (2), 236–243. <https://doi.org/10.1086/600101>.
- (45) Kim, B.-R.; Shin, J.; Guevarra, R. B.; Lee, J. H.; Kim, D. W.; Seol, K.-H.; Lee, J.-H.; Kim, H. B.; Isaacson, R. E. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol* **2017**, *27* (12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>.
- (46) Yang, Z.; Xu, F.; Li, H.; He, Y. Beyond Samples: A Metric Revealing More Connections of Gut Microbiota between Individuals. *Comput Struct Biotechnol J* **2021**, *19*, 3930–3937. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.009>.
- (47) Lozupone, C.; Lladser, M. E.; Knights, D.; Stombaugh, J.; Knight, R. UniFrac: An Effective Distance Metric for Microbial Community Comparison. *ISME J* **2011**, *5* (2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>.
- (48) Lozupone, C.; Knight, R. UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71* (12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>.
- (49) McDonald, D.; Vázquez-Baeza, Y.; Koslicki, D.; McClelland, J.; Reeve, N.; Xu, Z.; Gonzalez, A.; Knight, R. Striped UniFrac: Enabling Microbiome Analysis at Unprecedented Scale. *Nat Methods* **2018**, *15* (11), 847–848. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0187-8>.
- (50) Hamady, M.; Lozupone, C.; Knight, R. Fast UniFrac: Facilitating High-Throughput Phylogenetic Analyses of Microbial Communities Including Analysis of Pyrosequencing and PhyloChip Data. *ISME J* **2010**, *4* (1), 17–27. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.97>.
- (51) Lozupone, C. A.; Hamady, M.; Kelley, S. T.; Knight, R. Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73* (5), 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>.
- (52) Gilliland, M. G.; Young, V. B.; Huffnagle, G. B. *Gastrointestinal Microbial Ecology with Perspectives on Health and Disease*, First Edit.; Elsevier Inc., 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382026-6.00040-3>.
- (53) Edgar, R. C. UNOISE2: Improved Error-Correction for Illumina 16S and ITS Amplicon Sequencing. <https://doi.org/10.1101/081257>.
- (54) *taxonomia*. <https://dle.rae.es/taxonom%C3%ADa> (accessed 2023-10-07).
- (55) Padial, J. M.; Miralles, A.; De la Riva, I.; Vences, M. The Integrative Future of Taxonomy. *Front Zool* **2010**, *7* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16/TABLES/1>.
- (56) Godfray, H. C. J. Challenges for Taxonomy. *Nature* **2002**, *417* (6884), 17–19. <https://doi.org/10.1038/417017a>.

- (57) Garrity, G. M. A New Genomics-Driven Taxonomy of Bacteria and Archaea: Are We There Yet? *J Clin Microbiol* **2016**, *54* (8), 1956–1963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00200-16>.
- (58) Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F. O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res* **2012**, *41* (D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- (59) McDonald, D.; Price, M. N.; Goodrich, J.; Nawrocki, E. P.; Desantis, T. Z.; Probst, A.; Andersen, G. L.; Knight, R.; Hugenholtz, P. An Improved Greengenes Taxonomy with Explicit Ranks for Ecological and Evolutionary Analyses of Bacteria and Archaea. *ISME Journal* **2012**, *6* (3), 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>.
- (60) Federhen, S. The NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1178>.
- (61) Yoon, S. H.; Ha, S. M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A Taxonomically United Database of 16S rRNA Gene Sequences and Whole-Genome Assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* **2017**, *67* (5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
- (62) Meier-Kolthoff, J. P.; Göker, M. TYGS Is an Automated High-Throughput Platform for State-of-the-Art Genome-Based Taxonomy. *Nat Commun* **2019**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>.
- (63) Maruyama, H.; Masago, A.; Nambu, T.; Mashimo, C.; Okinaga, T. Amplicon Sequence Variant-Based Oral Microbiome Analysis Using QIIME 2. *J Osaka Dent Univ* **2020**, *54* (2), 273–281. <https://doi.org/10.20944/preprints202008.0206.v1>.
- (64) Anderson, M. J. A New Method for Non-parametric Multivariate Analysis of Variance. *Austral Ecol* **2001**, *26* (1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.
- (65) Bokulich, N. A.; Kaehler, B. D.; Rideout, J. R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R.; Huttley, G. A.; Gregory Caporaso, J. Optimizing Taxonomic Classification of Marker-Gene Amplicon Sequences with QIIME 2's Q2-Feature-Classifier Plugin. *Microbiome* **2018**, *6* (1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>.
- (66) Knights, D.; Costello, E. K.; Knight, R. Supervised Classification of Human Microbiota. *FEMS Microbiol Rev* **2011**, *35* (2), 343–359. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00251.x>.
- (67) Schloss, P. D.; Mcbain, A. J. Reintroducing Mothur: 10 Years Later. **2020**. <https://doi.org/10.1128/AEM>.
- (68) López-García, A.; Pineda-Quiroga, C.; Atxaerandio, R.; Pérez, A.; Hernández, I.; García-Rodríguez, A.; González-Recio, O. Comparison of Mothur and QIIME for the Analysis of Rumen Microbiota Composition Based on 16S rRNA Amplicon Sequences. *Front Microbiol* **2018**, *9* (DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03010>.
- (69) Valdes, A. M.; Walter, J.; Segal, E.; Spector, T. D. Role of the Gut Microbiota in Nutrition and Health. *BMJ* **2018**, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>.
- (70) Cui, L.; Guan, X.; Ding, W.; Luo, Y.; Wang, W.; Bu, W.; Song, J.; Tan, X.; Sun, E.; Ning, Q.; Liu, G.; Jia, X.; Feng, L. *Scutellaria Baicalensis* Georgi Polysaccharide Ameliorates DSS-Induced Ulcerative Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Modulating Gut Microbiota. *Int J Biol Macromol* **2020**, No. xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.259>.
- (71) Swidsinski, A.; Ung, V.; Sydora, B. C.; Loening-Baucke, V.; Doerffel, Y.; Verstraelen, H.; Fedorak, R. N. Bacterial Overgrowth and Inflammation of Small Intestine after Carboxymethylcellulose Ingestion in Genetically Susceptible Mice. *Inflamm Bowel Dis* **2009**, *15* (3), 359–364. <https://doi.org/10.1002/ibd.20763>.

- (72) Blaut, M. Composition and Function of the Gut Microbiome. In *The Gut Microbiome in Health and Disease*; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 5–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90545-7_2.
- (73) Surono, I. S.; Venema, K. Modulation of Gut Microbiota Profile and Short-Chain Fatty Acids of Rats Fed with Taro Flour or Taro Starch. *Int J Microbiol* **2020**, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/8893283>.
- (74) Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M. C. C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Corral, G. H.; Kazou, M.; Kinkel, L.; Lange, L.; Lima, N.; Loy, A.; Macklin, J. A.; Maguin, E.; Mauchline, T.; McClure, R.; Mitter, B.; Ryan, M.; Sarand, I.; Smidt, H.; Schelkle, B.; Roume, H.; Kiran, G. S.; Selvin, J.; Souza, R. S. C. de; Van Overbeek, L.; Singh, B. K.; Wagner, M.; Walsh, A.; Sessitsch, A.; Schloter, M. Microbiome Definition Re-Visited: Old Concepts and New Challenges. *Microbiome* **2020**, *8* (1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.
- (75) Henke, M. T.; Kenny, D. J.; Cassilly, C. D.; Vlamakis, H.; Xavier, R. J.; Clardy, J. Ruminococcus Gnavus, a Member of the Human Gut Microbiome Associated with Crohn’s Disease, Produces an Inflammatory Polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116* (26), 12672–12677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904099116>.
- (76) Laursen, M. F.; Zachariassen, G.; Bahl, M. I.; Bergström, A.; Host, A.; Michaelsen, K. F.; Licht, T. R. Having Older Siblings Is Associated with Gut Microbiota Development during Early Childhood. *BMC Microbiol* **2015**. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0477-6>.
- (77) Song, M.; Chan, A. T.; Sun, J. Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2020**. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.048>.
- (78) Foster, J. A.; McVey Neufeld, K. A. Gut-Brain Axis: How the Microbiome Influences Anxiety and Depression. *Trends in Neurosciences*. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>.
- (79) Wisniewski, P. J.; Dowden, R. A.; Campbell, S. C. Role of Dietary Lipids in Modulating Inflammation through the Gut Microbiota. *Nutrients* **2019**, *11* (1). <https://doi.org/10.3390/nu11010117>.
- (80) Gummesson, A.; Carlsson, L. M. S.; Storlien, L. H.; Bäckhed, F.; Lundin, P.; Löfgren, L.; Stenlöf, K.; Lam, Y. Y.; Fagerberg, B.; Carlsson, B. Intestinal Permeability Is Associated with Visceral Adiposity in Healthy Women. *Obesity* **2011**, *19* (11), 2280–2282. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.251>.
- (81) Wang, B.; Yao, M.; Lv, L.; Ling, Z.; Li, L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008>.
- (82) Zeng, H.; Huang, C.; Lin, S.; Zheng, M.; Chen, C.; Zheng, B.; Zhang, Y. Lotus Seed Resistant Starch Regulates Gut Microbiota and Increases SCFAs Production and Mineral Absorption in Mice Lotus Seed Resistant Starch Regulates Gut Microbiota and Increases SCFAs Production and Mineral Absorption in Mice. **2017**. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02860>.
- (83) Eckburg, P. B.; Bik, E. M.; Bernstein, C. N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S. R.; Nelson, K. E.; Relman, D. A. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* **2005**, *308* (5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>.
- (84) Liu, Z.; Li, L.; Ye, J.; Zhang, H.; Li, Y.; Sair, A. T.; Pan, J.; Liu, X.; Li, X.; Yan, S.; Liu, X. High-Dietary Fiber Intake Alleviates Antenatal Obesity-Induced Postpartum Depression: Roles of Gut Microbiota and Microbial Metabolite Short-Chain Fatty Acid Involved. **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04290>.
- (85) Cheng, W.; Lu, J.; Li, B.; Lin, W.; Zhang, Z.; Wei, X.; Sun, C.; Chi, M.; Bi, W.; Yang, B.; Jiang, A.; Yuan, J. Effect of Functional Oligosaccharides and Ordinary Dietary

- Fiber on Intestinal Microbiota Diversity. *Front Microbiol* **2017**, *8* (SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01750>.
- (86) Payne, A. N.; Chassard, C.; Lacroix, C. Gut Microbial Adaptation to Dietary Consumption of Fructose, Artificial Sweeteners and Sugar Alcohols: Implications for Host-Microbe Interactions Contributing to Obesity. *Obesity Reviews* **2012**, *13* (9), 799–809. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01009.x>.
- (87) J. Chen, J. Liu, C. Yan, C. Zhang, W. Pan, W. Zhang, Y. Lu, L. C. and Y. C. Sarcodon Aspratus Polysaccharides Ameliorated Obesity-Induced Metabolic Disorders and Modulated Gut Microbiota Dysbiosis in Mice 3 Fed a High-Fat Diet 4. *Food function* **2020**, 0–34. <https://doi.org/10.1039/C9FO00963A>.
- (88) Goodrich, J. K.; Davenport, E. R.; Beaumont, M.; Jackson, M. A.; Knight, R.; Ober, C.; Spector, T. D.; Bell, J. T.; Clark, A. G.; Ley, R. E. Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* **2016**, *19* (5), 731–743. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.017>.
- (89) Martin, R.; Makino, H.; Yavuz, A. C.; Ben-Amor, K.; Roelofs, M.; Ishikawa, E.; Kubota, H.; Swinkels, S.; Sakai, T.; Oishi, K.; Kushiro, A.; Knol, J. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One* **2016**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158498>.
- (90) Korpela, K.; Salonen, A.; Hickman, B.; Kunz, C.; Sprenger, N.; Kukkonen, K.; Savilahti, E.; Kuitunen, M.; de Vos, W. M. Fucosylated Oligosaccharides in Mother’s Milk Alleviate the Effects of Caesarean Birth on Infant Gut Microbiota. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 13757. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32037-6>.
- (91) Walsh, C.; Lane, J. A.; van Sinderen, D.; Hickey, R. M. Human Milk Oligosaccharides: Shaping the Infant Gut Microbiota and Supporting Health. *J Funct Foods* **2020**, *72* (February), 104074. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104074>.
- (92) Tyakht, A. V.; Kostyukova, E. S.; Popenko, A. S.; Belenikin, M. S.; Pavlenko, A. V.; Larin, A. K.; Karpova, I. Y.; Selezneva, O. V.; Semashko, T. A.; Ospanova, E. A.; Babenko, V. V.; Maev, I. V.; Cheremushkin, S. V.; Kucheryavyy, Y. A.; Shcherbakov, P. L.; Grinevich, V. B.; Efimov, O. I.; Sas, E. I.; Abdulkhakov, R. A.; Abdulkhakov, S. R.; Lyalyukova, E. A.; Livzan, M. A.; Vlassov, V. V.; Sagdeev, R. Z.; Tsukanov, V. V.; Osipenko, M. F.; Kozlova, I. V.; Tkachev, A. V.; Sergienko, V. I.; Alexeev, D. G.; Govorun, V. M. Human Gut Microbiota Community Structures in Urban and Rural Populations in Russia. *Nat Commun* **2013**, *4*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms3469>.
- (93) Ramirez, J.; Guarner, F.; Bustos Fernandez, L.; Maruy, A.; Sdepanian, V. L.; Cohen, H. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10* (November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572912>.
- (94) Mailing, L. J.; Allen, J. M.; Buford, T. W.; Fields, C. J.; Woods, J. A. Exercise and the Gut Microbiome: A Review of the Evidence, Potential Mechanisms, and Implications for Human Health. *Exerc Sport Sci Rev* **2019**, *47* (2), 75–85. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000183>.
- (95) Singh, R. K.; Chang, H. W.; Yan, D.; Lee, K. M.; Ucmak, D.; Wong, K.; Abrouk, M.; Farahnik, B.; Nakamura, M.; Zhu, T. H.; Bhutani, T.; Liao, W. Influence of Diet on the Gut Microbiome and Implications for Human Health. *J Transl Med* **2017**, *15* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>.
- (96) Mora-Flores, L. P.; Moreno-Terrazas Casildo, R. M.-T.; Fuentes-Cabrera, J.; Pérez-Vicente, H. A.; de Anda-Jáuregui, G.; Neri-Torres, E. E. The Role of Carbohydrate Intake on the Gut Microbiome: A Weight of Evidence Systematic Review. *Microorganisms* **2023**, *11* (7), 1728. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071728>.

- (97) Toussaint-Samat, M. The History of Cereals. In *A History of Food*; Wiley, 2008; pp 114–180. <https://doi.org/10.1002/9781444305135.ch6>.
- (98) Sajilata, M. G.; Singhal, R. S.; Kulkarni, P. R. Resistant Starch - A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2006**, *5* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x>.
- (99) Qi, X.; Tester, R. F. Fructose, Galactose and Glucose – In Health and Disease. *Clinical Nutrition ESPEN*. Elsevier Ltd October 1, 2019, pp 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.07.004>.
- (100) Shoaib, M.; Shehzad, A.; Omar, M.; Rakha, A.; Raza, H.; Sharif, H. R.; Shakeel, A.; Ansari, A.; Niazi, S. Inulin: Properties, Health Benefits and Food Applications. *Carbohydr Polym* **2016**, *147*, 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020>.
- (101) Beukema, M.; Faas, M. M.; Vos, P. De. The Effects of Different Dietary Fiber Pectin Structures on the Gastrointestinal Immune Barrier : Impact via Gut Microbiota and Direct Effects on Immune Cells. *Exp Mol Med* **2020**. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0449-2>.
- (102) Zhang, X.; Wu, H.; Li, Z.; Li, Y.; Wang, S.; Zhu, D.; Wen, X.; Li, S. Effects of Dietary Supplementation of Ulva Pertusa and Non-Starch Polysaccharide Enzymes on Gut Microbiota of *Siganus Canaliculatus*. *J Oceanol Limnol* **2018**, *36* (2), 438–449. <https://doi.org/10.1007/s00343-017-6235-x>.
- (103) Magallanes-Cruz, P. A.; Flores-Silva, P. C.; Bello-Perez, L. A. Starch Structure Influences Its Digestibility: A Review. *J Food Sci* **2017**, *82* (9), 2016–2023. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13809>.
- (104) Raigond, P.; Ezekiel, R.; Raigond, B. Resistant Starch in Food: A Review. *J Sci Food Agric* **2015**, *95* (10), 1968–1978. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6966>.
- (105) Chi, L.; Khan, I.; Lin, Z.; Zhang, J.; Lee, M. Y. S.; Leong, W.; Hsiao, W. L. W.; Zheng, Y. Fructo-Oligosaccharides from *Morinda Officinalis* Remodeled Gut Microbiota and Alleviated Depression Features in a Stress Rat Model. *Phytomedicine* **2020**, *67* (December 2019), 153157. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153157>.
- (106) Kamiloglu, S.; Tomas, M.; Ozdal, T.; Yolci-Omeroglu, P.; Capanoglu, E. Bioactive Component Analysis. In *Innovative Food Analysis*; Galanakis, C. M., Ed.; Academic Press, 2021; pp 41–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819493-5.00002-9>.
- (107) Zeng, P.; Li, J.; Chen, Y.; Zhang, L. The Structures and Biological Functions of Polysaccharides from Traditional Chinese Herbs. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier B.V., 2019; Vol. 163, pp 423–444. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.03.003>.
- (108) Wei, L. I. U.; Ran, Y. A. N.; Liang, Z. Dendrobium Sonia Polysaccharide Regulates Immunity and Restores the Dysbiosis of the Gut Microbiota of the Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressed Mice. *Chin J Nat Med* **2019**, *17* (8), 600–607. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(19\)30062-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(19)30062-7).
- (109) Chen, Q.; Liu, M.; Zhang, P.; Fan, S.; Huang, J.; Yu, S.; Zhang, C.; Li, H. Fucoidan and Galactooligosaccharides Ameliorate High-Fat Diet-Induced Dyslipidemia in Rats by Modulating the Gut Microbiota and Bile Acid Metabolism. *Nutrition* **2019**, *65*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.03.001>.
- (110) Li, S.; Li, J.; Mao, G.; Yan, L.; Hu, Y.; Ye, X.; Tian, D.; Linhardt, R. J.; Chen, S. Effect of the Sulfation Pattern of Sea Cucumber-Derived Fucoidan Oligosaccharides on Modulating Metabolic Syndromes and Gut Microbiota Dysbiosis Caused by HFD in Mice. *J Funct Foods* **2019**, *55* (February), 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.001>.

- (111) Pansai, N.; Chakree, K.; Takahashi Yupanqui, C.; Raungrut, P.; Yanyiam, N.; Wichienchot, S. Gut Microbiota Modulation and Immune Boosting Properties of Prebiotic Dragon Fruit Oligosaccharides. *Int J Food Sci Technol* **2020**, *55* (1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14230>.
- (112) Xing, Y. Y.; Xu, Y. Q.; Jin, X.; Shi, L. L.; Guo, S. W.; Yan, S. M.; Shi, B. L. Optimization Extraction and Characterization of: *Artemisia Ordosica* Polysaccharide and Its Beneficial Effects on Antioxidant Function and Gut Microbiota in Rats. *RSC Adv* **2020**, *10* (44), 26151–26164. <https://doi.org/10.1039/d0ra05063f>.
- (113) Wu, T.; Shen, M.; Guo, X.; Huang, L.; Yang, J.; Yu, Q.; Chen, Y.; Xie, J. Cyclocarya Paliurus Polysaccharide Alleviates Liver Inflammation in Mice via Beneficial Regulation of Gut Microbiota and TLR4/MAPK Signaling Pathways. *Int J Biol Macromol* **2020**, *160*, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.187>.
- (114) Hao, J.; Li, G.; Yu, G. Dietary Polysaccharide from *Enteromorpha Clathrata* Modulates Gut Microbiota and Promotes the Growth. **2018**. <https://doi.org/10.3390/md16050167>.
- (115) Shang, Q.; Shi, J.; Song, G.; Zhang, M.; Cai, C.; Hao, J.; Li, G.; Yu, G. Structural Modulation of Gut Microbiota by Chondroitin Sulfate and Its Oligosaccharide. *Int J Biol Macromol* **2016**, *89*, 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.091>.
- (116) Saha, D.; Bhattacharya, S. Hydrocolloids as Thickening and Gelling Agents in Food: A Critical Review. *J Food Sci Technol* **2010**, *47* (6), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0162-6>.
- (117) CODEX ALIMENTARIUS. *GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES*; 2021. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>.
- (118) Chilakapati, J.; Mehendale, H. M. Acceptable Daily Intake (ADI). In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*; Elsevier, 2014; pp 8–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00213-X>.
- (119) Kapoor, M. P.; Koido, M.; Kawaguchi, M.; Timm, D.; Ozeki, M.; Yamada, M.; Mitsuya, T.; Okubo, T. Lifestyle Related Changes with Partially Hydrolyzed Guar Gum Dietary Fiber in Healthy Athlete Individuals – A Randomized, Double-Blind, Crossover, Placebo-Controlled Gut Microbiome Clinical Study. *J Funct Foods* **2020**, *72* (December 2019), 104067. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104067>.
- (120) Zhang, S.; Hu, H.; He, W.; Muhammad, Z.; Wang, L. Regulatory Roles of Pectin Oligosaccharides on Immunoglobulin Production in Healthy Mice Mediated by Gut Microbiota. **2019**, *1801363*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801363>.
- (121) Bang, S.-J.; Lee, E.-S.; Song, E.-J.; Nam, Y.-D.; Seo, M.-J.; Kim, H.-J.; Park, C.-S.; Lim, M. Y.; Seo, D.-H. Effect of Raw Potato Starch on the Gut Microbiome and Metabolome in Mice. *Int J Biol Macromol* **2019**, *133*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.085>.
- (122) Newman, M. A.; Petri, R. M.; Grüll, D.; Zebeli, Q.; Metzler-zebeli, B. U. Transglycosylated Starch Modulates the Gut Microbiome and Expression of Genes Related to Lipid Synthesis in Liver and Adipose Tissue of Pigs. **2018**, *9* (February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00224>.
- (123) Schlomann, B. H.; Parthasarathy, R. Timescales of Gut Microbiome Dynamics. *Curr Opin Microbiol* **2019**, *50*, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.011>.
- (124) van Eck, N. J.; Waltman, L. VOS Viewer. 2020. <https://www.vosviewer.com>.
- (125) van Eck, N. J.; Waltman, L. Citation-Based Clustering of Publications Using CitNetExplorer and VOSviewer. *Scientometrics* **2017**, *111* (2), 1053–1070. <https://doi.org/10.1007/s11192-017-2300-7>.
- (126) *The Python Language Reference — Python 3.10.4 documentation*. <https://docs.python.org/3/reference/> (accessed 2022-04-23).

- (127) Kluyver, T.; Ragan-Kelley, B.; Pérez, F.; Granger, B.; Bussonnier, M.; Frederic, J.; Kelley, K.; Hamrick, J.; Grout, J.; Corlay, S.; Ivanov, P.; Avila, D.; Abdalla, S.; Willing, C. Jupyter Notebooks—a Publishing Format for Reproducible Computational Workflows. In *Positioning and Power in Academic Publishing: Players, Agents and Agendas - Proceedings of the 20th International Conference on Electronic Publishing, ELPUB 2016*; 2016. <https://doi.org/10.3233/978-1-61499-649-1-87>.
- (128) McKinney, W. Data Structures for Statistical Computing in Python. In *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*; 2010. <https://doi.org/10.25080/majora-92bf1922-00a>.
- (129) Harris, C. R.; Millman, K. J.; van der Walt, S. J.; Gommers, R.; Virtanen, P.; Cournapeau, D.; Wieser, E.; Taylor, J.; Berg, S.; Smith, N. J.; Kern, R.; Picus, M.; Hoyer, S.; van Kerkwijk, M. H.; Brett, M.; Haldane, A.; del Río, J. F.; Wiebe, M.; Peterson, P.; Gérard-Marchant, P.; Sheppard, K.; Reddy, T.; Weckesser, W.; Abbasi, H.; Gohlke, C.; Oliphant, T. E. Array Programming with NumPy. *Nature* **2020**, *585* (7825), 357–362. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>.
- (130) Nearing, J. T.; Douglas, G. M.; Comeau, A. M.; Langille, M. G. I. Denoising the Denoisers: An Independent Evaluation of Microbiome Sequence Error-Correction Approaches. *PeerJ* **2018**, *2018* (8). <https://doi.org/10.7717/peerj.5364>.
- (131) Katoh, K.; Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* **2013**, *30* (4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- (132) Price, M. N.; Dehal, P. S.; Arkin, A. P. FastTree 2—Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS One* **2010**, *5* (3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>.
- (133) Kruskal, W. H.; Wallis, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* **1952**, *47* (260), 583–621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>.
- (134) Anderson, M. J. A New Method for Non-parametric Multivariate Analysis of Variance. *Austral Ecol* **2001**, *26* (1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.
- (135) *scikit-learn: machine learning in Python — scikit-learn 1.3.2 documentation*. <https://scikit-learn.org/stable/> (accessed 2023-10-31).
- (136) Jiang, P.; Zheng, W.; Sun, X.; Jiang, G.; Wu, S.; Xu, Y.; Song, S.; Ai, C. Sulfated Polysaccharides from *Undaria Pinnatifida* Improved High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome, Gut Microbiota Dysbiosis and Inflammation in BALB/c Mice. *Int J Biol Macromol* **2021**, *167*, 1587–1597. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.116>.
- (137) Wu, T.-Y.; Tsai, S.-J.; Sun, N.-N.; Dai, F.-J.; Yu, P.-H.; Chen, Y.-C.; Chau, C.-F. Enhanced Thermal Stability of Green Banana Starch by Heat-Moisture Treatment and Its Ability to Reduce Body Fat Accumulation and Modulate Gut Microbiota. *Int J Biol Macromol* **2020**, *160*, 915–924. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.271>.
- (138) He, N.; Wang, S.; Lv, Z.; Zhao, W.; Li, S. Low Molecular Weight Chitosan Oligosaccharides (LMW-COSs) Prevent Obesity-Related Metabolic Abnormalities in Association with the Modification of Gut Microbiota in High-Fat Diet (HFD)-Fed Mice. *Food Funct* **2020**, *11* (11), 9947–9959. <https://doi.org/10.1039/d0fo01871f>.
- (139) Zhang, Z.; Liu, H.; Yu, B.; Tao, H.; Li, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Yuan, C.; Guo, L.; Cui, B. *Lycium Barbarum* Polysaccharide Attenuates Myocardial Injury in High-Fat Diet-Fed Mice through Manipulating the Gut Microbiome and Fecal Metabolome. *Food Research International* **2020**, *138* (PB), 109778. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109778>.

- (140) Cui, F.; Shi, C.; Zhou, X.; Wen, W.; Gao, X.; Wang, L.; He, B.; Yin, M.; Zhao, J. Lycium Barbarum Polysaccharide Extracted from Lycium Barbarum Leaves Ameliorates Asthma in Mice by Reducing Inflammation and Modulating Gut Microbiota. *2020*, *23* (7), 1–12. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4544>.
- (141) Borewicz, K.; Gu, F.; Saccenti, E.; Arts, I. C. W.; Penders, J.; Thijs, C.; van Leeuwen, S. S.; Lindner, C.; Nauta, A.; van Leusen, E.; Schols, H. A.; Smidt, H. Correlating Infant Fecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of 1-Month-Old Breastfed Infants. *Mol Nutr Food Res* **2019**, *63* (13), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801214>.
- (142) Borewicz, K.; Gu, F.; Saccenti, E.; Hechler, C. The Association between Breastmilk Oligosaccharides and Faecal Microbiota in Healthy Breastfed Infants at Two , Six , and Twelve Weeks of Age. *Sci Rep* **2020**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61024-z>.
- (143) Zheng, H.; Perreau, J.; Elijah Powell, J.; Han, B.; Zhang, Z.; Kwong, W. K.; Tringe, S. G.; Moran, N. A. Division of Labor in Honey Bee Gut Microbiota for Plant Polysaccharide Digestion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116* (51), 25909–25916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916224116>.
- (144) Hughes, R. A.; Ali, R. A.; Mendoza, M. A.; Hassan, H. M.; Koci, M. D. Impact of Dietary Galacto-Oligosaccharide (GOS) on Chicken’s Gut Microbiota, Mucosal Gene Expression, and Salmonella Colonization. *Front Vet Sci* **2017**, *4* (NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00192>.
- (145) Chen, P.; Yang, S.; Hu, C.; Zhao, Z.; Liu, J.; Cheng, Y.; Wang, S.; Chen, Q.; Yu, P.; Zhang, X.; Wu, M. Sargassum Fusiforme Polysaccharide Rejuvenat Es the Small Intestine in Mice Through Altering Its Physiol Ogy and Gut Microbiota Composition. *Curr Mol Med* **2017**, *17* (5). <https://doi.org/10.2174/1566524018666171205115516>.
- (146) Zhang, X.; Zhang, N.; Kan, J.; Sun, R.; Tang, S.; Wang, Z.; Chen, M.; Liu, J.; Jin, C. Anti-Inflammatory Activity of Alkali-Soluble Polysaccharides from *Arctium Lappa* L. and Its Effect on Gut Microbiota of Mice with Inflammation. *Int J Biol Macromol* **2020**, *154*, 773–787. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.111>.
- (147) Pi, Y.; Mu, C.; Gao, K.; Liu, Z.; Peng, Y.; Zhu, W. Increasing the Hindgut Carbohydrate/Protein Ratio by Cecal Infusion of Corn Starch or Casein Hydrolysate Drives Gut Microbiota-Related Bile Acid Metabolism To Stimulate Colonic Barrier Function. *mSystems* **2020**, *5* (3), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00176-20>.
- (148) Zhu, W.; Zhou, S.; Liu, J.; McLean, R. J. C.; Chu, W. Prebiotic, Immuno-Stimulating and Gut Microbiota-Modulating Effects of Lycium Barbarum Polysaccharide. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2020**, *121* (September 2019), 109591. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109591>.
- (149) Chijiwa, R.; Hosokawa, M.; Kogawa, M.; Nishikawa, Y.; Ide, K.; Sakanashi, C.; Takahashi, K.; Takeyama, H. Single-Cell Genomics of Uncultured Bacteria Reveals Dietary Fiber Responders in the Mouse Gut Microbiota. *bioRxiv* **2019**, 1–14. <https://doi.org/10.1101/784801>.
- (150) Ji, D.; Lu, T. The Anti-Colitis Effect of Schisandra Chinensis Polysaccharide Is Associated With the Regulation of the Composition and Metabolism of Gut Microbiota. **2020**, *10* (October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.519479>.
- (151) Do, M. H.; Lee, H. Bin; Lee, E.; Park, H. Y. The Effects of Gelatinized Wheat Starch and High Salt Diet on Gut Microbiota and Metabolic Disorder. *Nutrients* **2020**, *12* (2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu12020301>.
- (152) Yan, S.; Shi, R.; Li, L.; Ma, S.; Zhang, H.; Ye, J.; Wang, J.; Pan, J.; Wang, Q.; Jin, X.; Liu, X.; Liu, Z. Mannan Oligosaccharide Suppresses Lipid Accumulation and Appetite in Western-Diet-Induced Obese Mice Via Reshaping Gut Microbiome and Enhancing

- Short-Chain Fatty Acids Production. *Mol Nutr Food Res* **2019**, *63* (23), 1900521. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900521>.
- (153) Kaur, A.; Chen, T.; Green, S. J.; Mutlu, E.; Martin, B. R.; Rumpagaporn, P.; Patterson, J. A.; Keshavarzian, A.; Hamaker, B. R. Physical Inaccessibility of a Resistant Starch Shifts Mouse Gut Microbiota to Butyrogenic Firmicutes. *Mol Nutr Food Res* **2019**, *63* (7), 1–8. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801012>.
- (154) Zhu, Z.; Zhu, B.; Sun, Y.; Ai, C.; Wu, S.; Wang, L.; Song, S.; Liu, X. Sulfated Polysaccharide from Sea Cucumber Modulates the Gut Microbiota and Its Metabolites in Normal Mice. *Int J Biol Macromol* **2018**, *120*, 502–512. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.098>.
- (155) Nakata, T.; Kyoui, D.; Takahashi, H.; Kimura, B.; Kuda, T. Inhibitory Effects of Soybean Oligosaccharides and Water-Soluble Soybean Fibre on Formation of Putrefactive Compounds from Soy Protein by Gut Microbiota. *Int J Biol Macromol* **2017**, *97*, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.015>.
- (156) Chang, S.; Cui, X.; Guo, M.; Tian, Y.; Xu, W.; Huang, K.; Zhang, Y. Insoluble Dietary Fiber from Pear Pomace Can Prevent High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats Mainly by Improving the Structure of the Gut Microbiota. *J Microbiol Biotechnol* **2017**, *27* (4), 856–867. <https://doi.org/10.4014/jmb.1610.10058>.
- (157) Ye, J.; Wang, X.; Wang, K.; Deng, Y.; Yang, Y.; Ali, R.; Chen, F.; Wu, Z.; Liao, W.; Mao, L. A Novel Polysaccharide Isolated from *Flammulina Velutipes*, Characterization, Macrophage Immunomodulatory Activities and Its Impact on Gut Microbiota in Rats. **2020**, No. November 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1111/jpn.13290>.
- (158) Chen, R.; Liu, B.; Wang, X.; Chen, K.; Zhang, K.; Zhang, L.; Fei, C.; Wang, C.; Liu, Y.; Xue, F.; Gu, F.; Wang, M. Effects of Polysaccharide from *Pueraria Lobata* on Gut Microbiota in Mice. *Int J Biol Macromol* **2020**, *158*, 740–749. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.201>.
- (159) Huo, W.; Feng, Z.; Hu, S.; Cui, L.; Qiao, T.; Dai, L.; Qi, P.; Zhang, L.; Liu, Y.; Li, J. Effects of Polysaccharides from Wild Morels on Immune Response and Gut Microbiota Composition in Non-Treated and Cyclophosphamide-Treated Mice. *Food Funct* **2020**, *11* (5), 4291–4303. <https://doi.org/10.1039/d0fo00597e>.
- (160) Wu, T.; Shen, M.; Yu, Q.; Chen, Y.; Chen, X.; Yang, J.; Huang, L.; Guo, X.; Xie, J. Cyclocarya paliurus Polysaccharide Improves Metabolic Function of Gut Microbiota by Regulating Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Composition. *Food Research International* **2021**, *141* (235), 110119. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110119>.
- (161) Liu, M.; Li, X.; Zhou, S.; Wang, T. T. Y.; Zhou, S.; Yang, K.; Li, Y.; Tian, J.; Wang, J. Dietary Fiber Isolated from Sweet Potato Residues Promotes a Healthy Gut Microbiome Profile. *Food Funct* **2020**, *11* (1), 689–699. <https://doi.org/10.1039/C9FO01009B>.
- (162) Chen, Y.; Jin, L.; Li, Y.; Xia, G.; Chen, C.; Zhang, Y. Bamboo-Shaving Polysaccharide Protects against High-Diet Induced Obesity and Modulates the Gut Microbiota of Mice. *J Funct Foods* **2018**, *49* (July), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.015>.
- (163) Zheng, J.; Cheng, G.; Li, Q.; Jiao, S.; Feng, C.; Zhao, X. Chitin Oligosaccharide Modulates Gut Microbiota and Attenuates High-Fat-Diet-Induced Metabolic Syndrome in Mice. <https://doi.org/10.3390/md16020066>.
- (164) Tang, C.; Sun, J.; Zhou, B.; Jin, C.; Liu, J.; Kan, J.; Qian, C.; Zhang, N. Effects of Polysaccharides from Purple Sweet Potatoes on Immune Response and Gut Microbiota

- Composition in Normal and Cyclophosphamide Treated Mice. *Food Funct* **2018**, *9* (2), 937–950. <https://doi.org/10.1039/c7fo01302g>.
- (165) Tian, G.; Wu, X.; Chen, D.; Yu, B.; He, J. Adaptation of Gut Microbiome to Different Dietary Non-Starch Polysaccharide Fractions in a Porcine Model. **2017**, 1–43. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700012>.
- (166) Higashimura, Y.; Baba, Y.; Inoue, R.; Takagi, T.; Mizushima, K.; Ohnogi, H.; Honda, A.; Matsuzaki, Y.; Naito, Y. Agar-Oligosaccharides Regulate Gut Microbiota and Adipose Tissue Accumulation in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **2017**, *63* (4), 269–276. <https://doi.org/10.3177/jnsv.63.269>.
- (167) Ferrario, C.; Statello, R.; Carnevali, L.; Mancabelli, L.; Milani, C.; Mangifesta, M.; Duranti, S.; Lugli, G. A.; Jimenez, B.; Lodge, S.; Viappiani, A.; Alessandri, G.; Asta, M. D.; Rio, D. Del; Sgoifo, A.; Sinderen, D. Van; Ventura, M.; Turrone, F. How to Feed the Mammalian Gut Microbiota : Bacterial and Metabolic Modulation by Dietary Fibers. **2017**, *8* (September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01749>.
- (168) Ou, J.; Huang, J.; Song, Y.; Yao, S.; Peng, X. Feruloylated Oligosaccharides from Maize Bran Modulated the Gut Microbiota in Rats. *Plant Foods for Human Nutrition* **2016**. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0547-4>.
- (169) Zhou, S.; Xu, J.; Zhu, H.; Wu, J.; Xu, J.; Yan, R.; Li, X. Gut Microbiota-Involved Mechanisms in Enhancing Systemic Exposure of Ginsenosides by Coexisting Polysaccharides in Ginseng Decoction. *Nature Publishing Group* **2016**, No. September 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep22474>.
- (170) Monteagudo-Mera, A.; Arthur, J. C.; Jobin, C.; Keku, T.; Bruno-Barcena, J. M.; Azcarate-Peril, M. A. High Purity Galacto-Oligosaccharides Enhance Specific Bifidobacterium Species and Their Metabolic Activity in the Mouse Gut Microbiome. *Benef Microbes* **2016**, *7* (2), 247–264. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0114>.
- (171) Zhong, L.; Ma, N.; Zheng, H.; Ma, G.; Zhao, L.; Hu, Q. Tuber Indicum Polysaccharide Relieves Fatigue by Regulating Gut Microbiota in Mice. *J Funct Foods* **2019**, *63* (April), 103580. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103580>.
- (172) Reimer, R. A.; Soto-Vaca, A.; Nicolucci, A. C.; Mayengbam, S.; Park, H.; Madsen, K. L.; Menon, R.; Vaughan, E. E. Effect of Chicory Inulin-Type Fructan-Containing Snack Bars on the Human Gut Microbiota in Low Dietary Fiber Consumers in a Randomized Crossover Trial. *American Journal of Clinical Nutrition* **2020**, *111* (6), 1286–1296. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa074>.
- (173) Bush, J. R.; Alfa, M. J. Increasing Levels of Parasutterella in the Gut Microbiome Correlate with Improving Low-Density Lipoprotein Levels in Healthy Adults Consuming Resistant Potato Starch during a Randomised Trial. *BMC Nutr* **2020**, *6* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40795-020-00398-9>.
- (174) Alfa, M. J.; Strang, D.; Tappia, P. S.; Graham, M.; Van Domselaar, G.; Forbes, J. D.; Laminman, V.; Olson, N.; DeGagne, P.; Bray, D.; Murray, B. L.; Dufault, B.; Lix, L. M. A Randomized Trial to Determine the Impact of a Digestion Resistant Starch Composition on the Gut Microbiome in Older and Mid-Age Adults. *Clinical Nutrition* **2018**, *37* (3), 797–807. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.025>.
- (175) Vital, M.; Howe, A.; Bergeron, N.; Krauss, R. M.; Jansson, J. K.; Tiedje, J. M. Metagenomic Insights into the Degradation of Resistant Starch by Human Gut Microbiota. *Appl Environ Microbiol* **2018**, *84* (23), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.01562-18>.
- (176) Kiewiet, M. B. G.; Elderman, M. E.; El Aidy, S.; Burgerhof, J. G. M.; Visser, H.; Vaughan, E. E.; Faas, M. M.; de Vos, P. Flexibility of Gut Microbiota in Ageing Individuals during Dietary Fiber Long-Chain Inulin Intake. *Mol Nutr Food Res* **2021**, *65* (4), 1–10. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000390>.

- (177) Hughes, R. L.; Horn, W. H.; Finnegan, P.; Newman, J. W.; Marco, M. L.; Keim, N. L.; Kable, M. E. Resistant Starch Type 2 from Wheat Reduces Postprandial Glycemic Response with Concurrent Alterations in Gut Microbiota Composition. *Nutrients* **2021**, *13* (2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nu13020645>.
- (178) Zhang, L.; Ouyang, Y.; Li, H.; Shen, L.; Ni, Y.; Fang, Q.; Wu, G.; Qian, L.; Xiao, Y.; Zhang, J.; Yin, P. Metabolic Phenotypes and the Gut Microbiota in Response to Dietary Resistant Starch Type 2 in Normal- Weight Subjects : A Randomized Crossover Trial. **2019**, No. April 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38216-9>.
- (179) Healey, G.; Murphy, R.; Butts, C.; Brough, L.; Whelan, K.; Coad, J. Habitual Dietary Fibre Intake Influences Gut Microbiota Response to an Inulin-Type Fructan Prebiotic: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-over, Human Intervention Study. *British Journal of Nutrition* **2018**, *119* (2), 176–189. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003440>.
- (180) Maier, T. V.; Lucio, M.; Lee, L. H.; Verberkmoes, N. C.; Brislaw, C. J.; Bernhardt, J.; Lamendella, R.; McDermott, J. E.; Bergeron, N.; Heinzmann, S. S.; Morton, J. T.; González, A.; Ackermann, G.; Knight, R.; Riedel, K.; Krauss, R. M.; Schmitt-Kopplin, P.; Jansson, J. K. Impact of Dietary Resistant Starch on the Human Gut Microbiome, Metaproteome, and Metabolome. *mBio* **2017**, *8* (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01343-17>.
- (181) Tanes, C.; Bittinger, K.; Gao, Y.; Friedman, E. S.; Nessel, L.; Paladhi, U. R.; Chau, L.; Panfen, E.; Fischbach, M. A.; Braun, J.; Xavier, R. J.; Clish, C. B.; Li, H.; Bushman, F. D.; Lewis, J. D.; Wu, G. D. Role of Dietary Fiber in the Recovery of the Human Gut Microbiome and Its Metabolome. *Cell Host Microbe* **2021**, *29* (3), 394-407.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.12.012>.
- (182) Bendiks, Z. A.; Knudsen, K. E. B.; Keenan, M. J.; Marco, M. L. ScienceDirect Conserved and Variable Responses of the Gut Microbiome to Resistant Starch Type 2. *Nutrition Research* **2020**, *77*, 12–28. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.02.009>.
- (183) Setny, P.; Baron, R.; McCammon, J. A. How Can Hydrophobic Association Be Enthalpy Driven? *J Chem Theory Comput* **2010**, *6* (9), 2866–2871. <https://doi.org/10.1021/ct1003077>.
- (184) Zhang, X.; Yang, H.; Zheng, J.; Jiang, N.; Sun, G.; Bao, X.; Lin, A.; Liu, H. Chitosan Oligosaccharides Attenuate Loperamide-Induced Constipation through Regulation of Gut Microbiota in Mice. *Carbohydr Polym* **2020**, No. September, 117218. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117218>.
- (185) Zhang, X.; Dong, L.; Jia, X.; Liu, L.; Chi, J.; Huang, F.; Ma, Q.; Zhang, M.; Zhang, R. Bound Phenolics Ensure the Antihyperglycemic Effect of Rice Bran Dietary Fiber in *Db / Db* Mice via Activating the Insulin Signaling Pathway in Skeletal Muscle and Altering Gut Microbiota. *J Agric Food Chem* **2020**, *68* (15), 4387–4398. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00584>.
- (186) Linetzky Waitzberg, D.; Alves Pereira, C. C.; Logullo, L.; Manzoni Jacintho, T.; Almeida, D.; Teixeira da Silva, M. L.; Matos de Miranda Torrinhas, R. S. Microbiota Benefits after Inulin and Partially Hydrolyzed Guar Gum Supplementation: A Randomized Clinical Trial in Constipated Women. *Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral* **2012**.
- (187) Gotteland, M.; Riveros, K.; Gasaly, N.; Carcamo, C.; Magne, F.; Liabeuf, G.; Beattie, A.; Rosenfeld, S. The Pros and Cons of Using Algal Polysaccharides as Prebiotics. *Front Nutr* **2020**, *7* (September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00163>.

- (188) Baffert, C.; Kpebe, A.; Avilan, L.; Brugna, M. Hydrogenases and H₂ Metabolism in Sulfate-Reducing Bacteria of the *Desulfovibrio* Genus. *Adv Microb Physiol* **2019**, *74*, 143–189. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.03.001>.
- (189) Martínez, I.; Stegen, J. C.; Maldonado-Gómez, M. X.; Eren, M. A.; Siba, P. M.; Greenhill, A. R.; Walter, J. The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes. *Cell Rep* **2015**, *11* (4), 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.049>.
- (190) De Filippis, F.; Pellegrini, N.; Vannini, L.; Jeffery, I. B.; La Storia, A.; Laghi, L.; I Serrazanetti, D.; Di Cagno, R.; Ferrocino, I.; Lazzi, C.; Turrone, S.; Cocolin, L.; Brigidi, P.; Neviani, E.; Gobbetti, M.; O'Toole, P. W.; Ercolini, D. High-Level Adherence to a Mediterranean Diet Beneficially Impacts the Gut Microbiota and Associated Metabolome. *Gut* **2016**, *65* (11), 1812–1821. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>.
- (191) Pedersen, H. K.; Gudmundsdottir, V.; Nielsen, H. B.; Hyotylainen, T.; Nielsen, T.; Jensen, B. A. H.; Forslund, K.; Hildebrand, F.; Prifti, E.; Falony, G.; Le Chatelier, E.; Levenez, F.; Doré, J.; Mattila, I.; Plichta, D. R.; Pöhö, P.; Hellgren, L. I.; Arumugam, M.; Sunagawa, S.; Vieira-Silva, S.; Jørgensen, T.; Holm, J. B.; Trošt, K.; Kristiansen, K.; Brix, S.; Raes, J.; Wang, J.; Hansen, T.; Bork, P.; Brunak, S.; Oresic, M.; Ehrlich, S. D.; Pedersen, O. Human Gut Microbes Impact Host Serum Metabolome and Insulin Sensitivity. *Nature* **2016**, *535* (7612), 376–381. <https://doi.org/10.1038/nature18646>.
- (192) Scher, J. U.; Sczesnak, A.; Longman, R. S.; Segata, N.; Ubeda, C.; Bielski, C.; Rostron, T.; Cerundolo, V.; Pamer, E. G.; Abramson, S. B.; Huttenhower, C.; Littman, D. R. Expansion of Intestinal *Prevotella* Copri Correlates with Enhanced Susceptibility to Arthritis. *Elife* **2013**, *2*, 1–20. <https://doi.org/10.7554/elife.01202>.
- (193) Larsen, J. M. The Immune Response to *Prevotella* Bacteria in Chronic Inflammatory Disease. *Immunology* **2017**, *151* (4), 363–374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>.
- (194) Dillon, S. M.; Lee, E. J.; Kotter, C. V.; Austin, G. L.; Gianella, S.; Siewe, B.; Smith, D. M.; Landay, A. L.; McManus, M. C.; Robertson, C. E.; Frank, D. N.; McCarter, M. D.; Wilson, C. C. Gut Dendritic Cell Activation Links an Altered Colonic Microbiome to Mucosal and Systemic T-Cell Activation in Untreated HIV-1 Infection. *Mucosal Immunol* **2016**, *9* (1), 24–37. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.33>.
- (195) Larsen, N.; Vogensen, F. K.; Van Den Berg, F. W. J.; Nielsen, D. S.; Andreasen, A. S.; Pedersen, B. K.; Al-Soud, W. A.; Sørensen, S. J.; Hansen, L. H.; Jakobsen, M. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS One* **2010**, *5* (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>.
- (196) Shin, N. R.; Whon, T. W.; Bae, J. W. Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota. *Trends Biotechnol* **2015**, *33* (9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
- (197) Zhang, C.; Zhang, M.; Pang, X.; Zhao, Y.; Wang, L.; Zhao, L. Structural Resilience of the Gut Microbiota in Adult Mice under High-Fat Dietary Perturbations. *ISME Journal* **2012**, *6* (10), 1848–1857. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.27>.
- (198) Wang, J.; Tang, H.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Derrien, M.; Rocher, E.; van-Hylckama Vlieg, J. E.; Strissel, K.; Zhao, L.; Obin, M.; Shen, J. Modulation of Gut Microbiota during Probiotic-Mediated Attenuation of Metabolic Syndrome in High Fat Diet-Fed Mice. *ISME J* **2015**, *9* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.99>.
- (199) Everard, A.; Lazarevic, V.; Gaïa, N.; Johansson, M.; Ståhlman, M.; Backhed, F.; Delzenne, N. M.; Schrenzel, J.; François, P.; Cani, P. D. Microbiome of Prebiotic-Treated Mice Reveals Novel Targets Involved in Host Response during Obesity. *ISME Journal* **2014**, *8* (10), 2116–2130. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.45>.

- (200) Everard, A.; Lazarevic, V.; Derrien, M.; Girard, M.; Muccioli, G. M.; Neyrinck, A. M.; Possemiers, S.; Van Holle, A.; François, P.; De Vos, W. M.; Delzenne, N. M.; Schrenzel, J.; Cani, P. D. Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice. *Diabetes* **2011**, *60* (11), 2775–2786. <https://doi.org/10.2337/db11-0227>.
- (201) Ridaura, V. K.; Faith, J. J.; Rey, F. E.; Cheng, J.; Duncan, A. E.; Kau, A. L.; Griffin, N. W.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Bain, J. R.; Muehlbauer, M. J.; Ilkayeva, O.; Semenkovich, C. F.; Funai, K.; Hayashi, D. K.; Lyle, B. J.; Martini, M. C.; Ursell, L. K.; Clemente, J. C.; Van Treuren, W.; Walters, W. A.; Knight, R.; Newgard, C. B.; Heath, A. C.; Gordon, J. I. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science (1979)* **2013**, *341* (6150). <https://doi.org/10.1126/science.1241214>.
- (202) Zhang, X.; Shen, D.; Fang, Z.; Jie, Z.; Qiu, X.; Zhang, C.; Chen, Y.; Ji, L. Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS One* **2013**, *8* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>.
- (203) Tanida, M.; Shen, J.; Maeda, K.; Horii, Y.; Yamano, T.; Fukushima, Y.; Nagai, K. High-Fat Diet-Induced Obesity Is Attenuated by Probiotic Strain *Lactobacillus Paracasei* ST11 (NCC2461) in Rats. *Obes Res Clin Pract* **2008**, *2* (3), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2008.04.003>.
- (204) Naito, E.; Yoshida, Y.; Makino, K.; Kounoshi, Y.; Kunihiro, S.; Takahashi, R.; Matsuzaki, T.; Miyazaki, K.; Ishikawa, F. Beneficial Effect of Oral Administration of *Lactobacillus Casei* Strain Shirota on Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity Mice. *J Appl Microbiol* **2011**, *110* (3), 650–657. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04922.x>.
- (205) Chiu, Y. H.; Tsai, J. J.; Lin, S. L.; Lin, M. Y. *Lactobacillus Casei* MYL01 Modulates the Proinflammatory State Induced by Ethanol in an in Vitro Model. *J Dairy Sci* **2014**, *97* (4), 2009–2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7514>.
- (206) Mäkeläinen, H.; Saarinen, M.; Stowell, J.; Rautonen, N.; Ouwehand, A. C. Xylo-Oligosaccharides and Lactitol Promote the Growth of *Bifidobacterium Lactis* and *Lactobacillus* Species in Pure Cultures. *Benef Microbes* **2010**, *1* (2), 139–148. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0029>.
- (207) van den Elsen, L. W. J.; Tims, S.; Jones, A. M.; Stewart, A.; Stahl, B.; Garssen, J.; Knol, J.; Forbes-Blom, E. E.; van't Land, B. Prebiotic Oligosaccharides in Early Life Alter Gut Microbiome Development in Male Mice While Supporting Influenza Vaccination Responses. *Benef Microbes* **2019**, *10* (3), 279–291. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0098>.
- (208) Paganini, D.; Uyoga, M. A.; Kortman, G. A. M.; Cercamondi, C. I.; Moretti, D.; Barth-Jaeggi, T.; Schwab, C.; Boekhorst, J.; Timmerman, H. M.; Lacroix, C.; Karanja, S.; Zimmermann, M. B. Prebiotic Galacto-Oligosaccharides Mitigate the Adverse Effects of Iron Fortification on the Gut Microbiome: A Randomised Controlled Study in Kenyan Infants. *Gut* **2017**, *66* (11), 1956–1967. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314418>.
- (209) Zheng, J.; Li, H.; Zhang, X.; Jiang, M.; Luo, C.; Lu, Z.; Xu, Z.; Shi, J. Prebiotic Mannan-Oligosaccharides Augment the Hypoglycemic. *J Agric Food Chem* **2018**, *66*, 5821–5831. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00829>.
- (210) Su, H.; Chen, J.; Miao, S.; Deng, K.; Liu, J. Lotus Seed Oligosaccharides at Various Dosages with Prebiotic Activity Regulate Gut Microbiota and Relieve Constipation in Mice. **2019**, *134* (August). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110838>.
- (211) Binda, C.; Lopetuso, L. R.; Rizzatti, G.; Gibiino, G.; Cennamo, V.; Gasbarrini, A. Actinobacteria: A Relevant Minority for the Maintenance of Gut Homeostasis.

- Digestive and Liver Disease* **2018**, *50* (5), 421–428.
<https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>.
- (212) Sonnenburg, E. D.; Zheng, H.; Joglekar, P.; Higginbottom, S. K.; Firbank, S. J.; Bolam, D. N.; Sonnenburg, J. L. Specificity of Polysaccharide Use in Intestinal Bacteroides Species Determines Diet-Induced Microbiota Alterations. *Cell* **2010**, *141* (7), 1241–1252. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.005>.
- (213) Moens, F.; Weckx, S.; De Vuyst, L. Bifidobacterial Inulin-Type Fructan Degradation Capacity Determines Cross-Feeding Interactions between Bifidobacteria and Faecalibacterium Prausnitzii. *Int J Food Microbiol* **2016**, *231*, 76–85.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.015>.
- (214) Liu, X.; Mao, B.; Gu, J.; Wu, J.; Cui, S.; Wang, G.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. Blautia —a New Functional Genus with Potential Probiotic Properties? *Gut Microbes* **2021**, *13* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>.
- (215) Zafar, H.; Saier, M. H. Gut Bacteroides Species in Health and Disease. *Gut Microbes* **2021**, *13* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>.
- (216) Martin, O. C. B.; Olier, M.; Ellero-Simatós, S.; Naud, N.; Dupuy, J.; Huc, L.; Taché, S.; Graillot, V.; Levêque, M.; Bézirard, V.; Héliers-Toussaint, C.; Estrada, F. B. Y.; Tondereau, V.; Lippi, Y.; Naylies, C.; Peyriga, L.; Canlet, C.; Davila, A. M.; Blachier, F.; Ferrier, L.; Boutet-Robinet, E.; Guéraud, F.; Théodorou, V.; Pierre, F. H. F. Haem Iron Reshapes Colonic Luminal Environment: Impact on Mucosal Homeostasis and Microbiome through Aldehyde Formation. *Microbiome* **2019**.
<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0685-7>.
- (217) Chen, M.; Xiao, D.; Liu, W.; Song, Y.; Zou, B.; Li, L.; Li, P.; Cai, Y.; Liu, D.; Liao, Q.; Xie, Z. Intake of Ganoderma Lucidum Polysaccharides Reverses the Disturbed Gut Microbiota and Metabolism in Type 2 Diabetic Rats. *Int J Biol Macromol* **2020**, *155*, 890–902. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.047>.
- (218) Bishehsari, F.; Engen, P. A.; Preite, N. Z.; Tuncil, Y. E.; Naqib, A.; Shaikh, M.; Rossi, M.; Wilber, S.; Green, S. J.; Hamaker, B. R.; Khazaie, K.; Voigt, R. M.; Forsyth, C. B.; Keshavarzian, A. Dietary Fiber Treatment Corrects the Composition of Gut Microbiota, Promotes SCFA Production, and Suppresses Colon Carcinogenesis. *Genes (Basel)* **2018**, *9* (2), 102. <https://doi.org/10.3390/genes9020102>.
- (219) Lawley, B.; Tannock, G. W. Analysis of 16s rRNA Gene Amplicon Sequences Using the Qiime Software Package. *Methods in Molecular Biology* **2017**, *1537*, 153–163.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6685-1_9.
- (220) Tuncil, Y. E.; Thakkar, R. D.; Arioglu-Tuncil, S.; Hamaker, B. R.; Lindemann, S. R. Subtle Variations in Dietary-Fiber Fine Structure Differentially Influence the Composition and Metabolic Function of Gut Microbiota. *mSphere* **2020**, *5* (3), 1–6.
<https://doi.org/10.1128/msphere.00180-20>.
- (221) Tikhonov, M.; Leach, R. W.; Wingreen, N. S. Interpreting 16S Metagenomic Data without Clustering to Achieve Sub-OTU Resolution. *ISME Journal* **2015**.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.117>.
- (222) Callahan, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. J.; Han, A. W.; Johnson, A. J. A.; Holmes, S. P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat Methods* **2016**, *13* (7), 581. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- (223) Holmes, Z. C.; Silverman, J. D.; Dressman, H. K.; Wei, Z.; Dallow, E. P.; Armstrong, S. C.; Seed, P. C.; Rawls, J. F.; David, L. A. Short-Chain Fatty Acid Production by Gut Microbiota from Children with Obesity Is Linked to Bacterial Community Composition and Prebiotic Choice. *bioRxiv* **2020**, *11* (4), 1–15.
<https://doi.org/10.1101/2020.04.10.035808>.

- (224) Yao, Y.; Yan, L.; Chen, H.; Wu, N.; Wang, W.; Wang, D. Phytomedicine Cyclocarya Paliurus Polysaccharides Alleviate Type 2 Diabetic Symptoms by Modulating Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids. *Phytomedicine* **2020**, *77* (February), 153268. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153268>.
- (225) Long, C.; de Vries, S.; Venema, K. Polysaccharide Source Altered Ecological Network, Functional Profile, and Short-Chain Fatty Acid Production in a Porcine Gut Microbiota. *Benef Microbes* **2020**, *11* (6), 591–610. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0006>.
- (226) Huo, W.; Qi, P.; Cui, L.; Zhang, L.; Dai, L.; Liu, Y.; Hu, S.; Feng, Z. Polysaccharide from Wild Morels Alters the Spatial Structure of Gut Microbiota and the Production of Short-Chain Fatty Acids in Mice. **2021**, *39* (4), 219–226. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2020-018>.