



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Efecto modulador de la ingesta de amaranto sobre el
microbioma intestinal de niños en estado de malnutrición”.**

Tesis que presenta

M. en C. Oscar de Jesús Calva Cruz

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Mayo de 2024



Constancia de aprobación de la tesis

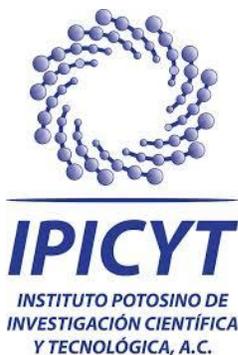
La tesis “**Efecto modulador de la ingesta de amaranto sobre el microbioma intestinal de niños en estado de malnutrición**” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Oscar de Jesús Calva Cruz** y aprobada el día _____ por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Dra. Ana María Estrada Sánchez
Miembro del comité tutorial

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del comité tutorial

Dr. Samuel Treviño Mora
Miembro del comité tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 706139 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El trabajo fue realizado con el apoyo otorgado por “Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social-CONAHCYT, proyecto No. A3-S-37825.

Acta de examen

Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por el espacio, tiempo y apoyo que me brindó en su laboratorio para desarrollar este proyecto.

A la Dra. Fabiola Veana del Instituto Nacional de México-Instituto Tecnológico de Ciudad Valles, las escuelas Rurales de Ciudad Valles-SLP, y a todos los padres de los niños participantes en este proyecto.

A mi comité tutorial: Dra. Ana María Estrada Sánchez, Dr. Samuel Treviño Mora y Dr. Antonio De León Rodríguez por sus críticas y revisión que ayudaron durante este proyecto.

A la Dr. Cesaré Ovado, por su guía y participación en el procesamiento de datos de bioinformática en general.

Al M.C. Alberto Barrera Pacheco y Al Dr. Jorge González Escobar, quienes fueron parte fundamental en el planteamiento y desarrollo de los experimentos, sin su constante apoyo este trabajo no hubiera sido posible. A Christian Iván Cano-Gómez y Lucero Medina-Contreras por su apoyo técnico.

A la M. en C. Nallely Badillo por su invaluable apoyo y cariño, una pieza fundamental desde el inicio de este proceso. Al Q.A. Irving Jiménez por su amistad durante tantos años.

A Dr. Esaú Bojórquez, Dr. Abraham Escobedo y Dr. Iván Takeshi Cerritos, que a través de la crítica siempre constructiva y amistad hicieron de la estancia en el laboratorio 2 una experiencia nutritiva, con una visión diferente.

A mis abuelos, mamá y hermanos quienes han sido un gran apoyo para que llegue sano hasta este punto.

A Centro Nacional de Supercómputo en el IPICYT, cuya infraestructura hizo posible el análisis de los datos aquí mostrados. Proyecto TKII-R2018-COV1.

A todo el personal del IPICYT que hace posible que el instituto funcione día a día. Al CONAHCYT, por el apoyo recibido.

A mis compañeros de laboratorio 2, por las buenas experiencias.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Índice de tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Clasificación, epidemiología y criterios diagnósticos de desnutrición.	1
1.2. Impacto del microbiota en la salud.	3
1.3. El papel del amaranto como nutracéutico en la dieta.	6
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo General	9
3.2 Objetivos particulares	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Reclutamiento de pacientes.	10
4.2. Diseño de la investigación.	10
4.3. Preparación del grano de amaranto reventado.	11
4.4. Desarrollo del ensayo.	12
4.5. Recolección de suero, citometría hemática y análisis de perfiles bioquímicos.	12
4.6. Recolección de muestras de heces.	12
4.7. Medición de ácidos grasos fecales de cadena corta (AGCC).	13
4.8. Extracción de ADN y verificación de integridad.	13
4.9. Secuenciación del gen ARNr 16S y análisis bioinformáticos.	14
4.10. Inferencia de variantes de secuencias de amplicones.	14
4.11. Cuantificación de la diversidad y predicción funcional.	15
4.12. Análisis estadísticos.	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1. Amaranto reventado como alimento mínimamente procesado.	17

5.2. Cuestionarios de selección de niños y condiciones de vida sociodemográficas.	17
5.3. Análisis bioquímico del suero.	18
5.4. Modulación de la microbiota intestinal en el grupo de niños con desnutrición posterior al consumo de amaranto.	21
5.5. Modulación observada en el microbioma intestinal a nivel de familia y género en niños con desnutrición después el consumo de amaranto.	28
5.6. Cambios en el filo <i>Firmicutes</i> a nivel de género y especie.	28
5.7. Cambios en el filo <i>Bacteroidetes</i> a nivel de género y especie.	31
5.8. Cambios en el filo <i>Verrucomicrobiota</i>.	32
5.9. El consumo de amaranto promueve metabolitos dependientes de la microbiota intestinal.	33
5.10. Predicción funcional de taxones bacterianos.	35
6. CONCLUSIONES	39
7. PERSPECTIVAS	41
8. REFERENCIAS	42
9. ANEXOS	51
10. PRODUCTOS	53

Índice de tablas

Tabla 1. Composición proximal del amaranto reventado (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>).	17
Tabla 2. Citometría hemática de la talla para la edad de los niños participantes según el índice HAZ.	20
Tabla 3. Perfil bioquímico sérico de los participantes.	21
ANEXOS	
Tabla Suplementaria 1. Factores sociodemográficos de los niños participantes que viven en comunidades rurales	51
Tabla Suplementaria 2. Análisis coproparasitológico de heces de los niños participantes.	52

Índice de Figuras

Figura 1	Diseño del estudio. El objetivo fue analizar el efecto de la suplementación de una dieta normal con amaranto sobre el microbioma intestinal de niños entre 6 y 7 años de zonas rurales.	11
Figura 2	Efectos del consumo de amaranto sobre la composición del microbioma en niños que habitan en áreas rurales.	23
Figura 3	Diferencia de la diversidad alfa entre los grupos de niños. Fisher, ACE (estimadores de cobertura basados en la abundancia) y valor de Simpson.	24
Figura 4	Efecto del consumo de amaranto en la composición del microbioma intestinal de niños que viven en zonas rurales. La diversidad beta se midió utilizando el análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la disimilitud de Bray Curtis.	25
Figura 5	(A) Abundancia relativa en el microbioma intestinal a nivel de filo; (B) Relación entre <i>Firmicutes</i> y <i>Bacteroidetes</i> (B/F).	27
Figura 6	Heatmap de los ASV diferenciales observados entre UN/Ctrl, grupo de desnutrición (UN) frente al grupo de control (Ctrl).	30
Figura 7	Niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en las muestras de heces de los niños.	34
Figura 8	Mapa de calor de las funciones predichas del microbioma intestinal por Tax4fun2 evaluadas según las diferencias en la vía de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).	36
Figura 9	Asociación entre taxones y rutas.	38

Resumen

Efecto modulador de la ingesta de amaranto sobre el microbioma intestinal de niños en estado de malnutrición.

El amaranto es reconocido como un alimento nutracéutico por tener proteínas de alta calidad debido a su composición de aminoácidos esenciales que cubre los requerimientos recomendados para niños y adultos, además de contener péptidos encriptados con diferentes funciones biológicas que promueven la salud del consumidor. Desde tiempos prehispánicos, el amaranto se ha consumido como grano reventado; proceso térmico que mejora su calidad nutritiva y la digestibilidad. El consumo de amaranto reventado se ha asociado con la recuperación de niños con desnutrición. Sin embargo, no hay información sobre el impacto que tiene el consumo de amaranto reventado sobre la composición del microbioma. En este trabajo, se realizó un ensayo piloto no aleatorizado para evaluar los cambios en la composición, estructura y función del microbioma intestinal de niños con retraso en el crecimiento que recibieron diariamente cuatro gramos de amaranto reventado durante tres meses. Se colectaron heces y suero al inicio y al final del ensayo. Se cuantificaron los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y se analizó la composición bacteriana intestinal mediante secuenciación del gen ribosomal *16S ARNr*. Los resultados de antropometría y hematología mostraron que los niños no presentaban patologías adicionales a la baja talla para su edad. Se observó que el consumo de amaranto llevó a una disminución de la abundancia relativa de las bacterias *Alistipes putredinis*, *Bacteroides coprocola* y *Bacteroides stercoris*, relacionadas con la inflamación y la colitis, y un aumento de la abundancia relativa de las bacterias *Akkermansia muciniphila* y *Streptococcus thermophiles*, asociadas con la salud y la longevidad. Los resultados demuestran que el amaranto reventado es un alimento nutritivo que ayuda a combatir la malnutrición infantil mediante la modulación del microbioma intestinal.

Palabras clave:

Secuenciación del ARNr 16S; malnutrición; amaranto reventado; microbiota intestinal; ácidos grasos de cadena corta.

Abstract

Modulatory effect of amaranth intake on the gut microbiome of malnourished children.

Amaranth has been recognized as a nutraceutical food because it contains high-quality proteins due to its adequate amino acid composition that covers the recommended requirements for children and adults. Since pre-Hispanic times, amaranth has been consumed as popped grain; the popping process improves its nutritive quality and digestibility. Popped amaranth consumption has been associated with the recovery of malnourished children. However, there is no information on the impact that popped amaranth consumption has on gut microbiota composition. A non-randomized pilot trial was conducted to evaluate the changes in composition, structure, and function of the gut microbiota of stunted children who received four grams of popped amaranth daily for three months. Stool and serum were collected at the beginning and the end of the trial. Short-chain fatty acids (SCFA) were quantified, and gut bacterial composition was analyzed by *16S rRNA* gene sequencing. Anthropometry and hematology results showed that children had no pathology other than low height-for-age. A decrease in the relative abundance of *Alistipes putredinis*, *Bacteroides coprocola*, and *Bacteroides stercoris* bacteria related to inflammation and colitis, and an increase in the relative abundance of *Akkermansia muciniphila* and *Streptococcus thermophiles* bacteria associated with health and longevity, was observed. The results demonstrate that popped amaranth is a nutritious food that helps to combat childhood malnutrition through gut microbiota modulation.

Key words:

16S rRNA sequencing; malnutrition; popped amaranth; gut microbiota; short-chain fatty acids.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Clasificación, epidemiología y criterios diagnósticos de desnutrición.

La malnutrición es un término usado para denominar todos los estados nutricionales inadecuados, incluidos desnutrición, sobrepeso u obesidad. Estos están caracterizados por un desbalance entre las calorías consumidas y gastadas [1]. En general, la malnutrición incluye signos y síntomas, como un retraso en el crecimiento y síntomas relacionados con deficiencias en vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales y proteínas [2]. Esta sección está enfocada en las causas y consecuencias de la desnutrición, un problema de salud pública importante en países en vías desarrollo [3].

La desnutrición se define como una ingesta deficiente de macro o micronutrientes y es un problema de salud pediátrico significativo. Es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en menores de cinco años. Existen cuatro sub-clasificaciones de la desnutrición: emaciación, retraso del crecimiento, bajo peso y la deficiencia de vitaminas y minerales. La emaciación se define como un bajo peso para la estatura, indica una reciente y severa pérdida de peso debido a una baja ingesta de alimentos o una enfermedad infecciosa e implica riesgo de muerte para el infante, sin embargo, es tratable [1].

La siguiente clasificación es el retraso del crecimiento que implica una baja estatura para la edad, causada por una desnutrición crónica o recurrente, una alimentación materna pobre o un cuidado deficiente en etapas tempranas de la vida. El padecer este tipo de desnutrición suele evitar que el infante pueda alcanzar su máximo potencial físico y cognitivo [4].

El diagnóstico de desnutrición implica un reconocimiento de los signos clínicos, pero la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto que el índice de masa corporal (IMC, ecuación 1) junto con valores como la longitud (en bebés), estatura o el valor Z. Específicamente, el valor Z es utilizado para clasificar el estado nutricional de los niños, el cual es una medida estadística que relaciona el índice de masa corporal de cada infante con las desviaciones estándar de las medias de un grupo poblacional específico, de esta forma los pondera, y así clasifica el estado

nutricional de los niños. Es decir, el valor Z representa el número de veces mayor o menor que es el IMC del sujeto comparado con la media población al que pertenece [5,6].

Índice de masa corporal $IMC = \frac{Peso (Kg)}{Altura (m)^2}$ Ecuación 1

En nutrición, el valor Z se calcula tomando en cuenta las relaciones del peso para la estatura, la estatura para la edad, y el peso para la edad, de esta forma puede determinar si el infante está en un estado de malnutrición y la gravedad de ésta [5,6].

Desde el 2007, el sitio web de la OMS cuenta con dos ligas de referencias sobre el crecimiento para niños y adolescentes: la primera para los patrones de crecimiento infantil de la OMS para 0-60 meses y segunda de 61 a 228 meses (5 a 19 años). De acuerdo con el valor Z de la OMS, la malnutrición es subclasificada como el retraso en el crecimiento cuando el cociente del peso con relación a la edad es bajo, específicamente dos desviaciones estándar por debajo de la media. Se considera bajo peso, cuando se encuentra más dos desviaciones estándar por debajo de la media en relación con la estatura. Cuando la estatura corresponde a la edad, se considera desnutrición moderada cuando el valor Z está entre 2 y 3 desviaciones estándar y es severa cuando cae por debajo de las 3 desviaciones estándar [7].

Estas medidas se utilizan para determinar la malnutrición de macronutrientes (relacionados con los hidratos de carbono, las proteínas y las grasas), sobre todo en niños. También se utilizan síntomas clínicos como la presencia o ausencia de edema bilateral para determinar la desnutrición y aunque los signos clínicos pueden indicar desnutrición por micronutrientes, las pruebas bioquímicas se utilizan para confirmar o determinar estas deficiencias específicas. Las pruebas evalúan los niveles de hemoglobina, ferritina en sangre y proteína fijadora de retinol, que son especialmente útiles en el diagnóstico de la desnutrición por micronutrientes [8].

A nivel mundial, el retraso en el crecimiento afecta al 27% de los menores de 5 cinco años en países de bajos o medios ingresos, sumando aproximadamente

170 millones de niños. El retraso en el crecimiento normalmente pasa desapercibido por las familias que habitan en comunidades donde la baja estatura es común ya que es asumida como “normal”. En países de bajos y medios ingresos, el retraso en el crecimiento es más prevalente que el bajo peso (bajo peso para la edad, 16%) o emaciación (9%). Esto probablemente se debe a que el aumento de la estatura es muy sensible a una dieta cualitativamente pobre y no solo a la cantidad de alimentos [9].

En nuestro país, al principio del milenio, el índice de bajo peso para la edad era de 21.5% que afortunadamente disminuyó para el 2006 hasta un 15.5%, esta tendencia se mantuvo sin cambio hasta el 2018 cuando disminuyó hasta un 14.2%. Específicamente para el nivel preescolar en poblaciones urbanas en el 2018 la prevalencia de baja estatura ascendía al 12.9%. Mientras que, en comunidades rurales la prevalencia ascendía hasta el 17.5% en el mismo año. Mas allá de estos datos, la información disponible es muy escasa en México. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) registra las cuatro regiones del país incluidas Norte, Centro, Ciudad de México y Sur. San Luis Potosí pertenece a la zona norte, en el cual para el 2012, la desnutrición era del 10.1%, pero incrementó a 13.6% para el 2018. En el mismo año, 19.3% de los niños menores de cinco años en zonas rurales presentaron desnutrición, comparados con el 15.4% de los niños de la misma edad en zona urbanas [10].

En otras palabras, 13 de cada 100 niños menores de cinco años poseen una baja estatura para su edad. Esta situación representa una problemática importante para su desarrollo, ya que hay un retraso tanto en el desarrollo motor como en el intelectual [11].

1.2. Impacto del microbiota en la salud.

La desnutrición es una enfermedad multifactorial, causada por factores como un deficiente sistema sanitario, falta de acceso a agua potable, una estimulación psicosocial inadecuada y una ingesta calórica o proteínica insuficiente.

Además de éstas, otra repercusión importante es la alteración en la composición de la población de microorganismos que se encuentran en un entorno específico,

conocido como microbiota. El desequilibrio de esta se denomina disbiosis. Entre sus consecuencias se encuentran la predisposición a las infecciones, el deterioro de la inmunidad y el empeoramiento de la desnutrición [12,13].

Según la United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF, por sus siglas en inglés) la ingesta alimentaria inadecuada y las enfermedades (como la diarrea) son las causas más comunes e inmediatas de la desnutrición infantil. Aunque el acceso inadecuado a una nutrición suficiente es la causa principal de la desnutrición, la alteración de la microbiota intestinal también ha sido implicado en esta condición [14]. Este concepto idea es reciente ya que hace unas décadas, las causas reconocidas de malnutrición eran la ingesta inadecuada de alimentos y la diarrea causada por infecciones entéricas, sugiriendo así que la malnutrición también es causada por cambios en la microbiota intestinal [15].

El tracto gastrointestinal humano alberga entre 10^{13} y 10^{14} bacterias, pero la densidad y la composición cambian en cada segmento anatómico (lengua, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso) compartimento. En el estómago de personas sanas, la carga bacteriana es relativamente baja, de 10^2 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, pero aumenta en el intestino delgado hasta 10^2 - 10^4 UFC/mL [16].

Sin embargo, las cantidades más altas (10^{12} UFC/mL) se han encontrado en el colon, donde las condiciones como pH 5.5 - 7, tiempo de tránsito lento y alta disponibilidad de nutrientes, son propicias para el crecimiento bacteriano [17]. Las bacterias del colon son principalmente anaerobias y participan en procesos metabólicos que se consideran beneficiosos para el huésped [18]. Por ejemplo, algunos microbios intestinales generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante la fermentación de carbohidratos no digeribles. Algunos de los beneficios de los AGCC son proporcionar energía a las células epiteliales y reducir el pH del lumen intestinal, lo que restringe el crecimiento de algunos patógenos [19]. También se ha informado de que estos AGCC ejercen efectos antiinflamatorios en el huésped [20]. Además, se ha observado que la microbiota intestinal desempeña un papel importante en la síntesis de las vitaminas K y B12 [21].

Existen evidencias de que la microbiota intestinal participa en la producción de metabolitos además de los AGCC, como ácidos biliares secundarios, triptófano e incluso neurotransmisores, que desempeñan un papel importante en la función de barrera intestinal y la señalización intestino-cerebro [22]. Tales beneficios han llevado a un creciente interés en el uso de prebióticos, probióticos y otras modificaciones dietéticas para modular la microbiota intestinal con el fin de mejorar la nutrición y la salud [23]. Haciendo una evaluación de los cambios de la microbiota intestinal a lo largo de la vida, iniciamos con los lactantes alimentados con leche materna, aquí la microbiota está dominada por *Bifidobacterium longum subsp. infants* [24]. Cuando se introducen en la dieta alimentos con altos niveles de proteínas y fibra, se provoca un cambio en el microbioma [25]. Después de este punto, algunas pruebas sugieren que, a los tres años, la microbiota intestinal asume una composición similar a la de los adultos. Sin embargo, otras pruebas señalan que estos cambios no ocurren hasta los cinco años [26,27]. Un enfoque de estudio de la microbiota es a través de la obtención de los genomas (también llamados metagenomas) de las bacterias que conforman este gran consorcio, esto permite tener la lista de las bacterias que la conforman, incluyendo aquellas que no son cultivables a esto se le denomina microbioma [28].

De Filippo et al. (2010), compararon el microbioma de dos poblaciones muy distintas, la primera proveniente de la zona rural de Burkina Faso y la segunda de una zona urbana de Italia. Este estudio reveló niveles más altos de *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* y más bajos de *Firmicutes* y *Proteobacteria* en los niños de zonas rurales comparado con aquellos de zonas urbanas. Los distintos microbiomas de los dos grupos de niños repercuten en su metabolismo y su salud; por ejemplo, la abundancia de *Actinobacterias* y *Bacteroidetes* podría maximizar la ingesta de energía mediante la generación de AGCC, generando un efecto antiinflamatorio [29].

Además, se ha informado que la relación entre un microbioma alterado y ciertas alteraciones subclínicas puede provocar retraso en el crecimiento incluso en ausencia de infecciones evidentes [30–32]. Lo cual propone que una de las causas del retraso del crecimiento son las malas condiciones sanitarias que provocan una

exposición crónica a patógenos ambientales, lo que da lugar a alteraciones subclínicas en la estructura y función del microbioma [33,34]

1.3. El papel del amaranto como nutraceutico en la dieta.

En una dieta occidental rica en alimentos procesados, fritos, ricos en azúcar, escasa en plantas, bajo contenido en fibra y alto en polifenoles puede conducir a una pérdida de diversidad y funciones microbianas, dejando espacio a patógenos oportunistas. Pruebas recientes han señalado que los patrones dietéticos y la forma de procesar los alimentos pueden afectar a la digestibilidad de los alimentos y a algunas propiedades del microbioma, como la composición y la riqueza de estructuras, entre otras [35–38]. Por otro lado, también se reconoce que llevar una dieta saludable puede modular positivamente las funciones del microbioma. Estos enfoques podrían conducir al descubrimiento de nuevos alimentos funcionales, entre ellos el amaranto, que podrían aportar posibles efectos sinérgicos de los componentes de la dieta sobre la salud general y la diversidad y composición de la microbiota.

El amaranto ha sido reconocido como un alimento nutraceutico porque contiene grandes cantidades de proteínas comparado con los cereales tradicionales, como el maíz, el trigo y el arroz, pero, sobre todo, por su alto valor nutritivo debido a su adecuada composición de aminoácidos, que cubre los requerimientos recomendados para niños y adultos [39]. Los granos de amaranto contienen varios péptidos con potenciales propiedades antidiabéticas, antihipertensivas y antioxidantes [40]. Son ricos en lípidos que contienen diversos esteroides, entre ellos tocoferoles que son una buena fuente de escualeno. Los granos de amaranto también son una buena fuente de minerales, como fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro, zinc, manganeso y selenio, y son ricos en vitaminas (B2, B6 y E), niacina y tiamina [39]. Desde tiempos prehispánicos se ha consumido el amaranto reventado, que es un alimento precocido con sabor a nuez [41]. Actualmente, el amaranto reventado puede considerarse un aperitivo alimenticio saludable mínimamente procesado debido a su alta calidad y cantidad de proteínas [42]. Comparado con otros productos alimenticios a base de plantas,

el procesamiento térmico no altera las propiedades del grano de amaranto, pero si aumenta la digestibilidad de sus nutrientes [43], mejora sus propiedades antioxidantes [44, 45] y reduce los compuestos nutricionalmente adversos, tales como taninos, lectinas e inhibidores de tripsina [43]. El consumo de granos de amaranto reventados se ha asociado a beneficios para la salud en humanos, incluida la recuperación de niños gravemente desnutridos [43, 46, 47].

2. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país la desnutrición ha tenido consecuencias en la morbilidad y mortalidad de los niños, así como en el rendimiento académico y la productividad laboral. Esto ha costado al país el 2.3% del PIB, equivalente a 28,800 millones de dólares al año. En el Estado de San Luis Potosí, la desnutrición es un problema de preocupación, principalmente en las zonas rurales, por lo tanto, es de interés de Servicios de Salud estatal implementar mejores estrategias en apoyo al combate de la desnutrición, como la promoción de la ingesta de alimentos con un buen perfil nutricional.

La microbiota intestinal ha pasado de ser un simple comensal que vive en el tracto gastrointestinal a ser un actor importante en relación con la salud humana y la disbiosis intestinal se ha relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades. Aunque pocos estudios han indicado la asociación de la microbiota con la malnutrición, la pregunta de cómo la estructura de la comunidad microbiana intestinal cambia con el estado nutricional permanece aún sin responder y sobre todo, no existe información respecto al perfil de la microbiota intestinal de niños Mexicanos.

Por lo tanto, la presente propuesta de investigación se enfoca a tratar un problema de salud Estatal con relación a la ingesta de alimentos de buena calidad nutricional como el amaranto y la relación con la microbiota intestinal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Analizar el efecto del consumo de amaranto sobre parámetros antropométricos, hematológicos, bioquímicos y del microbioma en niños con desnutrición crónica.

3.2 Objetivos particulares

Identificar la seguridad del consumo de amaranto como producto biológico.

Determinar los efectos suplementación dietética con amaranto reventado sobre la biometría hemática completa y los parámetros del perfil hepática, pancreática y renal.

Describir el perfil del microbioma asociado a niños con desnutrición y los cambios derivados del consumo de amaranto.

Cuantificar los ácidos grasos de cadena corta producto de la suplementación dietética con amaranto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reclutamiento de pacientes.

Se reclutaron niños y niñas de 6 a 7 años de las zonas rurales de San Antonio Huichimal, Lima y Vista Hermosa, que forma parte de la zona indígena llamada Tenek en Ciudad Valles, San Luis Potosí, S.L.P., México mediante un cribado basado en los siguientes criterios de inclusión y exclusión. Se excluyeron aquellos niños que tuvieran una enfermedad declarada o una enfermedad activa, y a los niños que habían tomado antibióticos durante los últimos tres meses. Se incluyeron 34 niños y se clasificaron en dos grupos: un grupo de control (Ctrl) que incluía a los que presentaban una estatura normal para la edad con una media de talla para la edad (Height-for-Age o HAZ, por sus siglas en inglés) $HAZ = -0.03 \pm 0.5$ (25 niños), un segundo grupo con niños con retraso del crecimiento o baja estatura para la edad ($HAZ < -2SD$) que incluyó a nueve niños. Posterior al reclutamiento en el estudio, el grupo de niños con desnutrición (grupo denominado “UN”) recibió la suplementación con amaranto (grupo denominado “UNA”). El peso corporal usado como criterio de inclusión se midió utilizando una báscula digital, con el infante vestido con ropa ligera y sin zapatos (precisión, 0.1 kg). La estatura se midió con un estadímetro microtoise de 2 metros sin zapatos (precisión: 0.1 cm).

Para identificar los factores relacionados con el estado de salud de los niños, se realizó una encuesta familiar. Los elementos de la encuesta incluían preguntas sobre el estatus socioeconómico, incluyendo el tipo de construcción de la vivienda, el acceso a servicios básicos, el tipo de alimentos consumidos regularmente, el tipo de cocina y los servicios de agua potable.

4.2. Diseño de la investigación.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de los Servicios de Salud de San Luis Potosí (referencia de aprobación: SLP/006-2018) y DIF-Ciudad Valles, San Luis Potosí. Este estudio se realizó de acuerdo con las normas y lineamientos aplicables de la Declaración de Helsinki, revisada en el año 2000. El consentimiento informado fue firmado por los niños participantes y sus padres o tutores legales. El ensayo se llevó a cabo del 13 de marzo de 2020 al 12 de enero de 2021. Los niños

con talla baja para la edad consumieron cuatro gramos diarios de amaranto reventado durante el desayuno por un periodo de tres meses. Se obtuvieron muestras de suero y heces de todos los participantes antes y después del ensayo. Las muestras de sangre se utilizaron para el análisis de química clínica y función hepática, mientras que las muestras de heces se utilizaron para análisis de AGCC y composición del microbioma. En la Figura 1 se muestra un esquema del diseño de la investigación.

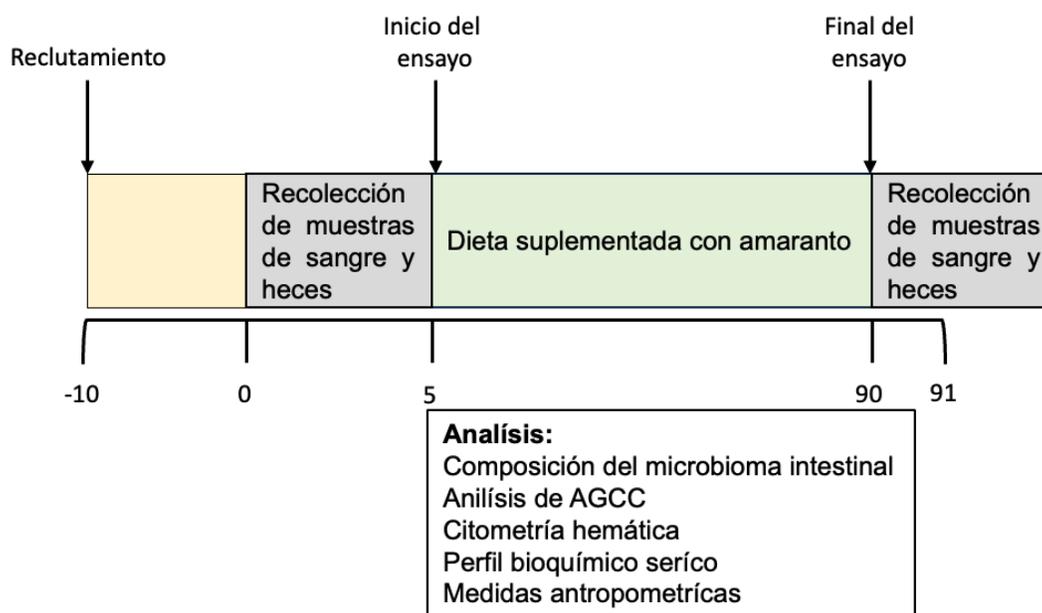


Figura 1. Diseño del estudio. El objetivo fue analizar el efecto de la suplementación de una dieta suplementada con amaranto sobre el microbioma intestinal de niños entre 6 y 7 años de zonas rurales.

4.3. Preparación del grano de amaranto reventado.

Las semillas fueron donadas por el Dr. Espitia-Rangel, perteneciente a la variedad *Amaranthus hypochondriacus*, las cuales se calentaron en una máquina *popper* industrial de lecho fluidizado con aire caliente (AmarantaR, San Miguel de Proyectos Agropecuarios, Hidalgo, México). Asegurando el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana (NOM-051-SCFI/SSA1-2010) para alimentos y bebidas para consumo humano. Los contenidos de proteína, grasa, fibra y cenizas se determinaron mediante métodos estándar [48]. El contenido de carbohidratos totales se calculó restando a 100 g las proteínas, grasas, cenizas y fibra [49].

4.4. Desarrollo del ensayo.

Durante el periodo de intervención, se supervisó la ingesta diaria de amaranto. Se recogieron muestras de sangre y heces en un periodo de 5 previo al inicio de la suplementación (grupo UN) y un día después de la administración por 90 días (grupo UNA) del estudio, respectivamente. Los resultados primarios fueron la composición del microbioma intestinal y los perfiles de AGCC, mientras que los resultados secundarios fueron los perfiles hemáticos y bioquímicos del suero.

4.5. Recolección de suero, citometría hemática y análisis de perfiles bioquímicos.

Las muestras de sangre (10 mL) fueron recolectadas en condiciones de ayuno siguiendo lo establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-016S-SA3-2012 [50]). Se recolectó la sangre en tubos BD Vacutainer. Estas muestras se centrifugaron a 400 \times g durante 10 min, el suero se separó y congeló a -70°C hasta su posterior análisis. La citometría hemática se realizó utilizando un sistema automático KontroLab Modelo 5H + (KontroLab Co. Ltd., Giudornia, Roma, Italia). Además, de cada muestra se extendió una gota de sangre en un portaobjetos de vidrio transparente y se tiñó con la tinción May-Grünwald-Giemsa para diferenciar los tipos de células sanguíneas, y se realizó un recuento aleatorio de 100 leucocitos utilizando un microscopio de campo claro Axio Imager-A2m (Carl Zeiss Microscopy, White Plains, NY, EE. UU.) con un aumento de 100X. Las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos, colesterol total, urea, ácido úrico, creatinina, proteínas totales, albúmina, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma-glutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALKP) y lactato deshidrogenasa (LDH) se determinaron por espectrofotometría utilizando kits comerciales (SPINREACT, Girona, España) y se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

4.6. Recolección de muestras de heces.

Para la recolección de muestras de heces, se indicó a los niños que orinaran primero para evitar la contaminación por orina. Posteriormente se colocó un orinal limpio en

el inodoro. Los niños fueron apoyados por sus padres y personal profesional capacitado que supervisó la recolección de las muestras. Inmediatamente después de la defecación, las muestras de heces se recogieron asépticamente en un recipiente estéril para heces y se transportaron al laboratorio utilizando bolsas de hielo, se tomaron alícuotas y se almacenaron inmediatamente a -70°C hasta su posterior procesamiento.

4.7. Medición de ácidos grasos fecales de cadena corta (AGCC).

De la muestra de heces se homogeneizó una alícuota de 250 mg en 1 mL de H_2SO_4 (0.5 mmol/L) y se mezcló a 1400 rpm durante 3 min (Thermomixer, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 20 min en un baño de agua helada y se centrifugaron a $4800 \times g$ durante 15 min a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a $13,000 \times g$ durante 15 min a 4°C . Este procedimiento se repitió dos veces con fines de clarificación. La muestra se filtró a través de un filtro Millipore de $0.22 \mu\text{m}$ (Merck, Darmstadt, Alemania) antes de inyectarla en el sistema cromatográfico. Los AGCC se analizaron utilizando un Agilent 1220 (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, EE. UU.) y una columna LC Rezex ROA de $150 \times 7.8 \text{ mm}$ (Phenomenex Inc., Torrance, CA, EE. UU.). La fase móvil consistió en H_2SO_4 (0.5 mM). La temperatura de la columna fue de 60°C , el caudal de 0.5 mL/min y la medición se realizó con un detector de índice de refracción RID-10A. Se realizaron curvas de calibración utilizando ácido acético de 0.18 a 1.8 mg/mL, ácido propiónico de 0.08 a 0.8 g/L y ácido butírico de 0.11 a 1.1 g/L.

4.8. Extracción de ADN y verificación de integridad.

Cada muestra de heces (250 μg) se diluyeron en 1300 μL de solución salina (0.85%) para eliminar los residuos gruesos. A continuación, se recogió la muestra decantada (600 μL) y se resuspendió en un tubo nuevo. A continuación, la suspensión se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de PBS frío y se centrifugó a $700 \times g$ a 4°C durante 1 min. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a $9000 \times g$ durante 5 min a 4°C . El pellet resultante se utilizó para la extracción de ADN siguiendo las especificaciones del

DNeasy UltraClean Microbial Kit de QIAGEN (Hilden, Alemania). El ADN se cuantificó en un NanoDrop One (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y la integridad se verificó mediante visualización en un gel de agarosa al 1% en un tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) durante 60 min a 70 voltios. Los extractos de ADN se almacenaron a -80°C hasta la secuenciación.

4.9. Secuenciación del gen ARNr 16S y análisis bioinformáticos.

Para el análisis del microbioma, la región V4-V5 del gen ARN ribosómico 16S se amplificó utilizando los cebadores bacterianos universales 515FB: 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 926R: 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'. Un total de 51 muestras fueron secuenciadas en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) utilizando 300 + 300 bp paired-ends según el protocolo descrito por Comeau. Las muestras se secuenciaron en el Integrated Microbiome Resource (IMR) (Dalhousie University, Halifax, NS, Canadá).

4.10. Inferencia de variantes de secuencias de amplicones.

Se utilizó el paquete R DADA2 v1.16.0 [51] para procesar los datos de secuenciación 16S. En el flujo de trabajo, las secuencias obtenidas se procesan a través de diversas funciones. Las funciones estándar, así como las condiciones típicas de análisis se muestran en el pipeline de DADA2 alojada en GitHub. En las múltiples funciones, el algoritmo a utilizar se declara e inmediatamente se realiza la apertura de paréntesis para especificar los argumentos de análisis y se cierran los paréntesis para proceder a ejecutar la función en cuestión. El análisis se efectuó de la siguiente manera: los datos se recortaron 20 nt a la derecha de los fragmentos hacia delante y 60 nt a la derecha de los fragmentos hacia atrás utilizando la función `filterAndTrim()` con parámetros por defecto para conocer las tasas de error. Se aplicó la función `dada()` para inferir la composición de la muestra utilizando los parámetros por defecto, los fragmentos filtrados y las tasas de error calculadas. Los fragmentos se fusionaron con la función `mergePairs()` y las quimeras con la función `removeBimeraDenovo()` con los parámetros por defecto. La taxonomía de cada secuencia se asignó mediante la función `assignTaxonomy()` y la base de datos

silva_nr99_v138. Se realizó la cuantificación de las variantes de la secuencia del amplicón (ASV) y la asignación filogenética.

4.11. Cuantificación de la diversidad y predicción funcional.

Se calcularon los índices de diversidad alfa, Shannon, inverso de Simpson, Fisher, Chao1 y ACE utilizando la función *diversity()* del paquete *R vegan v2.5.6* [52]. Para determinar la variación estructural de las comunidades microbianas, se generaron gráficos de diversidad beta y NMD con scripts R personalizados utilizando la disimilitud de BrayCurtis calculada con la función *ordinate()* del paquete *vegan*.

La predicción funcional de los datos de secuenciación 16S se realizó utilizando *Tax4Fun2* [53]. Se utilizaron las funciones *RunRefBlast()* y *makeFunctionalPrediction()* con parámetros por defecto para predecir los perfiles funcionales de los resultados de la cuantificación ASV. La referencia utilizada en ambos pasos, *runRefBlast* y *makeFunctionalPrediction*, es *RF99NR*. La tabla de predicción de vías (puntuaciones de vías por biblioteca) se utilizó para realizar el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA). Se utilizó la función *spls-da()* del paquete *mixOmics* de R con parámetros por defecto y *ncomp = 2* [54]. Los gráficos que representaban los resultados del análisis discriminante (DA) se generaron utilizando scripts R personalizados.

Utilizando taxones y rutas significativas, se crearon redes taxón-camino (prueba de permutación *spls-da*, 1000 permutaciones, valor $p < 0.1$). La correlación de Spearman entre dos nodos (taxones o rutas) se utilizó para identificar sus conexiones utilizando el paquete *igraph* R [55]. Sólo se utilizaron correlaciones superiores al percentil 30 para crear las redes.

4.12. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Prism 8.0 para Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). La distribución normal se comprobó mediante las pruebas de D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk. Se realizó un ANOVA de una vía para los datos con una distribución normal, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post-hoc

de Dunn, si los datos no tenían una distribución normal. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0.05 ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Amaranto reventado como alimento mínimamente procesado.

El *reventado* es un proceso tradicional que se lleva a cabo en México desde la época prehispánica. En esa época, el *reventado* se obtenía calentando los granos de amaranto durante 15-25 s en ollas de barro tapadas a 175 - 195°C, lo que producía la expansión de los granos [56,57]. Actualmente, el amaranto reventado se obtiene en una máquina industrial de lecho fluidizado de aire caliente a 300-330°C con 9 s de residencia; por lo tanto, el amaranto reventado podría considerarse un alimento mínimamente procesado. Bajo estas condiciones, el amaranto reventado mostró altos contenidos de proteína (15.8 %), grasa (6.7 %), fibra (3.8 %) y ceniza (2.2 %) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición proximal del amaranto reventado
(*Amaranthus hypochondriacus*).

Macronutriente	Grano reventado de amaranto (%)*
Proteínas	15.8 ±0.6
Lípidos	6.7 ±1.4
Fibra	3.8 ±0.9
Cenizas	2.2 ±0.3
Carbohidratos	63.4 ±3.9

*Medias de los triplicados ± desviación estándar

5.2. Cuestionarios de selección de niños y condiciones de vida sociodemográficas.

Los niños que mostraban desnutrición se clasificaron con retraso en el crecimiento según los parámetros de altura para la edad [58]. Como se menciona en materiales y métodos a este grupo de le denominó grupo de desnutrición (UN, n = 9) y se tomaron las muestras iniciales. Posteriormente, este grupo consumió cuatro gramos de amaranto reventado diariamente durante 3 meses. Al concluir este periodo de consumo se tomaron las muestras finales que en este estudio se le denominó Grupo UNA. Sin embargo, este ensayo coincidió con el inicio de la pandemia de COVID-

19 y dos niños abandonaron el estudio y el grupo UNA quedó con solo 7 integrantes. También el grupo control sufrió cuatro deserciones (Ctrl, n = 21), representado por niños de estatura normal para su edad que vivían en las mismas condiciones que el grupo UNA.

De acuerdo con los cuestionarios sociodemográficos realizado (Tabla Suplementaria 1), se identificó que los factores asociados con el estado de salud de los niños estaban relacionados con las condiciones de vida, entre ellas el uso de letrinas (no propiamente un cuarto de baño), el uso de leña como combustible en las cocinas y el dormitorio estuviera en el mismo lugar que la cocina en más de la mitad de los casos. La edad de la madre en el momento del nacimiento del niño oscilaba entre los 20 y los 24 años, y la mayoría había completado el bachillerato como máximo nivel de estudios.

En general, todos los niños tenían acceso a alimentos básicos como frijoles, arroz y tortillas. Sin embargo, mientras que los niños del grupo control comían tres veces al día, los niños con desnutrición mostraban poco apetito y consumían alimento una vez al día. Se detectaron otros problemas, como infecciones parasitarias, a través del análisis de las heces mediante microscopía por sedimentación. Se realizó la identificación de *Blastocystis sp*, *Giardia lamblia* y *Endolimax sp*. En las muestras obtenidas de los niños pertenecientes al grupo control, mientras que se identificó la presencia de *Entamoeba coli* en las muestras de niños con desnutrición (Tabla suplementaria 2) [58].

5.3. Análisis bioquímico del suero.

Los resultados de la citometría hemática de los niños participantes se muestran en la Tabla 2. Los valores basales de los participantes no indicaban la presencia de alguna patología además de la baja talla para la edad en el grupo con desnutrición.

Los parámetros de la citometría hemática (Tabla 2) estaban dentro de los límites biológicos, se observó que los valores de hematocrito y volumen globular medio (VCM) tendían a aumentar en los niños del grupo UNA en comparación con el grupo de control y al grupo UN. Los valores bajos de VCM se relacionan con la malnutrición proteico-energética o la deficiencia de hierro y folato [56]. Debido a que

el amaranto es una rica fuente de proteínas y contiene grandes cantidades de minerales como hierro, calcio y magnesio [39], ésta podría ser una de las razones de la tendencia observada de aumento de estos valores y un potencial promotor de mejora de la salud infantil (Tabla 2).

El perfil bioquímico sérico no reveló ningún hallazgo patológico. La función renal, evaluada mediante los niveles de creatinina, ácido úrico y urea, fue normal en todos los participantes. Los niveles de los biomarcadores de la función hepática (ALT y TGO) fueron normales. No se observaron cambios significativos en los niveles de colesterol, triglicéridos o lipoproteínas de alta densidad (HDL) entre los grupos (Tabla 3).

Tabla 2. Citometría hemática de la talla para la edad de los niños participantes según el índice HAZ.

Determinación	Normal	Desnutrición		Límites biológicos
	(n=21)	UN (n=9)	UNA (n=7)	
Valores eritrocitarios				
Eritrocitos (x 10 ⁶)	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.3 - 5.2
Hemoglobina (g/dL)	13.2 ± 0.1	13.2 ± 0.4	13.6 ± 0.3	12.5 – 15
Hematocrito (%)	40.7 ± 0.4	40.9 ± 0.9	42.4 ± 0.7	37.5 – 48
Volumen corpuscular medio MCV (fL)	83.6 ± 0.8	84.9 ± 0.9	89.7 ± 1.1	83 – 100
Hemoglobina corpuscular (pg)	27.1 ± 0.3	27.4 ± 0.6	28.9 ± 0.4	27 – 34.5
Concentración media de hemoglobina corpuscular (g/dL)	32.4 ± 0.2	32.3 ± 0.4	32.0 ± 0.2	32 – 34.5
Plaquetas				
Plaquetas (miles)	282 ± 15	338 ± 33	277 ± 35	150 - 400
Valores leucocitarios				
Leucocitos totales (x 10 ³)	7.6 ± 0.5	6.7 ± 0.6	6.0 ± 0.4	4.5 – 13.5
Neutrófilos totales (%)	57 ± 2	49 ± 3	49 ± 4	
Neutrófilos Segmentados (%)	57 ± 2	49 ± 3	49 ± 4	
Neutrófilos en banda (%)	0	0	0	
Metamielocitos (%)	0	0	0	
Mielocitos (%)	0	0	0	
Promielocitos (%)	0	0	0	
Blastos (%)	0	0	0	
Eosinófilos (%)	0	0	2 ± 1	
Basófilos (%)	0	0	1 ± 0	0 - 3
Monocitos (%)	3 ± 0	4 ± 0	6 ± 0	2 - 8
Linfocitos (%)	40 ± 2	47 ± 3	44 ± 4	20 - 40

Datos presentados como el promedio de triplicados ± desviación estándar. El análisis de ANOVA de una vía, seguido de un *post-hoc* de Tukey a $p < 0.05$ no mostraron valores estadísticamente significativos.

Tabla 3. Perfil bioquímico sérico de los participantes.

Determinación	Normal (n = 21)	Desnutrición	
		Inicio (n=9)	*Final (n=7)
Glucosa (mg/dL)	87 ±10	82 ±20	95 ±6.5
Triglicéridos (mg/dL)	105 ±17	115 ±18	121 ±12
Colesterol Total(mg/dL)	133 ±19	146 ±31	151 ±28
Urea (mg/dL)	23 ±7.9	15.6 ±6.3	24.0 ±9.0
Ácido úrico (mg/dL)	3.3 ±0.8	3.1 ±0.4	3.2 ±0.6
Creatinina (mg/dL)	0.7 ±0.1	0.7 ±0.1	0.7 ±0.1
Proteínas totales (g/dL)	8.1 ±0.4	8.5 ±0.3	8.3 ±0.6
Albumina (g/dL)	4.8 ±0.4	5.0 ±0.3	5.2 ±0.6
LDH (U/L)	84 ±13	92 ±12	97 ±13
ALKP (U/L)	298 ±80	301 ±85	347 ±127
AST (U/L)	6.5 ±1.5	6.6 ±0.9	6.9 ±0.6
ALT (U/L)	2.9 ±0.9	2.0 ±0.7	2.6 ±1.9
GGT (U/L)	4.7 ±1.6	5.9 ±1.3	7.6 ±1.9
Bilirrubina Total(mg/dL)	0.5 ±0.3	0.5 ±0.2	0.6 ±0.2
Bilirrubina directa (mg/dL)	0.1 ±0.03	0.1 ±0.03	0.1 ±0.03
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.4 ±0.3	0.4 ±0.3	0.5 ±0.3

Los datos representan la media de mediciones por triplicado ± desviación estándar. *Después de tres meses de consumo de amaranto. Se realizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey a $p < 0.05$. Los datos no muestran diferencias significativas entre los valores.

5.4. Modulación de la microbiota intestinal en el grupo de niños con desnutrición posterior al consumo de amaranto.

La secuenciación del gen ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) ha generado un gran interés en el estudio de las comunidades bacterianas. Las variantes de secuenciación de amplicones (ASV) se han propuesto como alternativas a las unidades taxonómicas operativas (OTU) para analizar las comunidades microbianas. El uso de ASVs ha crecido en popularidad porque reflejan un nivel más

refinado de taxonomía. Sin embargo, las ASVs deben usarse con cuidado para evitar el riesgo de dividir un único genoma bacteriano en grupos separados [59]. Una vez refinadas las secuencias, se obtuvo un total de 90,904 ASVs para el microbioma de los niños del grupo control, y 105,312 ASVs para los niños con bajo peso, y 91,526 para los niños con bajo peso que consumieron amaranto.

La diversidad alfa, que refleja la riqueza microbiana intestinal, se evaluó basándose en las especies observadas y en el índice de Shannon [60]. Aunque no se identificaron diferencias significativas entre los grupos, el grupo UNA presentó una tendencia hacia valores más bajos. Sin embargo, después del consumo de amaranto, el grupo UNA mostró una tendencia a presentar valores similares a los del grupo control (Figura 2A, B). El índice inverso de Simpson, que indica la diversidad o dominancia de especies en la muestra, también mostró una tendencia a disminuir en el grupo UN, sugiriendo que la comunidad bacteriana era menor en este grupo. De manera interesante, este valor también aumentó en el grupo que consumió amaranto (grupo UNA) (Figura 2C), y la misma tendencia se observó para Chao1 (Figura 2D) y los valores de Fisher, ACE y Simpson (Figura 3).

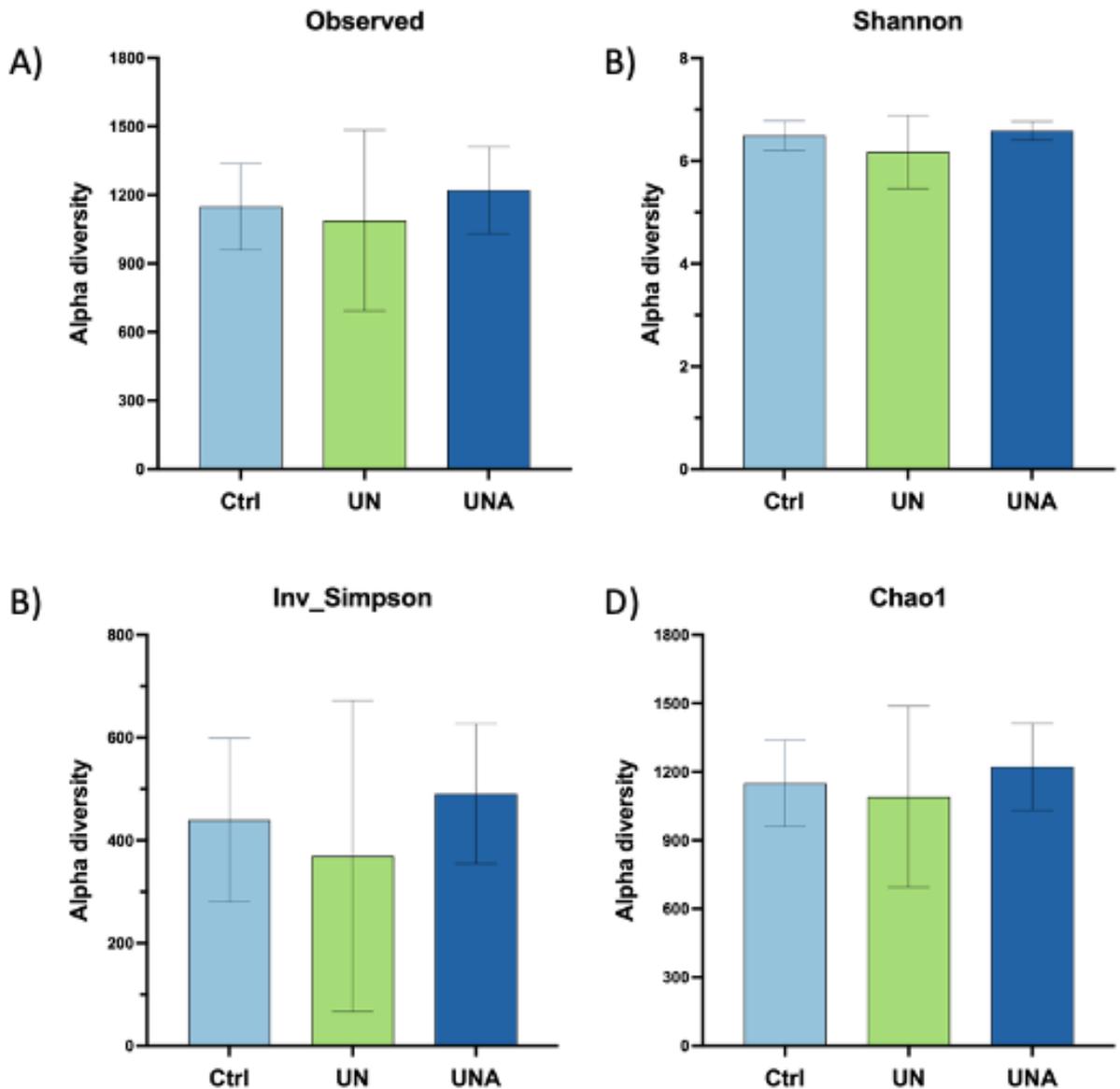


Figura 2. Efectos del consumo de amaranto sobre la composición del microbioma en niños control y con desnutrición que habitan en áreas rurales. La diversidad alfa expresada como (A) riqueza observada, (B) índice de Shannon, (C) Inv-Simpson y (D) índice de Chao 1. Las cajas expresan los rangos intercuartílicos (IQR) y las barras indican los valores mínimos y máximos. Un se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y un *post-hoc* de Dunn ($p < 0.05$). No se encontraron valores estadísticamente diferentes entre los grupos y los diferentes índices. Ctrl = grupo control con estatura normal para la edad; UN = grupo desnutrición con una estatura baja para la edad; UNA = grupo UN después de tres meses del consumo de amaranto.

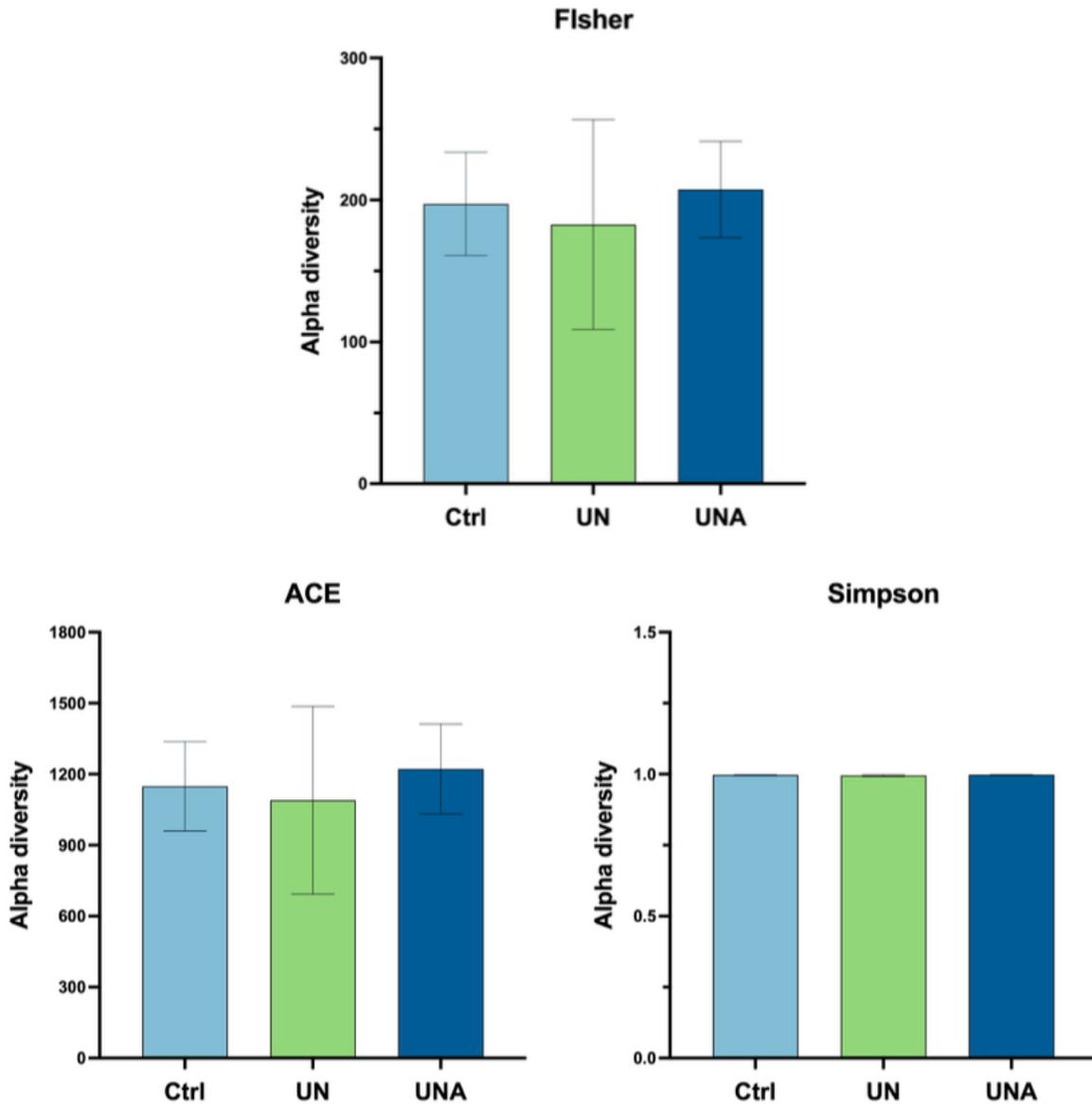


Figura 3. Diferencia de la diversidad alfa entre los grupos de niños. Fisher, ACE (estimadores de cobertura basados en la abundancia), y valor de Simpson. Las columnas muestran los valores de medias y la barra la desviación estándar. Una ANOVA de una vía se llevó a cabo seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey tomando $p < 0.05$ como valor de significancia. Ctrl = grupo control con estatura normal para la edad; UN = grupo desnutrición con una estatura baja para la edad; UNA = grupo UN después de tres meses del consumo de amaranto.

Reportes previos muestran que los niños con desnutrición presentan una diversidad menor en el microbioma intestinal [38,61,62], lo cual es concordante con lo observado en este estudio. Se sabe que el índice de Shannon (que indica la

riqueza y diversidad proporcional de las especie) mostrado una tendencia a disminuir en niños con desnutrición con malnutrición proteica grave como el Kwashiorkor, aunque no se reportaron valores significativos [63]. Esto sumado a que resultados en humanos a veces no son estadísticamente significativos debido a la variación intrínseca en las personas, pero pueden ser considerados clínicamente relevantes ya que reflejan una tendencia clara [64]. La diversidad beta refleja las diferencias en la composición microbiana intestinal de los distintos grupos y se representa mediante escalado multidimensional no métrico (NMDS) o PCoA, basado en la disimilitud de Bray-Curtis. Como se muestra en la Figura 4, el análisis PCoA mostró una diferencia en la microbiota intestinal entre los grupos Ctrl y UNA. Después del consumo de amaranto, el grupo UNA tendió a parecerse más al grupo Ctrl.

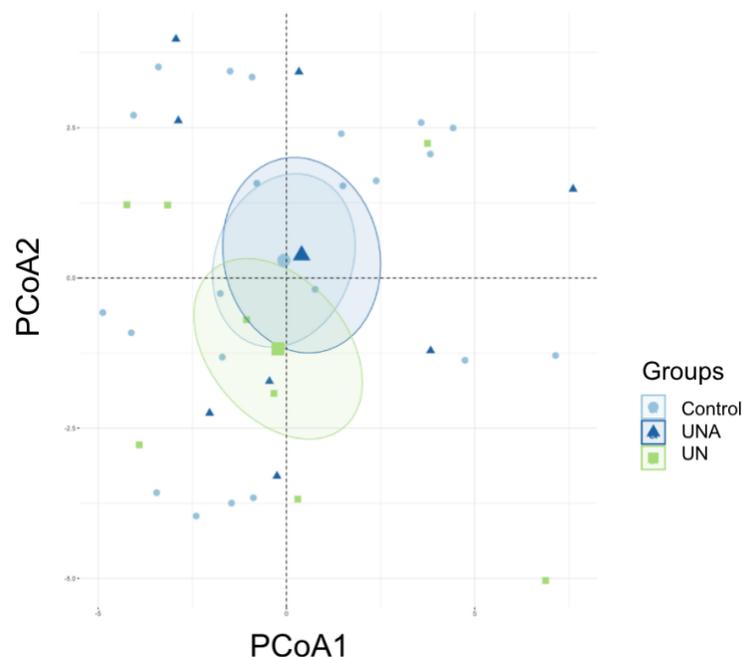


Figura 4. Efecto del consumo de amaranto en la composición de la microbiota intestinal de niños que viven en zonas rurales. La diversidad beta se midió utilizando el análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la disimilitud de Bray Curtis ($p < 0.05$). Ctrl = grupo control con estatura normal para la edad; UN = grupo desnutrición con una estatura baja para la edad; UNA = grupo UN después de tres meses del consumo de amaranto.

El principal *phylum* encontrado en la microbiota intestinal de los niños del grupo Ctrl fue el *Actinobacteriota* (28.8%), seguido del *Bacteroidota* y el *Firmicutes* (40.2%), *Proteobacteria* (12.8%) y *Verrucomicrobiota* (16.8%). Se observó que el grupo UNA mostraba un aumento significativo de *Actinobacteriota* (50.9%) con la pérdida del filo *Verrucomicrobiota*, lo que concuerda con los datos reportados por Kamil et al. [65].

Posterior al consumo de amaranto el grupo UNA mostró una disminución significativa de la abundancia de *Actinobacteria* (20%) con un aumento de *Bacteriodotes* y *Firmicutes*. Curiosamente, la *Verrumicrobiota* se recuperó después del consumo de amaranto con valores similares a los del grupo control (13.4%) (Figura 5A). Se ha reportado que *Proteobacteria* es el *phylum* que contribuye a la disbiosis [66]. Sin embargo, en este trabajo, este *phylum* no mostró cambios significativos en abundancia entre los grupos (12.8 a 15.4%) (Figura 5A).

Se considera que la proporción de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (F/B) es importante para determinar el estado de salud y juntos representan los filos dominantes en la microbiota intestinal. El cambio en la proporción F/B se ha asociado con algunas enfermedades. Sin embargo, es importante considerar que esta proporción podría verse afectada por el cambio en la abundancia de todos los demás filos, como se observa en los presentes resultados. Los datos de este estudio muestran que, después del consumo de amaranto, estos dos *phylum* alcanzaron hasta un 51.6% en la abundancia de equilibrio de F/B (Figura 5B). Se ha reportado que una dieta alta en azúcar y baja en fibra en niños con desnutrición podría causar una alta relación F/B [67]. La abundancia de *Firmicutes* se ha asociado con la modulación de la eficacia de la absorción de calorías mediante el aumento del número de gotas lipídicas [68] y una relación F/B elevada se ha asociado con la incidencia de la obesidad [68]. Una menor abundancia de *Firmicutes* con una mayor abundancia de *Bacteroidetes* se ha asociado con la enfermedad inflamatoria intestinal. Se deduce que el equilibrio de estos dos filos es importante para mantener una homeostasis intestinal normal [57].

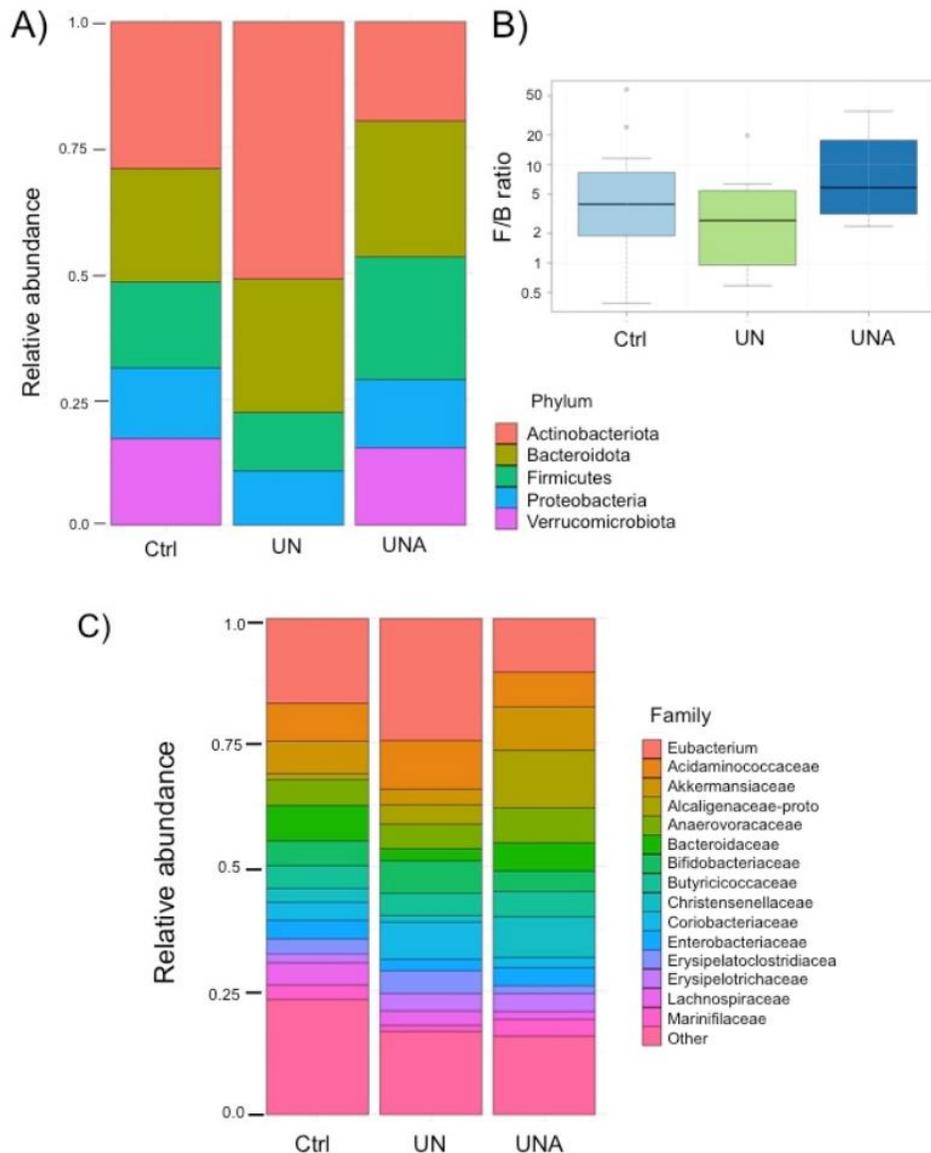


Figura 5. (A) Abundancia relativa en la microbiota intestinal a nivel de filo; (B) Relación entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (B/F). Las diferencias significativas se calcularon mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon y no se detectaron diferencias significativas. (C) Abundancia relativa en la microbiota intestinal a nivel familiar. Ctrl = grupo control con estatura normal para la edad; UN = grupo desnutrición con una estatura baja para la edad; UNA = grupo UN después de tres meses del consumo de amaranto.

A nivel de familia, se observó una gran abundancia de Eubacteria en el grupo de UN, con una disminución significativa debido el consumo de amaranto (24.8% y 11.1%). Por el contrario, la familia *Akkermansiaceae* se encontró en muy baja abundancia (3.3%) en el grupo de la UN. Sin embargo, esta familia aumentó después del consumo de amaranto (9.1%) a una abundancia aún mayor que el grupo de control (1.0%). La familia *Alcaligenaceae* aumentó significativamente su abundancia por el consumo de amaranto (11.7%), y la familia *Bacteroidaceae*, que estaba casi agotada en el grupo de la UN (2.6%), aumentó tras el consumo de amaranto hasta valores similares a los del grupo de control (5.9 y 7.6%, respectivamente). La familia *Christensenellaceae* también se encontró en gran abundancia tras el consumo de amaranto (7.8%), mientras que la *Coriobacteriaceae* disminuyó del 7.2% en el grupo desnutrido hasta el 2.0% tras el consumo de amaranto (Figura 5C).

5.5. Modulación observada en el microbioma intestinal a nivel de familia y género en niños con desnutrición después el consumo de amaranto.

Como se describió anteriormente, aunque la relación F/B proporciona una estimación de la salud de una persona, se debe tener cuidado porque esta relación podría verse afectada por los cambios en los otros *phylum*, así como el tipo de género que cambia en cada *phylum*. Tras el consumo de amaranto, la mayoría de los cambios de especies en la abundancia relativa se observaron en el filo *Firmicutes*.

5.6. Cambios en el filo *Firmicutes* a nivel de género y especie.

Se ha informado que las especies de la familia *Lachnospiraceae* pertenecientes al orden *Eubacteriales* aparecen en sobreabundancia en niños con desnutrición, sirviendo algunos de los miembros de esta familia como reguladores metabólicos en estos niños [67]. Nuestros resultados también mostraron una alta abundancia de esta familia en el grupo con desnutrición (Figura 6) y se observaron cambios en la abundancia relativa de *Eubacterium hallii*, *Ruminococcus gauvreauii*, *Blautia faecis*, *Blautia obeum*, CAG-56, *Fusicanilobacter*, *Roseburia hominis*, y *Roseburia*

intestinalis, entre otros, tras el consumo de amaranto (Figura 6). Se observó que *E. hallii* disminuyó en el grupo con desnutrición, pero en el grupo que consumió de amaranto se produjo un aumento relativo. *E. hallii* es una bacteria anaerobia que pertenece al grupo de las productoras de butirato [69] y su administración en ratones con diabetes cambió la función del microbioma intestinal, mejorando el fenotipo metabólico [70].

A nivel de género, *Blautia* ha suscitado especial interés, ya que su establecimiento en el tracto gastrointestinal se ha relacionado con el alivio de enfermedades inflamatorias y metabólicas, así como con la actividad antimicrobiana. También se ha señalado que esta bacteria desempeña un papel en la interacción con otros microorganismos intestinales [71]. *Blautia* participa activamente en la inmunomodulación intestinal en la salud humana [62,70]. De forma interesante, si bien es cierto que *B. obeum* se ha relacionado con la obesidad [50], observamos que la abundancia de en niños con desnutrición posterior al consumo de amaranto estaba al mismo nivel que en los niños del grupo control (Figura 6).

Se identificaron *Roseburia hominis* y *Roseburia intestinalis*, ambas bacterias mostraron cambios bajos en sus abundancias relativas tras el consumo de amaranto, mientras que la primera disminuyó y la segunda aumentó. Se ha descrito que el género *Roseburia* comprende organismos beneficiosos, ya que son bacterias productoras de butirato y ambas especies están ausentes en las heces de los niños con desnutrición [61]. *R. hominis* se relacionó positivamente con los niveles de melatonina en la mucosa colónica, una hormona pineal que puede mantener los ritmos circadianos y regular las funciones inmunitaria, antioxidante y antiinflamatoria, aliviando los síntomas de trastornos digestivos, como el síndrome del intestino irritable y la colitis ulcerosa [72]. También se sabe que *R. intestinales* previene la inflamación y mantiene la homeostasis energética [73].

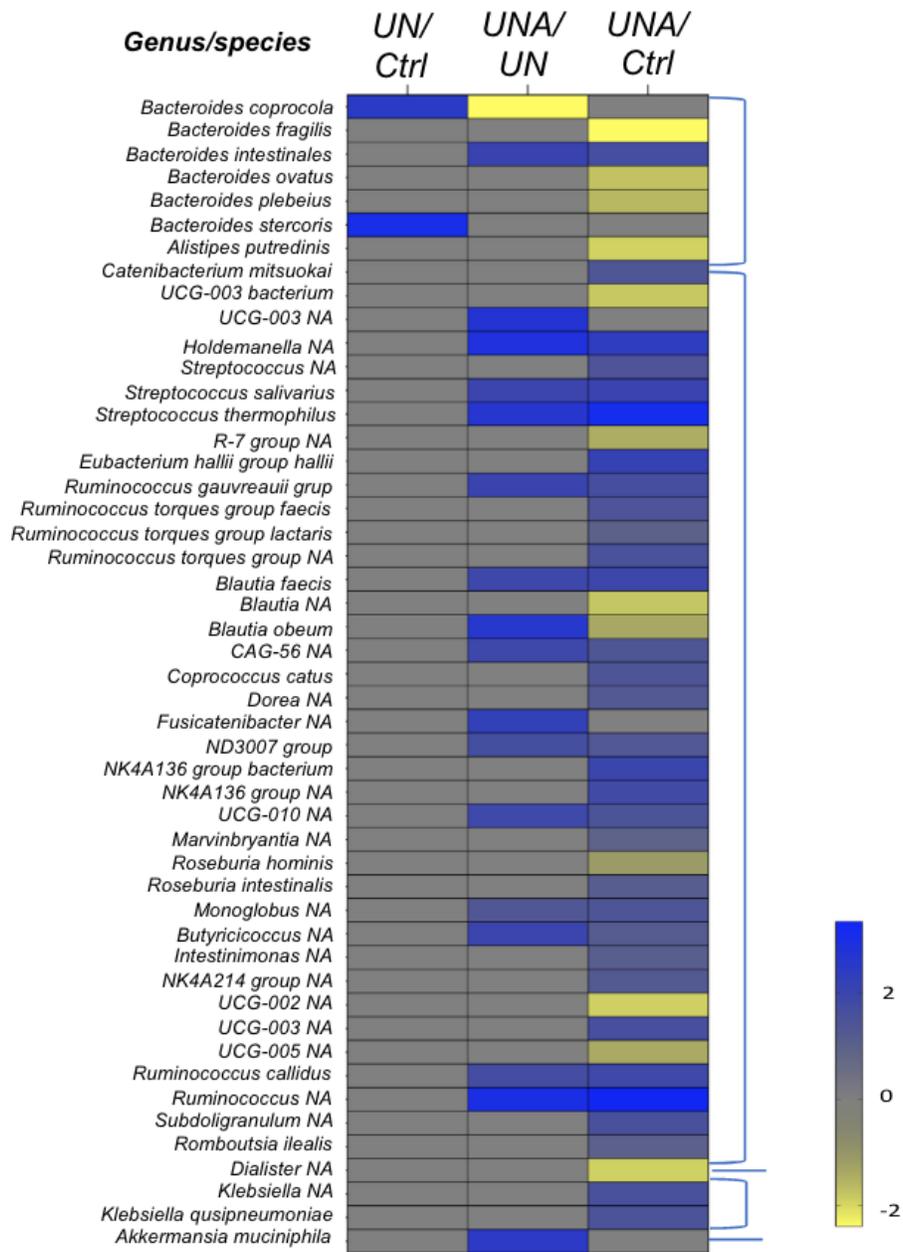


Figura 6. Mapa de calor de los ASV diferenciales observados entre UN/Ctrl, grupo de desnutrición (UN) frente al grupo de control (Ctrl); UNA/UN, grupo de desnutrición tras el consumo de amaranto (UNA) frente al grupo de desnutrición al inicio del ensayo (UN); UNA/Ctrl, grupo de desnutrición tras el consumo de amaranto (UNA) frente al grupo de control (Ctrl). Los valores se determinaron mediante LogFC, con $p < 0.05$ y $FDR < 0.1$.

Dentro de la familia *Erysipelotrichaceae*, *Holdemanella* aumentó relativamente tras el consumo de amaranto (Figura 6). En la malnutrición, se ha demostrado que *Holdomanella* estaba ausente [53]. *Holdomanella* se ha aislado de las heces de personas metabólicamente sanas y se ha relacionado con la mejora de la hiperglucemia, la mejora de la tolerancia oral a la glucosa y la restauración de la gluconeogénesis; y la señalización de la insulina en el hígado de ratones obesos [74].

La familia *Streptococcaceae* estuvo representada por un aumento relativo de la abundancia de *S. salivarius* y *S. thermophilus* después del consumo de amaranto (Figura 5). *S. thermophilus* es un probiótico bien conocido y se encuentra habitualmente en los yogures [75]. *S. salivarius* es un comensal en humanos y es filogenéticamente cercano a *S. thermophilus* [76]. La familia *Oscillospiraceae*, *Subdoligranulum* mostró una alta abundancia relativa luego del consumo de amaranto. *Subdoligranulum* es una bacteria productora de butirato con un alto potencial como probiótico para tratar enfermedades metabólicas. También afecta a la actividad de la acetil-CoA acetiltransferasa, la acetil/propionil-CoA carboxilasa y la butanol deshidrogenasa, que contribuyen a la producción de ácido butírico [77]. El butirato tiene varias propiedades beneficiosas que son esenciales para mantener la salud gastrointestinal. Por lo tanto, las bacterias productoras de butirato representan un nicho específico de la próxima generación de probióticos, siendo las especies de *Butyricoccus* una de las bacterias potenciales [78]. También se ha demostrado que el *Butyricoccus* tiene potencial como diana terapéutica para la alergia alimentaria [79]. Los *Butyricoccus* mostraron un aumento de su abundancia relativa en niños con desnutrición tras el consumo de amaranto.

5.7. Cambios en el filo *Bacteroidetes* a nivel de género y especie.

Dentro del filo *Bacteroidota*, se observó un aumento relativo de *Bacteroides coprocola* y *Bacteroides stercoris* en el grupo de desnutrición. Sin embargo, después del consumo de amaranto, su abundancia relativa disminuyó, así como la de *Alistipes putredinis* (Figura 6). Se han reportado diferentes cepas de *B. coprocola*, algunas están relacionadas con la diabetes tipo 2, otras se han

identificado en pacientes con hipertensión y otras se han relacionado con pacientes con déficit de atención/trastorno de hiperactividad [80]. Por lo tanto, se sugiere ser cautelosos sobre su presencia o ausencia [81,82]. Aunque *B. stercoris* es una bacteria productora de AGCC, algunos estudios han relacionado su presencia con la colitis ulcerosa, así como con la de *Alistipes putredinis* [83].

Se observó una disminución de la abundancia relativa de *B. fragilis*, *B. ovatus* y *B. plebeius* tras el consumo de amaranto en comparación con el grupo de control (Figura 5). *B. fragilis* es un organismo comensal, pero también se ha descrito como patógeno oportunista en infecciones clínicas y como responsable de diversas enfermedades que implican la alteración de la barrera intestinal [84]. Otros estudios han informado de que, en ratones, la cepa no toxigénica de *B. fragilis* puede mediar interacciones beneficiosas con el hospedador dirigiendo la respuesta inmunitaria y suprimiendo la inflamación intestinal [85]. Por tanto, debe llevarse a cabo una caracterización en profundidad para identificar las especies de *B. fragilis* detectadas en niños con desnutrición. Algunas de las cepas de *B. ovatus* se han relacionado con la inducción de IgA intestinal y el mantenimiento de la homeostasis tisular [86]. Se observó que *B. plebeius* era una bacteria dominante en niños con síndrome inflamatorio multisistémico [87]. Sólo *B. intestinalis* mostró una abundancia relativa elevada posterior el consumo de amaranto (Figura 6). Esta bacteria ha sido identificada como productora de poliaminas como la putrescina, la espermidina y la espermina, todos ellos necesarios para el crecimiento y la diferenciación de las células animales. También intervienen en varios pasos de la síntesis de ADN, ARN y proteínas [88].

5.8. Cambios en el filo *Verrucomicrobiota*.

El consumo de amaranto indujo un aumento relativo de la abundancia de *Akkermansia muciniphila* (Figura 6). *A. muciniphila*, es una bacteria colónica degradadora de mucina que se ha relacionado con la salud intestinal y la señalización inmune y se ha asociado con una reducción en la incidencia de diabetes cuando se administra como probiótico [89]. Se informó de que *A. muciniphila* mejora los trastornos metabólicos en ratones obesos alimentados con

dieta y se descubrió que aumentaba por la ingesta de almidón resistente. Se ha propuesto como un nuevo probiótico con capacidad para promover una longevidad saludable [90]. *A. muciniphila* puede metabolizar la capa mucosa como fuente de carbono y nitrógeno para producir acetato y propionato, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de la barrera intestinal, especialmente cuando la ingesta de nutrición enteral es baja, como durante el ayuno prolongado y en la malnutrición [91].

En un trabajo realizado en ratones, la diversidad y riqueza de la microbiota cambió cuando se les alimentó con soya fermentada, y se observó un aumento de *Lactobacillus*, *Butyricoccus*, miembros de la familia *Lachnospiraceae* y *A. muciniphila* [92]. Nuestros resultados mostraron que estas especies aumentaron su abundancia en niños con desnutrición ulterior al consumo de amaranto.

5.9. El consumo de amaranto promueve metabolitos dependientes de la microbiota intestinal.

Los granos de amaranto reventados, además de proteínas de alta calidad, son ricos en carbohidratos que escapan a la digestión (almidón resistente), así como en fibra dietética procedente del tegumento [39]. La microbiota intestinal participa predominantemente en la fermentación de carbohidratos no digeribles en AGCC, que ejercen múltiples efectos sobre la homeostasis energética y son cruciales para la salud intestinal. Los AGCC más abundantes son el acetato, el butirato y el propionato, que comprenden más del 95% del contenido de AGCC [17]. Las investigaciones han demostrado que las concentraciones de AGCC en niños con desnutrición aguda grave y moderada son bajas, especialmente de ácido propiónico y butírico, y que estos AGCC aumentan durante la recuperación junto con el número de microbiota intestinal. En este estudio, se observó que, tras el consumo de amaranto, los niveles de ácido acético, butírico y propiónico mostraban una tendencia a aumentar, aunque sólo el ácido propiónico fue estadísticamente significativo respecto al grupo control, así como la suma de estos tres AGCC (Figura 7). *E. hallii*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *R. hominis* y *Butyricoccus*, conocidas como especies productoras de butirato [64], se observaron en mayor abundancia relativa

después el consumo de amaranto. *A. muciniphila* y *Subdoligranulum* sp. han sido descritas como bacterias productoras de acetato y propionato, respectivamente [72,91] ambas también se encontraron en mayor abundancia después del consumo de amaranto. En conjunto, estos datos sugieren que los niveles de AGCC se restauran posteriormente el consumo de amaranto, correlacionándose con una mayor abundancia de bacterias productoras de AGCC.

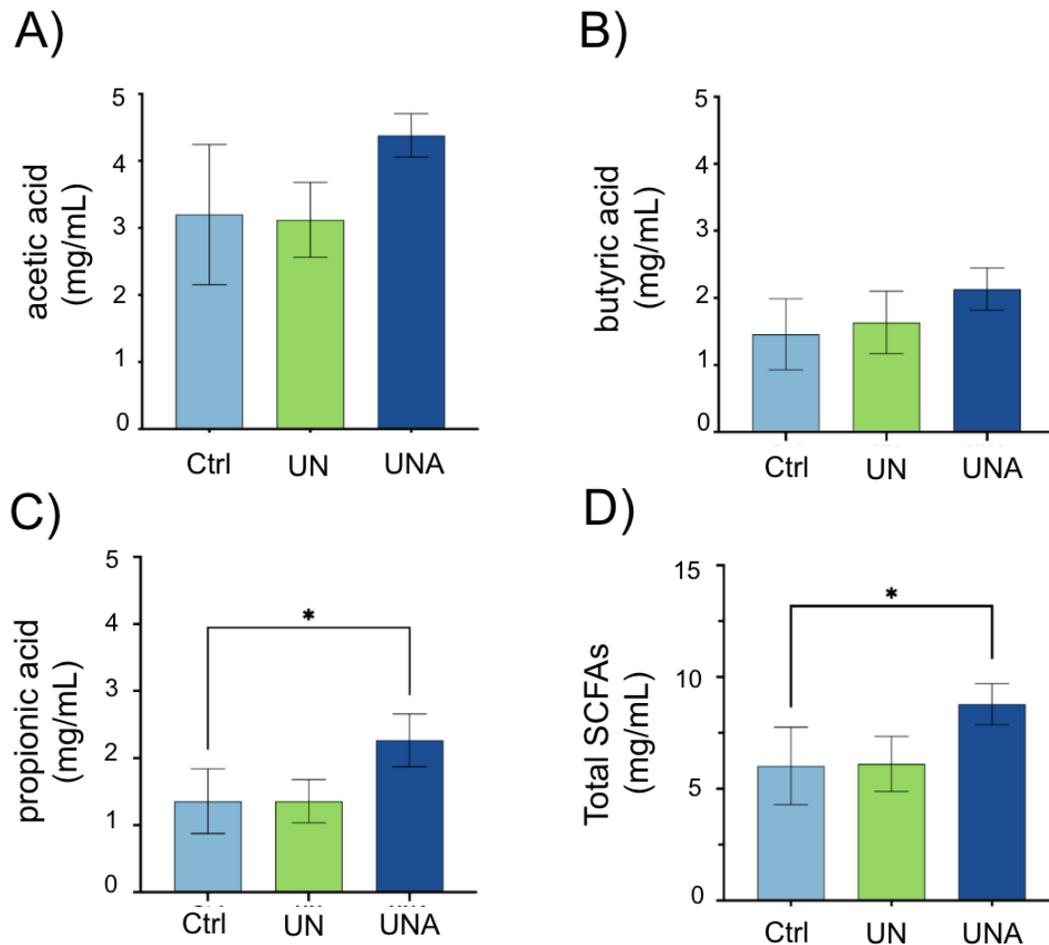


Figura 7. Niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en muestras de heces de niños. Niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en las muestras de heces de los niños. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. (A) ácido acético; (B) ácido butírico; (C) ácido propiónico; (D) AGCC totales. Los datos se presentan como la media de mg/mL \pm desviación estándar. El asterisco muestra diferencias significativas a $p < 0.05$. Ctrl = grupo de control de niños con peso normal para la edad; UN = grupo de niños con desnutrición con baja estatura para la edad; UNA = grupo de niños con desnutrición después de tres meses de consumo de amaranto.

El efecto de las proteínas en el intestino sobre el metabolismo de la microbiota es menos conocido, esto se debe a factores como la gran diversidad de ellas, la presencia o ausencia de aminoácidos esenciales, la composición en aminoácidos que induce diferencias en la digestibilidad que a su vez deriva en la asimilación diferencial por parte de la microbiota, generando una gran diversidad de metabolitos, muchos de los cuales podrían ser perjudiciales para la salud del huésped [93]. Un trabajo reciente en el que se utilizaron aislados de proteína de quinoa demostró que tenían un efecto positivo en la modulación del microbioma intestinal de ratones [94], esto es similar al efecto observado en el presente trabajo. Sin embargo, trabajos anteriores en los que se utilizaron ratones como modelos, al alimentarlos con proteínas de soya mostraron que además de una tendencia a la acumulación de grasa, el efecto en la modulación del microbioma intestinal no era el mismo en comparación con la alimentación con proteínas de amaranto [95]. Por lo que se debe realizar más trabajos para comprender el efecto de las proteínas alimentarias en el eje proteína-intestino-hospedador-salud.

5.10. Predicción funcional de taxones bacterianos.

Las predicciones de las vías metabólicas de la composición del microbioma intestinal en el grupo de desnutrición en comparación con el grupo de control (UN/Ctrl) (Figura 8) mostraron un aumento del metabolismo del almidón y la sacarosa, que disminuyó una vez finalizado el consumo de amaranto (UNA/Ctrl). La biosíntesis del metabolismo secundario se incrementó después del consumo de amaranto, así como el metabolismo del butanoato, piruvato y propanoato, que son las rutas para producir ácido butírico y propiónico, asociado con la tendencia a incrementar estos metabolitos después del consumo de amaranto (Figura 8).

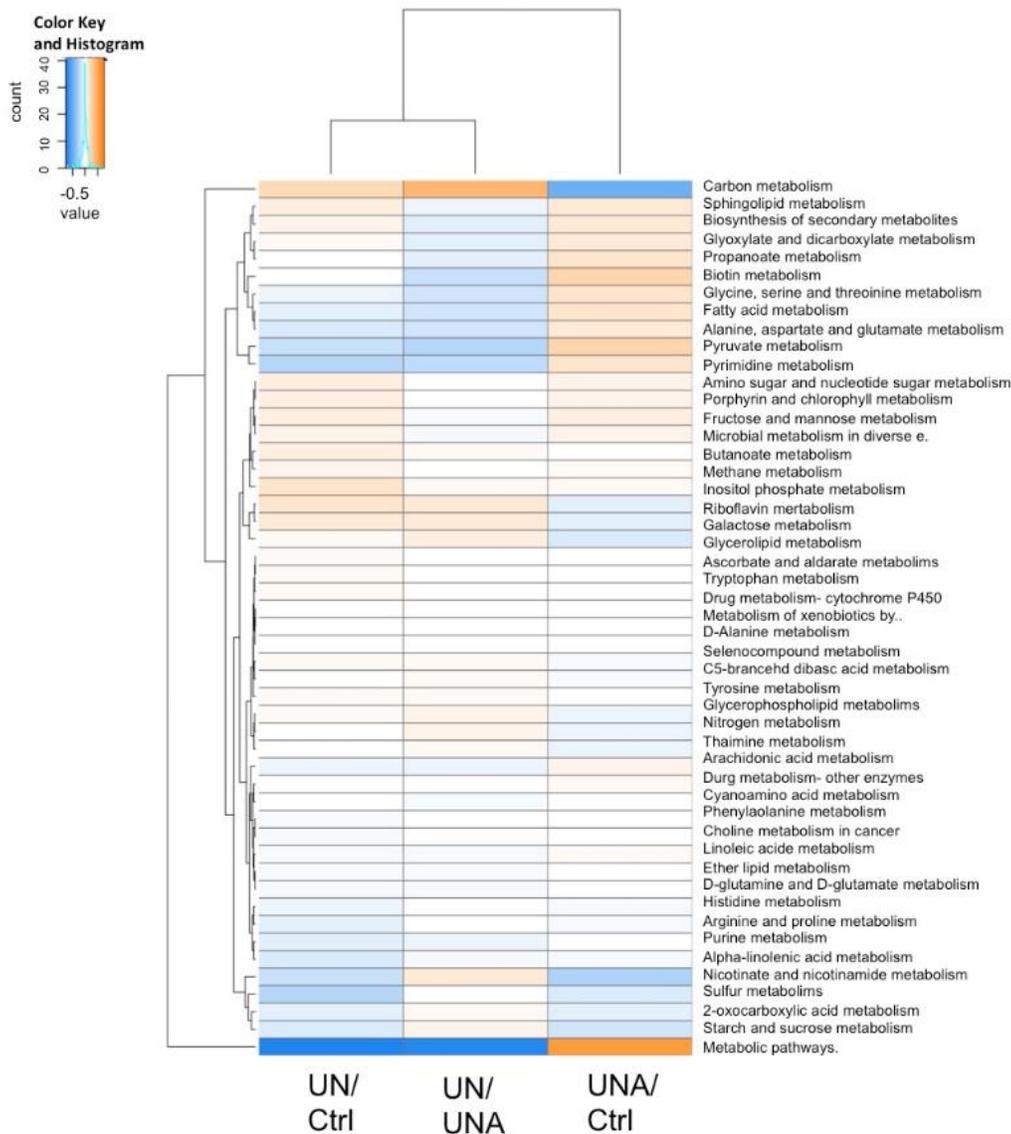


Figura 8. Mapa de calor de las funciones predichas del microbioma intestinal por Tax4fun2 evaluadas según las diferencias en la vía de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG). Diferencias en la vía KEGG: grupo de desnutrición (UN) frente a niños de control (Ctrl); grupo de desnutrición que el consumió de amaranto (UNA) frente a grupo de desnutrición al inicio del ensayo (UN); grupo de desnutrición antes del consumo de amaranto (UN) frente a grupo de control (Ctrl).

El metabolismo de purinas y amino azúcares y nucleótidos, así como las vías relacionadas con el metabolismo de vitaminas, como la biotina (vitamina H), el nicotinato y la nicotinamida (B3), y la riboflavina (B2), mostraron una tendencia a aumentar por el consumo de amaranto. Debido al consumo de amaranto se observó un aumento de las vías metabólicas relacionadas con el metabolismo de los esfingolípidos y del ácido araquidónico. Los esfingolípidos son una clase de lípidos bioactivos que desempeñan papeles clave en la regulación de varios procesos celulares, mientras que el ácido araquidónico forma parte de las membranas celulares y es importante para la salud humana y la homeostasis de los tejidos. Se ha descrito una correlación entre *Ruminococcaceae* UCG 009 y el ácido araquidónico [96]. A partir del consumo de amaranto se detectaron varias especies de *Ruminococcus* (Figura 9).

Se obtuvo una red de correlaciones con las actividades metabólicas y como se muestra en la Figura 8, *Akkermansia* parece ser una especie importante en el control de *Ruminococcus*, *Bacteroides* y *Blautia*. También se observó una relación positiva entre *Klebsiella* y *E. hallii*. *Akkermansia* también mostró una correlación positiva con especies de la familia *Oscillospiraceae*, como UCG-005, 003 y 002. Las cepas UCG regulan *Christensenellaceae* R-7 y *Butyrivibrio*, que es una especie importante en el metabolismo de los lípidos. Estos grupos de bacterias intervienen en la regulación del metabolismo de nucleótidos y terpenoides, el transporte, la transducción de señales, la replicación y la reparación.

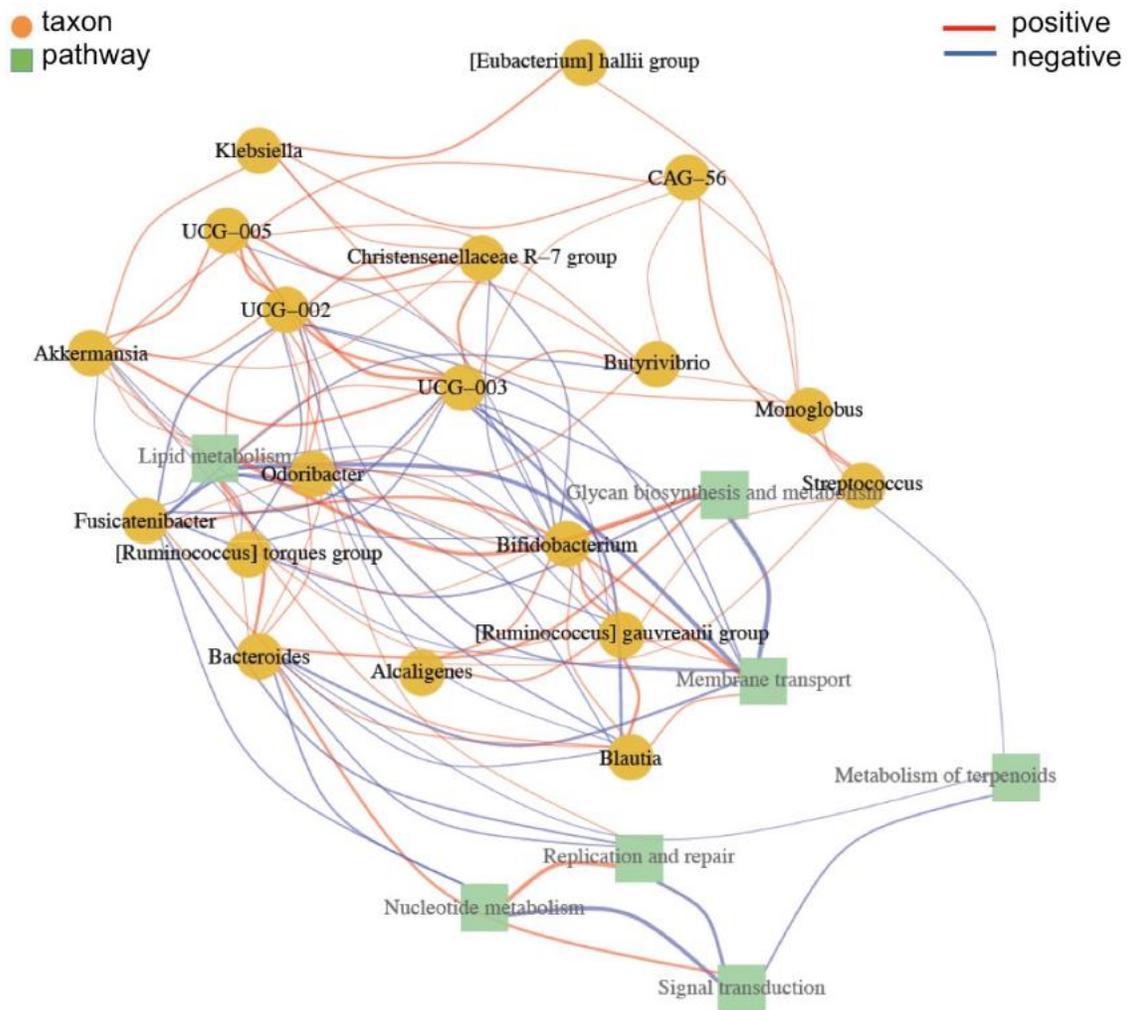


Figura 9. Asociación entre taxones y rutas. Los taxones están representados por círculos amarillos y las rutas por cuadrados verdes. Los nodos de la red son taxones y rutas. La asociación entre los nodos y las aristas se calculó mediante la metodología de correlación de Spearman. Sólo se consideraron las correlaciones de coordenadas absolutas > 0.5 . Las correlaciones de los nodos están representadas por el vértice, donde el rojo son correlaciones positivas y el azul negativas.

6. CONCLUSIONES

El amaranto reventado ha sido reconocido como una fuente alimenticia con gran potencial para combatir la malnutrición proteico-energética. Acorde con los ensayos preclínicos, se propuso el uso de amaranto como producto con actividad terapéutica con mínima probabilidad de daño y bajo el principio de no maleficencia. Al momento de la propuesta (y hasta la última revisión de este documento), no se contaban con estudios clínicos con enfoque similar. Al ser un alimento, no se exigen pruebas previas rigurosas de exposición crónica; además de que la farmacocinética de este producto no es susceptible a la caracterización típica.

Este ensayo piloto proporcionó pruebas valiosas para explorar la seguridad biológica y la tolerabilidad de este producto. Durante el desarrollo del estudio y en los 30 días posteriores a la intervención (acorde con la historia clínica), los participantes no reportaron reacciones adversas frente al consumo diario de amaranto, por tanto, no se reportaron eventos asociados evaluables y se verificó la seguridad esperada.

El ensayo cumplió también con una función exploratoria en la que definimos como variables a la función hematológica (la biometría hemática completa), hepática, pancreática y renal. En estos análisis se verificó que el amaranto no modificó el perfil de los estudios bioquímico-clínicos ni hematológicos, al tiempo que se observaron tendencias en el aumento de valores hematológicos como el hematocrito y volumen corpuscular medio en los niños con desnutrición que lo ingirieron.

De especial interés en este diseño prospectivo-longitudinal, el análisis que nos permitió identificar un cambio en el microbioma asociado a la suplementación dietética con amaranto reventado. Los diferentes índices de biodiversidad demuestran un aumento posterior a su consumo, lo cual es indicativo de una mayor variedad en las especies presentes en el intestino. Sin embargo, es un dato que debe interpretarse con reserva, estudiando que especies son las que aumentan o disminuyen después de la intervención, en este respecto se encontró que después del consumo de amaranto la diversidad beta (antes disminuida en los niños con

desnutrición) aumento hasta ser similar al grupo control, lo cual sugiere un efecto favorable.

Además de ello se encontró una disminución en el phylum *Proteobacteria*, que ha sido asociada a la disbiosis, el aumento de la abundancia relativa de *A. muciniphila*, una bacteria relacionada con la salud intestinal y la longevidad del huésped, así como el género *Subdoligranulum*, que ha sido propuesto como una nueva clase de probióticos.

Sumado a los cambios del microbioma, la producción de ácidos grasos de cadena corta; los cuales son producto del metabolismo y fermentación de carbohidratos por parte de las bacterias que propician la salud intestinal, se vio aumentada a niveles normales como efecto de la suplementación con amaranto, situación atribuible al aumento de especies productoras de butirato y propionato como los son *E. hallii*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *R. hominis*, *Butyricoccus*, *A. muciniphila* y *Subdoligranulum sp.*

En conclusión, el presente trabajo destaca los potenciales usos del amaranto reventado como fuente de proteínas de origen vegetal, que requieren un procesamiento mínimo para alcanzar sus funciones biológicas y ser un coadyuvante en el tratamiento de la desnutrición. Sin embargo, la erradicación de la desnutrición no se logrará sólo con suplementación, sino con cambios sustanciales positivos en la dieta, además de mejorar las condiciones de infraestructura y educación en las zonas rurales.

7. PERSPECTIVAS

Este ensayo demostró que la administración diaria de amaranto no reportó eventos asociados evaluables, cumpliendo con la seguridad esperada a la dosis propuesta. Sin embargo, debido a que no existe una fórmula universal para ajustar la primera dosis en biológicos humanos, un nuevo ensayo controlado con dosis múltiples es recomendable.

Respecto a la estimación del tamaño de muestra de este ensayo, se utilizó la cantidad mínima de sujetos de investigación con la patología de interés que permitiera tener una distribución normalizada de los datos recabados. Las variables exploratorias de elección no establecieron cambios estadística o clínicamente relevantes en los marcadores hemáticos y biológicos necesarios para presentar un perfil del agente en investigación, que permitieran proponer una respuesta farmacológica contundente. Por esta razón queda planteada la posibilidad de estudiar un analito que permita describir parámetros farmacocinéticos o la elección de nuevas variables que permitan definir un potencial interés en su aplicación.

Finalmente, los cambios en el microbioma resultaron de mayor interés, pero se deberá estudiar la permanencia del efecto, así como la evaluación de una administración superior en dosis y tiempo. Basados en los hallazgos de este ensayo, es evidente que futuros análisis deberán seguir la recomendación de inclusión de un mínimo de 30 sujetos de investigación para establecer mejores parámetros que permitan continuar con las fases desarrollo y evaluación de efectos del amaranto como agente biológico.

8. REFERENCIAS

- [1] Blanton L V., Barratt MJ, Charbonneau MR, Ahmed T, Gordon JI. Childhood undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics. *Science* (1979) 2016;352:1533–1533. <https://doi.org/10.1126/science.aad9359>.
- [2] Gordon JI, Dewey KG, Mills DA, Medzhitov RM. The Human Gut Microbiota and Undernutrition. *Sci Transl Med* 2012;4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004347>.
- [3] Katoch OR. Determinants of malnutrition among children: A systematic review. *Nutrition* 2022;96:111565. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2021.111565>.
- [4] UNICEF, WHO, World Bank Group. Levels and trends in child malnutrition. 2021.
- [5] De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 2007;85:660–7. <https://doi.org/10.2471/BLT.07.043497>.
- [6] Prottoy Kumar Das. Z Scores - Monitoring & Evaluation. M&E Solutions n.d. <http://monitoringevaluation.weebly.com/z-scores.html> (accessed December 19, 2023).
- [7] WHO. Growth reference data for 5-19 years n.d. <https://www.who.int/tools/growth-reference-data-for-5to19-years> (accessed December 19, 2023).
- [8] Calder N, Walsh K, Olupot-Olupot P, Ssenyondo T, Muhindo R, Mpoya A, et al. Modifying gut integrity and microbiome in children with severe acute malnutrition using legume-based feeds (MIMBLE): A pilot trial. *Cell Rep Med* 2021;2:100280. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100280>.
- [9] Prendergast AJ, Humphrey JH. The stunting syndrome in developing countries. *Paediatr Int Child Health* 2014;34:250–65. <https://doi.org/10.1179/2046905514Y.0000000158>.
- [10] Reveles F, Reyes R, Tlapale Vázquez Diseño formación A, Pablo Luna J, Montiel A. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. n.d.
- [11] DR. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. Resultados de San Luis Potosí. n.d.
- [12] Gómez-Gallego C, García-Mantrana I, Martínez-Costa C, Salminen S, Isolauri E, Carmen Collado M. Annual Review of Nutrition The Microbiota and

Malnutrition: Impact of Nutritional Status During Early Life 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117>.

- [13] Calder N, Walsh K, Olupot-Olupot P, Ssenyondo T, Muhindo R, Mpoya A, et al. Modifying gut integrity and microbiome in children with severe acute malnutrition using legume-based feeds (MIMBLE): A pilot trial. *Cell Rep Med* 2021;2. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100280>.
- [14] Iddrisu I, Monteagudo-Mera A, Poveda C, Pyle S, Shahzad M, Andrews S, et al. Malnutrition and gut microbiota in children. *Nutrients* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/nu13082727>.
- [15] Brown KH. Symposium: Nutrition and Infection, Prologue and Progress Since 1968 Diarrhea and Malnutrition 1. vol. 133. 2003.
- [16] O'May GA, Reynolds N, Macfarlane GT. Effect of pH on an In Vitro Model of Gastric Microbiota in Enteral Nutrition Patients. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4777. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4777-4783.2005>.
- [17] Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* 1991;70:443–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x>.
- [18] Gatya M, Fibri DLN, Utami T, Suroto DA, Rahayu ES. Gut Microbiota Composition in Undernourished Children Associated with Diet and Sociodemographic Factors: A Case–Control Study in Indonesia. *Microorganisms* 2022;10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091748>.
- [19] Van Den Elsen LWJ, Poyntz HC, Weyrich LS, Young W, Forbes-Blom EE. Embracing the gut microbiota: The new frontier for inflammatory and infectious diseases. *Clin Transl Immunology* 2017;6. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.91>.
- [20] Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* 2011;3:858–76. <https://doi.org/10.3390/nu3100858>.
- [21] LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:160–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>.
- [22] Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *CMGH* 2018;6:133–48. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.04.003>.
- [23] Umu ÖCO, Rudi K, Diep DB. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microb Ecol Health Dis* 2017;28:1348886. <https://doi.org/10.1080/16512235.2017.1348886>.

- [24] Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. 2008.
- [25] Laursen MF, Andersen LBB, Michaelsen KF, Mølgaard C, Trolle E, Bahl MI, et al. Infant Gut Microbiota Development Is Driven by Transition to Family Foods Independent of Maternal Obesity. *MSphere* 2016;1. <https://doi.org/10.1128/msphere.00069-15>.
- [26] Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4578–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>.
- [27] Cheng J, Ringel-Kulka T, Heikamp-De Jong I, Ringel Y, Carroll I, De Vos WM, et al. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME Journal* 2016;10:1002–14. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.177>.
- [28] Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. Role of the microbiome in human development. *Gut* 2019;68:1108. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2018-317503>.
- [29] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14691–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>.
- [30] Korpe PS, Petri WA. Environmental enteropathy: Critical implications of a poorly understood condition. *Trends Mol Med* 2012;18:328–36. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.007>.
- [31] Mondal D, Minak J, Alam M, Liu Y, Dai J, Korpe P, et al. Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54:185–92. <https://doi.org/10.1093/cid/cir807>.
- [32] Humphrey JH. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. *The Lancet* 2009;374:1032–5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60950-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60950-8).
- [33] Ramakrishna BS, Venkataraman S, Mukhopadhyaya A. Tropical malabsorption. *Postgrad Med J* 2006;82:779–87. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.048579>.
- [34] Ahmed T, Auble D, Berkley JA, Black R, Ahern PP, Hossain M, et al. An evolving perspective about the origins of childhood undernutrition and nutritional interventions that includes the gut microbiome. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1332:22–38. <https://doi.org/10.1111/nyas.12487>.

- [35] Wu S, Bhat ZF, Gounder RS, Ahmed IAM, Al-Juhaimi FY, Ding Y, et al. Effect of Dietary Protein and Processing on Gut Microbiota—A Systematic Review. *Nutrients* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/nu14030453>.
- [36] Berding K, Vlckova K, Marx W, Schellekens H, Stanton C, Clarke G, et al. Diet and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health. *Advances in Nutrition* 2021;12:1239–85. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa181>.
- [37] Aloo SO, Oh DH. The Functional Interplay between Gut Microbiota, Protein Hydrolysates/Bioactive Peptides, and Obesity: A Critical Review on the Study Advances. *Antioxidants* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/antiox11020333>.
- [38] Gatya M, Fibri DLN, Utami T, Suroto DA, Rahayu ES. Gut Microbiota Composition in Undernourished Children Associated with Diet and Sociodemographic Factors: A Case–Control Study in Indonesia. *Microorganisms* 2022;10:1748. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091748>.
- [39] Coelho LM, Silva PM, Martins JT, Pinheiro AC, Vicente AA. Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional value of amaranth. *Food Funct* 2018;9:5499–512. <https://doi.org/10.1039/c8fo01422a>.
- [40] Silva-Sánchez C, Barba De La Rosa AP, León-Galván MF, De Lumen BO, De León-Rodríguez A, González De Mejía E. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem* 2008;56:1233–40. <https://doi.org/10.1021/jf072911z>.
- [41] Kauffman CS, Weber LE. Grain Amaranth. *Advances in New Crops* 1990:127–39.
- [42] Solanki C, Saha D. Effect of popping methods on popping characteristics of amaranth grain Design and analysis of greenhouse structures for selected Regions of India View project. 2018.
- [43] Valadez-Vega C, Lugo-Magaña O, Figueroa-Hernández C, Bautista M, Betanzos-Cabrera G, Bernardino-Nicanor A, et al. Effects of Germination and Popping on the Anti-Nutritional Compounds and the Digestibility of *Amaranthus hypochondriacus* Seeds. *Foods* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/foods11142075>.
- [44] Pasko P, Barton HJ, Fołta MGJ. Evaluation of antioxidant activity of amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain and by-products (flour, popping, cereal). *Rocz Panstw Zakl Hig* 2007;58:35–40.
- [45] Muyonga JH, Andabati B, Ssepuuya G. Effect of heat processing on selected grain amaranth physicochemical properties. *Food Sci Nutr* 2014;2:9–16. <https://doi.org/10.1002/fsn3.75>.

- [46] Aderibigbe OR, Ezekiel OO, Owolade SO, Korese JK, Sturm B, Hensel O. Exploring the potentials of underutilized grain amaranth (*Amaranthus* spp.) along the value chain for food and nutrition security: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022;62:656–69. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1825323>.
- [47] Grundy MML, Momanyi DK, Holland C, Kawaka F, Tan S, Salim M, et al. Effects of grain source and processing methods on the nutritional profile and digestibility of grain amaranth. *J Funct Foods* 2020;72. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104065>.
- [48] Salem SA, Hamad EM, Ashoush IS, Salem SA, Hamad EM, Ashoush IS. Effect of Partial Fat Replacement by Whey Protein, Oat, Wheat Germ and Modified Starch on Sensory Properties, Viscosity and Antioxidant Activity of Reduced Fat Ice Cream. *Food Nutr Sci* 2016;7:397–404. <https://doi.org/10.4236/FNS.2016.76041>.
- [49] Gao L, Zhang L, Liu H, Hu J. In vitro gastrointestinal digestion of whole grain noodles supplemented with soluble dietary fiber and their effects on children fecal microbiota. *Food Biosci* 2023;53:102600. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102600>.
- [50] Mexico S de gobernación. NOM-016S-SA3-2012 2021. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284306&fecha=08/01/2013#gsc.tab=0 (accessed December 19, 2023).
- [51] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016;13:581–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- [52] Oksanen J. Vegan: Community Ecology Package. R Package 2015, version 2.6-4. 2015. <https://github.com/vegandevs/vegan/issues> (accessed December 19, 2023).
- [53] Wemheuer F, Taylor JA, Daniel R, Johnston E, Meinicke P, Thomas T, et al. Tax4Fun2: Prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. *Environmental Microbiomes* 2020;15. <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00358-7>.
- [54] Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao KA. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput Biol* 2017;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>.
- [55] Csárdi G, Nepusz T. The igraph software package for complex network research. n.d.
- [56] Getawa S, Getaneh Z, Melku M. Hematological Abnormalities and Associated Factors Among Undernourished Under-Five Children Attending University of

Gondar Specialized Referral Hospital, Northwest Ethiopia. *J Blood Med* 2020;11:465–78. <https://doi.org/10.2147/JBM.S284572>.

- [57] Cano-Gómez C, Veana F, Calva-Cruz OJ, Espitia-Rangel E, Barba-de la Rosa AP. Influence of amaranth consumption on the anthropometric and hematological profile of school-age children with low height for age. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica* 2023;11.
- [58] Cano-Gómez C, Veana F, Calva-Cruz OJ, Espitia-Rangel E, Barba-de la Rosa AP. Influence of amaranth consumption on the anthropometric and hematological profile of school-age children with low height for age n.d.
- [59] Schloss PD. Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *MSphere* 2021;6. <https://doi.org/10.1128/msphere.00191-21>.
- [60] Qi C, Cai Y, Qian K, Li X, Ren J, Wang P, et al. gutMDisorder v2.0: a comprehensive database for dysbiosis of gut microbiota in phenotypes and interventions. *Nucleic Acids Res* 2023;51:D717–22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac871>.
- [61] Monira S, Nakamura S, Gotoh K, Izutsu K, Watanabe H, Alam NH, et al. Gut Microbiota of Healthy and Malnourished Children in Bangladesh. *Front Microbiol* 2011;2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00228>.
- [62] Kamil RZ, Murdiati A, Juffrie M, Nakayama J, Rahayu ES. Gut microbiota and short-chain fatty acid profile between normal and moderate malnutrition children in Yogyakarta, Indonesia. *Microorganisms* 2021;9:1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010127>.
- [63] Subramanian S, Huq S, Yatsunenka T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature* 2014;510:417–21. <https://doi.org/10.1038/nature13421>.
- [64] Kim K, Veerappan K, Woo N, Park B, Natarajan S, Chung H, et al. *Ulmus macrocarpa* Hance extract modulates intestinal microbiota in healthy adults: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Microbiol* 2021;59:1150–6. <https://doi.org/10.1007/S12275-021-1329-8>.
- [65] Kamil RZ, Murdiati A, Juffrie M, Rahayu ES. Gut Microbiota Modulation of Moderate Undernutrition in Infants through Gummy *Lactobacillus plantarum* Dad-13 Consumption: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/nu14051049>.
- [66] Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol* 2015;33:496–503. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2015.06.011>.

- [67] Saleh M, Rüschenbaum S, Welsch C, Zeuzem S, Moradpour D, Gouttenoire J, et al. Glycogen synthase kinase 3 β enhances hepatitis C virus replication by supporting miR-122. *Front Microbiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02949>.
- [68] Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, Van Noten C, Hens N, Vael C, et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: A cross-sectional study. *Gut Pathog* 2013;5. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-10>.
- [69] Wong JMW, De Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. *Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids*. 2006.
- [70] Udayappan S, Manneras-Holm L, Chaplin-Scott A, Belzer C, Herrema H, Dallinga-Thie GM, et al. Oral treatment with *Eubacterium hallii* improves insulin sensitivity in db/db mice. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2016;2. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.9>.
- [71] Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, et al. *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes* 2021;13:1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>.
- [72] Song L, He M, Sun Q, Wang Y, Zhang J, Fang Y, et al. *Roseburia hominis* increases intestinal melatonin level by activating p-creb-aanat pathway. *Nutrients* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/nu14010117>.
- [73] Nie K, Ma K, Luo W, Shen Z, Yang Z, Xiao M, et al. *Roseburia intestinalis*: A Beneficial Gut Organism From the Discoveries in Genus and Species. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.757718>.
- [74] Romani-Pérez M, López-Almela I, Bullich-Vilarrubias C, Rueda-Ruzafa L, Gómez Del Pulgar EM, Benítez-Páez A, et al. *Holdemanella bififormis* improves glucose tolerance and regulates GLP-1 signaling in obese mice. *FASEB Journal* 2021;35. <https://doi.org/10.1096/fj.202100126R>.
- [75] Zhu Y, Wang H, Hollis JH, Jacques PF. The associations between yogurt consumption, diet quality, and metabolic profiles in children in the USA. *Eur J Nutr* 2015;54:543–50. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0735-7>.
- [76] Delorme C, Abraham AL, Renault P, Guédon E. Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infection, Genetics and Evolution* 2015;33:381–92. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.001>.
- [77] Van Hul M, Le Roy T, Prifti E, Dao MC, Paquot A, Zucker JD, et al. From correlation to causality: the case of *Subdoligranulum*. *Gut Microbes* 2020;12:1–13. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1849998>.

- [78] Boesmans L, Valles-Colomer M, Wang J, Eeckhaut V, Falony G, Ducatelle R, et al. Butyrate Producers as Potential Next-Generation Probiotics: Safety Assessment of the Administration of *Butyricoccus pullicaecorum* to Healthy Volunteers . *MSystems* 2018;3. <https://doi.org/10.1128/msystems.00094-18>.
- [79] Wang Y, Wang C, Huang J, Xie M, Li X, Fu L. *Butyricoccus* plays a key role in mediating the antagonism between probiotic and antibiotic on food allergy. *Food Agric Immunol* 2019;30:446–61. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1594704>.
- [80] Wang LJ, Yang CY, Chou WJ, Lee MJ, Chou MC, Kuo HC, et al. Gut microbiota and dietary patterns in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2020;29:287–97. <https://doi.org/10.1007/s00787-019-01352-2>.
- [81] Chen Y, Li Z, Hu S, Zhang J, Wu J, Shao N, et al. Gut metagenomes of type 2 diabetic patients have characteristic singlenucleotide polymorphism distribution in *Bacteroides Coprocola*. *Microbiome* 2017;5. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0232-3>.
- [82] Calderón-Pérez L, Gosalbes MJ, Yuste S, Valls RM, Pedret A, Llauradó E, et al. Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63475-w>.
- [83] Nomura K, Ishikawa D, Okahara K, Ito S, Haga K, Takahashi M, et al. *Bacteroidetes* species are correlated with disease activity in ulcerative colitis. *J Clin Med* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/jcm10081749>.
- [84] Sun Y, Wu D, Zeng W, Chen Y, Guo M, Lu B, et al. The Role of Intestinal Dysbacteriosis Induced Arachidonic Acid Metabolism Disorder in Inflammaging in Atherosclerosis. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.618265>.
- [85] Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AHK, Vasconcelos AC, Cunha LD, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science (1979)* 2016;352:1116–20. <https://doi.org/10.1126/science.aad9948>.
- [86] Yang C, Mogno I, Contijoch EJ, Borgerding JN, Aggarwala V, Li Z, et al. Fecal IgA Levels Are Determined by Strain-Level Differences in *Bacteroides ovatus* and Are Modifiable by Gut Microbiota Manipulation. *Cell Host Microbe* 2020;27:467-475.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.016>.
- [87] Suskun C, Kilic O, Yilmaz Ciftdogan D, Guven S, Karbuz A, Ozkaya Parlakay A, et al. Intestinal microbiota composition of children with infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and multisystem

- inflammatory syndrome (MIS-C). *Eur J Pediatr* 2022;181:3175–91. <https://doi.org/10.1007/s00431-022-04494-9>.
- [88] Bakir MA, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:151–4. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63914-0>.
- [89] Hänninen A, Toivonen R, Pöysti S, Belzer C, Plovier H, Ouwerkerk JP, et al. *Akkermansia muciniphila* induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut* 2018;67:1445–53. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314508>.
- [90] Cerro ED Del, Lambea M, Félix J, Salazar N, Gueimonde M, De la Fuente M. Daily ingestion of *Akkermansia muciniphila* for one month promotes healthy aging and increases lifespan in old female mice. *Biogerontology* 2022;23:35–52. <https://doi.org/10.1007/S10522-021-09943-W/METRICS>.
- [91] Derrien M, Van Baarlen P, Hooiveld G, Norin E, Müller M, de Vos WM. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 2011;2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00166>.
- [92] Han W, Zhuang X, Liu Q, Sun B, Miao H, Zhang X. Fermented soy whey induced changes on intestinal microbiota and metabolic influence in mice. *Food Science and Human Wellness* 2022;11:41–8. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.07.005>.
- [93] Bartlett A, Kleiner M. iScience Dietary protein and the intestinal microbiota: An understudied relationship n.d. <https://doi.org/10.1016/j.isci>.
- [94] Fan X, Guo H, Teng C, Yang X, Qin P, Richel A, et al. Supplementation of quinoa peptides alleviates colorectal cancer and restores gut microbiota in AOM/DSS-treated mice. *Food Chem* 2023;408:135196. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.135196>.
- [95] Olguín-Calderón D, González-Escobar JL, Ríos-Villa R, Dibildox-Alvarado E, De León-Rodríguez A, Barba De La Rosa AP. Modulation of caecal microbiome in obese mice associated with administration of amaranth or soybean protein isolates. *Pol J Food Nutr Sci* 2019;69:35–44. <https://doi.org/10.31883/pjfns-2019-0002>.
- [96] Sun Y, O’Riordan MXD. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. *Adv Appl Microbiol*, vol. 85, Academic Press Inc.; 2013, p. 93–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00003-4>.

9. ANEXOS

Tabla Suplementaria 1. Factores sociodemográficos de los niños participantes que viven en comunidades rurales.

Pregunta	Respuestas		
¿Quién proporciona la información?	Madre (93%)	Abuela (7%)	
Tipo de instalación sanitaria	Drenaje (14%)	Letrina (86%)	
Tipo de combustible para cocinar.	Gas (21%)	Madera (79%)	
¿La cocina está en el mismo lugar donde duermes?	Sí (50%)	No (50%)	
¿Qué tipo de piso tiene la casa?	Concreto (50%)	Suelo (50%)	
¿De qué tipo de material está hecha la casa?	Madera (36%)	Concreto (64%)	
¿Tiene agua potable?	Sí (100%)		
¿Qué edad tenía la madre cuando nació el niño?	15 a 19 (22%)	20 a 24 (71%)	≥25 (7%)
¿Cuánto duró la lactancia?	Nunca (22%)	Menos de 6 meses (50%)	≥7 meses 36%
¿Cuál es el nivel de educación de la madre?	primario (7%)	secundario (50%)	Escuela secundaria (43%)
¿El niño consume alimentos industrializados?	Sí (86%)	No (14%)	

Pregunta	Respuesta	
¿Cuántas veces al día come el niño?	2 veces	50 %
	3 veces	50%
¿Qué come normalmente el niño?	Frijoles, arroz, sopa, huevos.	
Le gustaba el sabor del amaranto.	Sí	62,5%
	No	37,5%
Cree que el amaranto ayuda al crecimiento del niño	Sí	100%
¿Hubo algún momento en que el niño quiso dejar de comer amaranto?	Sí	62,5%
	No	37,5%
¿En qué forma y con qué te gustaría comer amaranto?	batido, dulces, galletas	

Tabla Suplementaria 2. Análisis coproparasitológico de heces de los niños participantes.

Parásitos	Control	Desnutrición	
	(n = 21)	UN (n = 9)	UNA (n=7)
Ninguno	13	6	6
<i>Blastocistis sp.</i>	4	1	1
<i>Giardia lamblia</i>	3	0	0
<i>Endolimax sp.</i>	1	0	0
<i>Entamoeba coli</i>	0	2	0

10. PRODUCTOS

Investigación

Calva-Cruz, O. J., Ovando-Vázquez, C., De León-Rodríguez, A., Veana, F., Espitia-Rangel, E., Treviño, S., & Barba-de la Rosa, A. P. (2023). Dietary Supplementation with Popped Amaranth Modulates the Gut Microbiota in Low Height-for-Age Children: A Nonrandomized Pilot Trial. *Foods* (Basel, Switzerland), 12(14), 2760. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12142760>

Velarde-Salcedo AJ, De León-Rodríguez A, **Calva-Cruz OJ**, Balderas-Hernández VE, De Anda Torres S, Barba de la Rosa AP. 2023. Extraction of bioactive compounds from *Rubus idaeus* waste by maceration and supercritical fluids extraction: the recovery of high added-value compounds. *International Journal of Food Science and Technology*. Doi:10.1111/ijfs.16687.

Calva-Cruz O.J., Badillo-Larios NS, De León-Rodríguez A, Espita-Rangel E, González-García R, Turrubiarres-Martinez E, Castro-Gallardo R, Barba de la Rosa AP. 2022, *Lippia graveolens* HBK oleoresins, extracted by supercritical fluids, showed bacterial activity against multidrug resistance *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* strains. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 18:1-33. Doi:10-1080/03639045.2021.2008417.

Divulgación:

Cano-Gómez CI, Veana F, **Calva-Cruz O.J.**, Espitia-Rangel E, Barba de la Rosa AP. Influencia del consumo de amaranto en el perfil antropométrico y hematológico de niños en edad escolar con talla baja para su edad. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*. 2023, 11(62), 90-101.

Patente sometida:

Barba de la Rosa AP, De León-Rodríguez A, **Calva-Cruz OJ**, García Campoy AH. Proceso basado en fluidos supercríticos para el aprovechamiento integral de semillas y obtención de subproductos de alto valor agregado. Mx/a/2023/000531