



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
SALUD HUMANA**

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PULQUE SOBRE MODELOS AGUDOS
DE DISLIPIDEMIA Y ESTEATOHEPATITIS EN RATA.**

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias de los Alimentos y
Salud Humana

PRESENTA

M. en C. ALICIA RODRÍGUEZ PASTÉN

Director

DR. T. EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Codirectora

DRA. NURY PÉREZ HERNÁNDEZ

Sinodales

DR. JAVIER AÑORVE MORGÁ

DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

San Agustín Tlaxiaca, Hgo., México. Enero 2025



San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., 11 de noviembre 2024
 ICSa-DCASH-noviembre 2024
 Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la M. en C. Alicia Rodríguez Pastén con número de cuenta 155679, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana ha terminado el trabajo de tesis titulado “Evaluación del efecto del pulque sobre modelos agudos de dislipidemia y esteatohepatitis en rata”, y por lo tanto se autoriza la impresión del documento en extenso propuesto por el/la estudiante después de haber sido revisado, analizado y evaluado de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 73, VI del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Lo anterior, en función de que, el/la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 11 de noviembre 2024.

Por tal motivo, solicitamos a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

Dr. Eduardo Fernández Martínez

Director de tesis

Dra. Nury Pérez Hernández

Codirectora

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dr. Javier Añorve Morga

ATENTAMENTE
 Pachuca, Hidalgo, 10 de noviembre de 2023
 “Amor, Orden y Progreso”

Mtro. Enrique Espinosa Aquino
 Directora del Instituto de Ciencias de la Salud
 Dean

Dra. Nelly Cruz Cansino
 Jefa del Área Académica de Nutrición
 Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo
 Coordinadora de Posgrado del ICSa
 Director of Graduate Studies of ICSa

Dra. Esther Ramírez Moreno
 Representante del Programa Educativo ICSa
 Director of Graduate Studies



Apoyos recibidos

Agradecimiento a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación SeCiHTI, antes Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de apoyo 762904.

Dedicatoria

Dedicado a Muffin, a mis padres, Beatriz Pastén y Pedro Rodríguez y, a mis tíos Fernando y Héctor Pastén. Agradezco a la vida tenerlos conmigo y estaré eternamente agradecida con ustedes por siempre ser mi soporte nunca soltar mi mano y sin importar qué, ayudarme siempre a resolver mi vida, no tengo como pagarles, pero los amaré eternamente.

Agradecimientos

A mi director, Dr. Eduardo Fernández, no me alcanza para agradecerle todo el camino recorrido, siempre sin soltarme y respaldándome cuando las cosas se ponen difíciles, gracias por ser mi maestro, pero además mi amigo y confidente, por confiar en mí, enseñarme que puedo y siempre estar ahí para levantarme cuando hay algún tropiezo. Todo mi cariño y agradecimiento eternos para usted.

A mi comité, Dra. Nury Pérez Hernández, Dr. Rubén Jiménez y Dr. Javier Añorve. Gracias infinitas a ustedes por su tiempo, su apoyo y sobre todo su paciencia; gracias por confiar en mí y por acompañarme durante todo este proceso.

Dr. Luis Soria, Dra. Raquel Cariño, Dra. Elizabeth Pérez y Dr. Ángel Bañuelos, mil gracias por todo el apoyo que siempre me han brindado, gracias por su tiempo, su paciencia y por siempre estar para darme una mano.

Al Sr. Mario Islas, gracias por su disposición y su entusiasmo para colaborar en este proyecto y proveer siempre el pulque para este estudio, aún en fines de semana, días festivos, o a horas muy tempranas, le agradezco todo su apoyo durante todo este proyecto.

A mis compañeros del IPN, Dr. Sergio, Dr. Misael y Dr. Carlos. Gracias infinitas por todo su apoyo, por su hospitalidad durante mi tiempo en el laboratorio, sin su ayuda no habría podido lograrlo, ¡gracias!

A la Dra. Elvia Pérez Soto, mil gracias por todo el apoyo y por animarme e impulsarme a continuar, gracias por coincidir y por todos estos años de amistad.

A la Dra. Dulce María Moreno, tu apoyo ha sido invaluable, mil gracias por toda la ayuda, los ánimos, el acompañamiento, pero sobre todo por tu amistad de tantos años, es un placer estar rodeada de personas tan maravillosas como tu ¡Gracias!

A Mariana Alvarado. Mayis, no tengo palabras para agradecerte tantos años de apoyo, trabajo en equipo, pero, sobre todo, amistad. Siempre has sido pieza clave para cumplir mis objetivos porque sin importar qué, has estado ahí. No me cansaré de agradecerte y agradecer a la vida por coincidir.

Al Dr. Erick Oviedo, gracias por el apoyo incondicional y por los desvelos en el laboratorio, pero sobre todo gracias por tenerme tanta paciencia, por estar en las buenas, en las malas, en las peores e incluso en los momentos de hipocondría. Gracias por tu amistad y tu cariño, gracias por todo.

Al Dr. José Antonio Estefes, amigo, no sé cómo pagarte todo el apoyo que me has dado, por incluirme siempre en los planes, por los buenos ratos y por soportar mi carácter tan feo, ten por seguro que siempre que necesites, estaré para darte una mano como tu lo haces siempre conmigo, ¡gracias!

A mis amigas incondicionales Karen y Araceli, bueno, las palabras no me alcanzan para decirles cuanto agradezco que estén en mi vida, siempre apoyándome en todos los aspectos, siempre dándome ánimos para continuar, siempre dándome la mano para levantarme, gracias infinitas por estar conmigo.

A mi hermana, mi cuñado y Thom, por siempre estar para mí, siempre impulsarme a seguir y por todos los ratos buenos que comparten conmigo. Por ser siempre guías, cuidarme tanto, creer en mi y siempre hacerme reír. Los quiero.

A la Dra. Laura y la Dra. Yari, gracias por tantos años de amistad, por siempre estar cuando las cosas se ponen difíciles, por todo su apoyo y sobre todo por animarme a empezar esta aventura juntas y nunca dejarme sola. ¡Gracias!

A mis amigos Elmin, Psidra (J), Olivia, Jessy y Karina, son el mejor equipo y les agradezco por estar siempre para sacarme una sonrisa aún en los días más pesados, ¡gracias!

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. MARCO TEÓRICO.....	1
Enfermedades hepáticas y dislipidemia.....	1
Mecanismos de inducción de EHNA y dislipidemia experimentales.....	5
Marcadores de daño hepático y dislipidemia.....	6
Tratamientos utilizados en dislipidemia y EHNA.....	8
II. ANTECEDENTES.....	9
Microbiota y sus metabolitos activos	9
Propiedades de los probióticos en enfermedades hepáticas.....	10
El pulque.....	12
Efecto de prebióticos y probióticos aislados del aguamiel y el pulque.....	13
Efecto de prebióticos y probióticos en dislipidemia y daño hepático.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
IV. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
V. HIPÓTESIS.....	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Fase 1. Caracterización microbiológica y química del pulque	17
Análisis microbiológico.....	17
Conteo de microorganismos.....	17
Identificación de especies predominantes.....	17
Extracción de ADN por método orgánico fenol-cloroformo isoamílico.....	18
Amplificación del segmento 16S rDNA y 18S rDNA por PCR.....	18

Secuenciación de los segmentos 16S rDNA y 18S rDNA.....	18
Análisis químico proximal.....	19
Contenido etanólico.....	19
Cuantificación de fenoles totales.....	19
6.2 Fase 2. Análisis <i>in vivo</i>	19
Análisis bioquímico.....	21
Análisis coproparasitoscópico.....	22
Análisis histológico.....	22
Análisis molecular: Lipidómica.....	23
Análisis estadístico.....	23
VII. RESULTADOS.....	24
7.1 Fase 1. Caracterización microbiológica y química del pulque.....	24
Análisis microbiológico.....	24
Conteo de microorganismos.....	24
Identificación de especies predominantes.....	24
Análisis químico proximal.....	27
Contenido etanólico.....	27
Cuantificación de fenoles totales.....	27
7.2 Fase 2. Análisis <i>in vivo</i>	29
Análisis bioquímico.....	29
Análisis coproparasitoscópico.....	45
Análisis histológico.....	45
Análisis molecular: Lipidómica.....	50
VIII. DISCUSIÓN.....	59
IX. CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de prebióticos y probióticos en daño hepático y dislipidemia.....	14
Tabla 2. Distribución y tratamiento administrado por grupo.....	20
Tabla 3. Conteo de microorganismos en pulque natural (PN) y pulque envasado (PE).....	24
Tabla 4. Análisis químico proximal, contenido etanólico y de fenoles totales en pulque natural (PN) y pulque envasado (PE).....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Progreso de la enfermedad hepática metabólica (EHmet).....	3
Figura 2. Relación entre dislipidemia y EHmet.....	5
Figura 3. Biotransformación de ácidos biliares.....	11
Figura 4. Electroforesis en gel.....	25
Figura 5. Electroferogramas de bacterias en pulque natural (PN).....	25
Figura 6. Electroferogramas de levaduras en pulque natural (PN).....	26
Figura 7. Panel del análisis histológico.....	49
Figura 8. Espectro representativo general de ¹ H NMR	50
Figura 9. Espectros representativos (alineado).....	51
Figura 10. Gráfico de puntuación de PCA (EHNA).....	52
Figura 11. Diagrama de cargas	52
Figura 12. Diagrama de coeficiente de correlación	53
Figura 13. Gráfico de puntuación de PCA (DSL 24 h)	54
Figura 14. Diagrama de cargas	54

Figura 15. Diagrama de coeficiente de correlación	55
Figura 16. Gráfico de puntuación de PCA (DSL 48 h)	56
Figura 17. Diagrama de cargas.....	56
Figura 18. Diagrama de coeficiente de correlación	57
Figura 19. Gráfica de puntuación para la importancia de la variable para la predicción (VIP).....	58
Figura 20. Mecanismo de acción de FXR y TGR-5.....	65

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Fosfatasa alcalina - EHNA.....	29
Gráfica 2. γ -Glutamil transpeptidasa - EHNA.....	29
Gráfica 3. Bilirrubinas directas - EHNA.....	30
Gráfica 4. Bilirrubinas totales - EHNA.....	30
Gráfica 5. Glucógeno - EHNA.....	31
Gráfica 6. Glucosa - EHNA.....	31
Gráfica 7. Alanina aminotransferasa - EHNA.....	32
Gráfica 8. Lipoperoxidación - EHNA.....	32
Gráfica 9. Catalasa - EHNA.....	33
Gráfica 10. Triglicéridos - EHNA.....	34
Gráfica 11. Colesterol total - EHNA.....	34
Gráfica 12. LDL - EHNA.....	35
Gráfica 13. HDL - EHNA.....	35
Gráfica 14. Lípidos totales - EHNA.....	35
Gráfica 15. Fosfatasa alcalina - dislipidemia.....	36

Gráfica 16. γ -Glutamil transpeptidasa - dislipidemia	36
Gráfica 17. Bilirrubinas directas - dislipidemia.....	37
Gráfica 18. Bilirrubinas totales - dislipidemia.....	37
Gráfica 19. Glucógeno - dislipidemia.....	38
Gráfica 20. Glucosa - dislipidemia.....	38
Gráfica 21. Alanina aminotransferasa - dislipidemia	39
Gráfica 22. Lipoperoxidación - dislipidemia.....	40
Gráfica 23. Catalasa - dislipidemia.....	41
Gráfica 24. Triglicéridos - dislipidemia.....	42
Gráfica 25. Colesterol total - dislipidemia.....	42
Gráfica 26. LDL - dislipidemia.....	43
Gráfica 27. HDL - dislipidemia.....	43
Gráfica 28. Lípidos totales - dislipidemia.....	44

ABREVIATURAS

AB – Ácidos biliares totales

ALT – Alanina-aminotransferasa

BT – Bilirrubinas totales

CAT - Catalasa

COL - Colesterol

DSL - Dislipidemia

EE – Error estándar

EHmet – Enfermedad hepática metabólica

EHNA – Esteatohepatitis no alcohólica

EN – Enterogermina

FA – Fosfatasa alcalina

GGTP – γ -Glutamyl transpeptidasa

GLN - Glucógeno

GLS - Glucosa

HCC - Hepatocarcinoma

HCOL - Hipercolesterolemia

HDL – Colesterol de alta densidad

HE – Hematoxilina/eosina

HGNA - Hígado graso no alcohólico

HMG-CoA – Hidroximetilglutaril-CoA reductasa

HP - Hidroxiprolina

HSC – Células estelares

HTG – Hipertrigliceridemia

i. p. – Administración intraperitoneal

LDL – Colesterol de baja densidad

LP – Lipoperoxidación/ peroxidación lipídica

LPL – Lipoproteinlipasa

LIP - Lipasa

LT – Lípidos totales

MDA - Malondialdehído

MRS – Agar de Man, Rogosa y Sharpe

p. o. - Administración vía oral

PDA – Agar papa dextrosa

PE – Pulque envasado

PN – Pulque natural

RS – Rojo sirio

SI – Solución isocalórica

SOD – Superóxido dismutasa

TBARS – Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

TC, CCl₄ – Tetracloruro de carbono

TG - Triglicéridos

TI - Tiloxapol

VLDL – Colesterol de muy baja densidad

VTC – Vehículo de tetracloruro

VTI – Vehículo de tiloxapol

RESUMEN

La enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (EHmet, o MASLD en inglés) antes conocida como esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico (HGNA) que se caracteriza por el incremento de colesterol (COL) y triglicéridos (TG) en los hepatocitos; generalmente progresa a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) que implica, además, un proceso inflamatorio y necrótico, puede continuar evolucionando hasta desarrollar cirrosis y hepatocarcinoma (HCC). Algunos otros padecimientos están relacionados con el desarrollo de EHNA, por ejemplo, la dislipidemia (DSL) que es la hipercolesterolemia (HCOL) e hipertrigliceridemia (HTG); estos padecimientos causan un gran número de muertes a nivel mundial, por ello es importante continuar con la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento. El interés por el consumo de alimentos funcionales ha incrementado recientemente debido a los efectos benéficos que pueden proporcionar a la salud. El pulque es una bebida fermentada mexicana, de bajo contenido alcohólico en la que varios estudios realizados han mostrado la presencia de un gran número de especies consideradas probióticos, y también se han registrado algunos de sus efectos sobre trastornos metabólicos y daño hepático.

En este trabajo se realizaron análisis microbiológicos y químicos al pulque para conocer su composición; además, se evaluó su efecto en un modelo agudo de DSL y EHNA inducidas por tiloxapol (TI) y tetracloruro de carbono (TC, CCl₄), respectivamente. Para ello, se utilizaron 16 grupos de ratas Wistar macho (grupos sin daño n=8; grupos con daño n=10) con una masa de 180-200 g; fueron administradas durante 28 días con pulque envasado o natural (PE, PN), Enterogermina® (EN) o solución isocalórica diariamente (6 mL/kg) y posteriormente con TI (400 mg/kg, i.p.) o TC (2.5 mL/kg, p.o.). Al finalizar el tratamiento, se llevaron a cabo las determinaciones bioquímicas, histológicas, y moleculares. Con ello se pretendió obtener evidencias que avalaran su uso futuro como alimento funcional con efecto protector contra EHmet y dislipidemia.

ABSTRACT

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (METD, or MASLD in English), previously known as hepatic steatosis or non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is characterized by increased cholesterol (COL) and triglycerides (TG) in hepatocytes; it generally progresses to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which also involves an inflammatory and necrotic process; it can continue to evolve until it develops cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Some other conditions are related to the development of NASH, for example, dyslipidemia (DSL), which is hypercholesterolemia (HCOL), and hypertriglyceridemia (HTG); these conditions cause a large number of deaths worldwide, so it is important to continue searching for new alternatives for their treatment. Interest in consuming functional foods has recently increased due to the beneficial effects they can provide to health. Pulque is a Mexican fermented beverage with a low alcohol content. Several studies have shown the presence of many species considered probiotics, and some of its effects on metabolic disorders and liver damage have also been recorded.

In this work, microbiological and chemical analyses were performed on pulque to determine its composition; in addition, its effect was evaluated in an acute model of DSL and NASH induced by tyloxapol (TI) and carbon tetrachloride (TC, CCl₄), respectively. For this purpose, 16 groups of male Wistar rats were used (groups without damage n=8; groups with damage n=10) with a mass of 180-200 g; they were administered for 28 days with bottled or natural pulque (PE, PN), Enterogermina® (EN) or isocaloric solution daily (6 mL/kg) and subsequently with TI (400 mg/kg, i.p.) or TC (2.5 mL/kg, p.o.). At the end of the treatment, biochemical, histological, and molecular determinations were carried out. The aim was to obtain evidence to support its future use as a functional food with a protective effect against EHmet and dyslipidemia.

I. MARCO TEÓRICO

Enfermedades hepáticas y dislipidemia

El hígado es considerado uno de los órganos más importantes debido a que lleva a cabo diversas funciones entre las que destaca el metabolismo de proteínas, carbohidratos, y lípidos (Kuntz & Kuntz, 2006). Entre sus funciones, cabe destacar la inactivación y desintoxicación de hormonas y sustancias extrañas, síntesis de sales biliares y conjugación de pigmentos biliares (bilirrubina), entre otras; por ello, es vital mantener su integridad morfológica y funcional (Muriel, 2017).

Factores diversos pueden dañar al hígado poniendo en riesgo la salud e incluso la vida de las personas; entre las causas principales relacionadas con el daño hepático se encuentran el consumo excesivo y persistente del alcohol, el uso constante de algunos fármacos (paracetamol), la exposición continua a diversos agentes químicos (solventes), algunos virus, una dieta desequilibrada, algunos hábitos (tabaquismo, sedentarismo), o factores genéticos (Kuntz & Kuntz, 2006; Muriel, 2017). Estos, causan principalmente dos tipos de daño:

Colestasis se define como un desorden agudo o crónico en la colepoyesis y la secreción biliar en los hepatocitos y células ductulares, lo que se considera como colestasis intrahepática, así como el estancamiento mecánico o funcional del flujo biliar en los conductos biliares intra y extrahepáticos con los componentes de la bilis pasando a la sangre, lo que se considera colestasis extrahepáticas (Kuntz & Kuntz, 2006; Fernández-Martínez, 2017). La colestasis presenta como síntoma principal el aumento de ácidos biliares y bilirrubinas en suero, además, incrementa el nivel de enzimas indicadoras de colestasis; en consecuencia, se presenta ictericia, que es la pigmentación amarillenta de los tejidos por la acumulación tisular de la bilis (Muriel, 2017).

Necrosis, es la muerte celular causada, por ejemplo, por procesos de estrés oxidativo e inflamación, en los cuales los radicales libres dañan considerablemente el tejido hepático; por ello, dicho proceso contribuye a la pérdida de la estructura y funcionalidad hepática (Kuntz & Kuntz, 2006; Muriel, 2017).

Ambos tipos de daño conducen a enfermedades hepáticas como la fibrosis, EHmet, antes llamada enfermedad por hígado graso no alcohólico o esteatosis hepática, y la esteatohepatitis (EHNA) que generalmente se agravan hasta el desarrollo de cirrosis, e incluso, hepatocarcinoma (Hernández-Conde & Calleja, 2023; Bernal-Reyes *et al.*, 2019).

Actualmente, se estima que afecta al 25% de la población mundial; en 2019 se analizaron las pruebas de laboratorio de aproximadamente 1500 pacientes y resultó una prevalencia de 30.9%. Particularmente, la EHmet se reporta con una prevalencia de 45% en población hispana principalmente en hombres mayores de 50 años con mala alimentación acompañada de sedentarismo; en población pediátrica se estima una prevalencia entre 3 – 10% e incrementa hasta 70% en niños con obesidad (Bernal-Reyes *et al.*, 2023; Mantovani *et al.*, 2020). Dentro de los principales factores de riesgo están padecimientos asociados como la dislipidemia, de esta enfermedad se han reportado prevalencias a nivel mundial hasta del 57 %. El 80 % de los pacientes con dislipidemia evolucionan a esteatosis hepática y, posteriormente, a esteatohepatitis que es considerada la hepatopatía crónica más común a nivel mundial (Fernández-Martínez *et al.*, 2019). En los principales países de Latinoamérica, las prevalencias reportadas de hepatopatía crónica son 35 % en Brasil, 26 % en Colombia, 23% en Chile y se estima que en las próximas décadas alcance 50% en México, además, se estima que el 43% de personas con esteatosis hepática evoluciona a esteatohepatitis (Fernández-Martínez *et al.*, 2019; de Oliveira *et al.*, 2019). En general, se estima una mortalidad de 15.4 personas con EHmet y 25.6 con EHNA por cada 1000 personas/año (Mantovani *et al.*, 2020).

Específicamente, la fibrosis se define como el depósito excesivo de proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágena; esto genera una cicatrización anormal como respuesta a la aparición de necrosis. Las células estelares (HSC por sus siglas en inglés), en el curso de hepatopatías crónicas sufren una activación en la que adquieren funciones similares a miofibroblastos, secretando citocinas proinflamatorias y profibrogénicas. La distribución del material fibroso puede aparecer en zona periportal o en zona pericentral; en fases avanzadas, las bandas de colágena son muy evidentes y unen varios espacios porta que se denominan puentes de fibrosis (Kisseleva & Brenner, 2021).

La EHmet o esteatosis hepática se define como un trastorno metabólico caracterizado por la acumulación de lípidos hepáticos y conlleva un incremento de COL y TG en hepatocitos, además, es considerada el componente hepático del síndrome metabólico e incrementa a la par de trastornos como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Hernández-Conde & Calleja, 2023; Bernal-Reyes *et al.*, 2019).

La EHmet, generalmente progresa a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), en la que se involucra un proceso necroinflamatorio, por lo que, a nivel histológico se presenta inflamación principalmente en zonas lobulillar y portal, degeneración balonizante, así como

infiltración de neutrófilos y linfocitos; este proceso se debe a la secreción elevada de citocinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6, e IL-1 β cuya producción se asocia con la activación del factor nuclear NF- κ B; la EHNA, puede progresar hasta cirrosis e incluso, hepatocarcinoma (Figura 1).

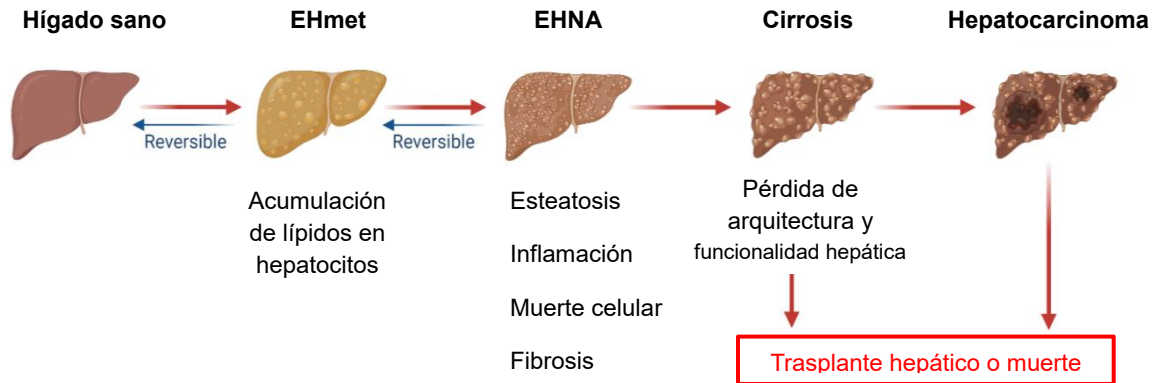


Figura 1. Progreso de la enfermedad hepática metabólica (EHmet). La EHmet progresa a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), produciendo cirrosis hasta el establecimiento de carcinoma hepatocelular (HCC) o hepatocarcinoma (Bernal-Reyes *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018; Fraile *et al.*, 2021).

Se considera que la cirrosis desarrollada por el progreso de EHmet será la principal causa de trasplante en algunos años (Bernal-Reyes *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018; Fraile *et al.*, 2021). Existen factores diversos asociados a la EHNA, entre ellos, la obesidad, diabetes mellitus (generalmente tipo 2 por resistencia a la insulina), procedimientos quirúrgicos como el “bypass” intestinal o gastroplastia, hábitos alimenticios, factores genéticos, el tratamiento con algunos fármacos, y la exposición a agentes químicos hepatotóxicos e incluso, personas no obesas o que no cumplen con el diagnóstico de síndrome metabólico pueden presentar EHNA (Bernal-Reyes *et al.*, 2019; Ampuero *et al.*, 2018). Otro factor importante es la alteración de la microbiota gastrointestinal que puede afectar al hígado facilitando al traslocación bacteriana, alterando el metabolismo de ácidos grasos, o mediante la alteración del metabolismo de los ácidos biliares mediante la inhibición de algunos receptores (Ampuero *et al.*, 2018).

Con relación a lo anterior, también se desencadena estrés oxidativo que conduce al inicio del proceso de apoptosis, la alteración de la respuesta del sistema inmunitario y la activación de células estelares (HSC) que participan en el proceso de desarrollo de fibrosis.

Durante el daño oxidativo, el organismo es capaz de responder, mediante la producción de antioxidantes endógenos, tales como la catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), entre otros; este proceso de protección se asocia con la activación del factor membranal Nrf-2, que está implicado en la regulación positiva de genes antioxidantes (Muriel, 1998; Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, el riesgo principal al desarrollarse alguna de las hepatopatías antes mencionadas, es el progreso o la evolución a cirrosis, que representa el estado final de una hepatopatía crónica en la cual gran parte del tejido hepático funcional ha sido reemplazado por tejido fibroso; aquella se caracteriza por una fibrosis difusa y por la conversión de la arquitectura hepática normal en nódulos de estructura anormal. El tejido fibroso reemplaza al tejido normal del hígado y forma bandas constrictoras que interrumpen el flujo en los canales vasculares y las vías biliares hepáticas. La interrupción de los canales vasculares predispone a la hipertensión portal y sus complicaciones, a la obstrucción de los canales biliares y a una pérdida de células hepáticas que lleva a la insuficiencia hepática. La reversión de este estadio final del daño hepático es compleja y persiste el riesgo del desarrollo de hepatocarcinoma (HCC); por ello, generalmente se requiere de trasplantes hepáticos y el pronóstico es poco prometedor (Sheka *et al.*, 2020; Sánchez-Crisóstomo *et al.*, 2019; Younossi *et al.*, 2021; Schwabe *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018).

Uno de los principales factores para el desarrollo de la EHNA es la dislipidemia, que implica una alteración en la concentración de lípidos en la sangre; principalmente, se presenta como HTG o HCOL, es decir, un incremento en los niveles séricos de TG o COL y de baja densidad (LDL), respectivamente, así como una disminución del COL de alta densidad (HDL). Los factores de riesgo principales en esta enfermedad son el tabaquismo, la hipertensión arterial, cardiopatía coronaria, antecedentes genéticos, sexo, edad, y hábitos alimenticios junto con la falta de actividad física; además, este trastorno metabólico no causa síntomas, lo que hace mayor el riesgo de desarrollar EHNA, aterosclerosis, o cualquier trastorno cardiovascular o metabólico a los que se asocia (Pappan *et al.*, 2024; Lozano, 2005; Vega-Badillo, 2017).

La relación entre ambos padecimientos se debe a que durante el desarrollo de EHmet, se presenta un incremento en la lipólisis, lo que conduce a un aporte elevado de ácidos grasos libres al hígado; de este modo, hay una sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y su secreción es insuficiente, provocando la acumulación lipídica. Lo anterior, sumado a una baja actividad de la lipoproteinlipasa, conducen finalmente a HTG,

HCOL, e incluso al desarrollo de aterosclerosis. El proceso mencionado se esquematiza en la Figura 2 (Pathak & Chiang, 2019).

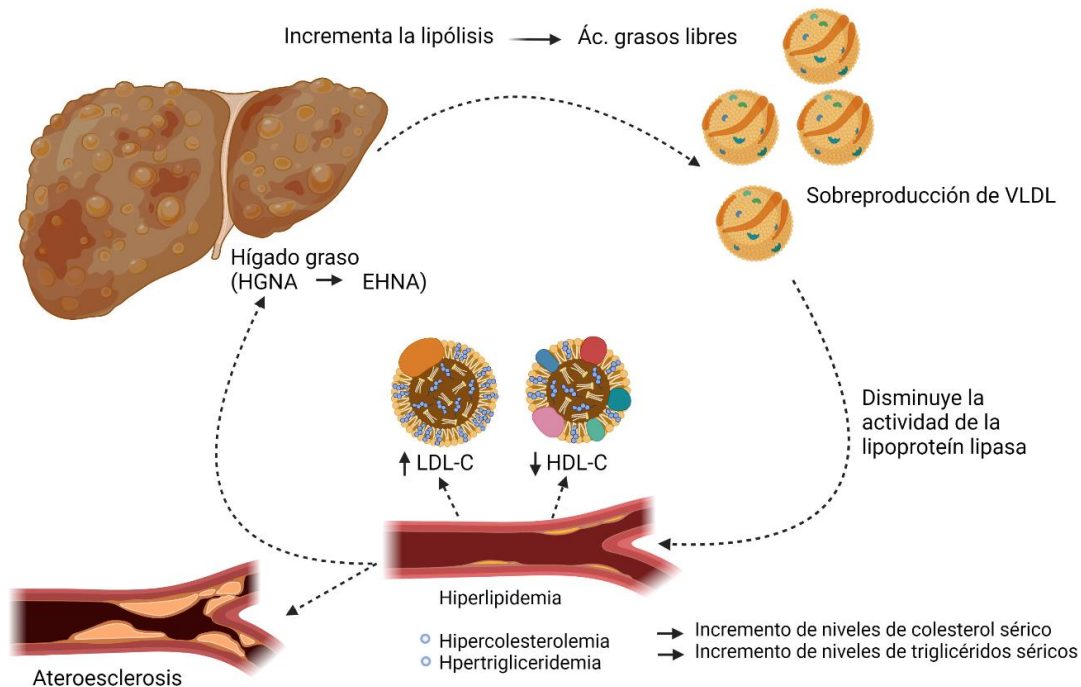


Figura 2. Relación entre dislipidemia y EHmet. La dislipidemia se manifiesta como hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, resulta del incremento de los niveles séricos de triglicéridos, colesterol total, LDL-C y/o la disminución de HDL-C; por tanto, supone el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades como la aterosclerosis y la EHmet. Ambos trastornos son componentes del síndrome metabólico; sin embargo, también se presentan, por ejemplo, en personas sin obesidad, sin diabetes o sin resistencia a la insulina. Además, se estima que la prevalencia de ambos aumenta a la vez y que la EHmet podría ser la principal causa de hepatocarcinoma y, por tanto, la primera indicación de trasplante hepático (Kwak & Kim, 2018; Fraile *et al.*, 2021; Rodríguez-Pastén *et al.*, 2023; Younossi *et al.*, 2021).

Mecanismos de inducción de EHNA y dislipidemia experimentales

El tetracloruro de carbono (TC, CCl_4), es un agente químico que, al ser hepatotóxico, ha sido utilizado ampliamente como modelo experimental de daño hepático y su mecanismo está mediado por la formación de radicales libres, provocando estrés oxidativo (Ingawale *et al.*, 2014); TC es metabolizado en el citocromo P450 (CYP450), específicamente en las isoformas CYP2E1, CYP2B1, CYP2B2, aunque también podría estar implicada la isoforma CYP3A. El proceso de estrés oxidativo comienza cuando el TC sufre una deshalogenación que da lugar a la formación del radical triclorometilo (CCl_3^{\cdot}), que puede ser reactivo con

aminoácidos, lípidos o nucleótidos (Weber *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2005). A partir de las 24 h posteriores a la administración comienza el proceso de necrosis, y la inducción de esteatosis comienza por el bloqueo de la secreción de VLDL de los hepatocitos a circulación, ya que daña el funcionamiento del aparato de Golgi afectando así la síntesis, maduración, y secreción de VLDL, además, induce daño en las membranas (afecta la permeabilidad), promueve la vacuolización ya que hay un incremento excesivo en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos acompañada de la inhibición de proceso de β -oxidación; la exposición persistente al CCl_4 , se ha asociado con fibrosis, cirrosis, y hepatocarcinoma (Weber *et al.*, 2003; Boll *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002).

Por otro lado, el tiloxapol (TI) (Tritón WR1339), es un agente surfactante que ha sido utilizado ampliamente como modelo experimental en animales para inducir hiperlipidemias, debido a que bloquea el aclaramiento de lipoproteínas ricas en TG y el daño comienza a partir de las 24 h posteriores a la administración intraperitoneal; su efecto se debe a que produce la alteración de las enzimas lipolíticas que son responsables de la hidrólisis de lípidos séricos (Rasouli *et al.*, 2016; Ansarullah *et al.*, 2009); también, afecta a las VLDL haciéndolas refractivas a las lipoproteinlipasas, y de este modo, promueve un retardo en su remoción y estimula la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA), que es la principal implicada en la síntesis de COL intrahepático, por lo tanto conduce a un incremento de COL y TG séricos (de Sousa *et al.*, 2017; Levine & Saltzman, 2007).

Marcadores de daño hepático y dislipidemia

Durante el daño hepático, el incremento de algunas enzimas está asociado con procesos de colestasis, necrosis, o estrés oxidativo, así como algunos marcadores no enzimáticos que señalan daño membranal, funcionalidad hepática, y que tienen relevancia clínica; es posible detectar colestasis mediante la cuantificación sérica de algunas enzimas citosólicas debido a que, desde etapas tempranas, comienzan a fugarse como consecuencia del incremento de la permeabilidad membranal, y si el daño progresa y comienza un proceso de necrosis, las enzimas mitocondriales serán liberadas y su nivel sérico incrementará. A continuación, se describen los principales marcadores del perfil hepático (Woodman, 1988; Kumar & Anamika, 2023).

Fosfatasa alcalina (FA), es una enzima que cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfatos orgánicos con un pH alcalino óptimo, por lo tanto, el incremento de esta enzima en plasma es un indicador de colestasis; esta enzima se encuentra en la mayoría de los tejidos, pero particularmente en concentraciones más elevadas en los osteoblastos del hueso y las

células del tracto hepatobiliar, la pared intestinal, los túbulos renales, y la placenta (Kumar & Anamika, 2023). Otro indicador, es gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP), esta cataliza la transferencia del grupo γ -glutamil de péptidos a otros péptidos o aminoácidos, por lo tanto, su liberación a plasma es el marcador más sensible de colestasis o de lesión hepática y permite medir la función excretora de la bilis; se encuentra principalmente en hígado, riñones, páncreas y próstata (Zhang *et al.*, 2019; Kumar & Anamika, 2023).

Alanina-aminotransferasa (ALT), es una enzima citosólica, que cataliza la transferencia de un grupo α -amino de alanina al grupo α -cetoácido alfaoxoglutarico; el incremento de esta enzima en plasma es un indicador de la destrucción celular, es decir, implica procesos de necrosis, está presente en el hígado, músculo cardíaco y esquelético, riñones y eritrocitos (Kumar & Anamika, 2023; Zhang *et al.*, 2019). La catalasa, es un antioxidante endógeno que se localiza en los peroxisomas; es un indicador de estrés oxidativo y funcionalidad hepática, ya que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), involucra reacciones redox mediante las cuales se produce la enzima libre, O_2 , y agua; por lo tanto, si la actividad de la catalasa disminuye, el H_2O_2 se acumula desencadenando estrés oxidativo (Contreras-Zentella *et al.*, 2022). La peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LP), ocurre en respuesta al estrés oxidativo, esto se debe a que las especies reactivas de oxígeno (ROS) oxidan a los lípidos que componen a las bicapas lipídicas de la membrana; el grado de LP se puede determinar mediante la cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente el malondialdehído (MDA) producido en gran medida durante la peroxidación lipídica, por lo tanto, se utiliza para medir estrés oxidativo y daño membranar (Mas-Bargues *et al.*, 2021).

Otros valores que se utilizan como indicadores de colestasis y funcionalidad/estrés hepáticos son los niveles de bilirrubina sérica y glucógeno hepático, respectivamente. La bilirrubina, es el producto catabólico de la hemoglobina; en forma no conjugada (bilirrubina indirecta, BI) ingresa al hígado, donde se convierte en bilirrubina conjugada (bilirrubina directa, BD) por la enzima UDP-glucuroniltransferasa; si la concentración de bilirrubina incrementa (indicador de colestasis), puede acompañarse de ictericia y el incremento de BI junto con la disminución de BD se relaciona con sobreproducción de bilirrubina o bien, de la disminución de la captación hepática o de la conjugación (puede ser debido a ambas), lo que refleja algún problema en la funcionalidad hepática (Gowda *et al.*, 2009). El glucógeno hepático, representa la principal fuente de energía y su almacenamiento en el hígado es primordial para mantener la homeostasis de la glucosa; por lo anterior, la alteración del

metabolismo del glucógeno en trastornos hepáticos y metabólicos puede provocar una disfunción hepática grave, además se considera un marcador muy sensible de estrés de este órgano (Soon & Torbenson, 2023).

Los lípidos, se absorben en los intestinos, se transportan a través de lipoproteínas y tienen funciones como fuente de energía, producción de esteroides o ácidos biliares; un perfil lipídico considera principalmente el colesterol total (COLT), el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL), las lipoproteínas de alta densidad (HDL), los triglicéridos y lípidos totales ya que, como se mencionó previamente, la alteración del equilibrio de estos provoca dislipidemia (Pappan *et al.*, 2024).

Tratamientos utilizados en dislipidemia y EHNA

En el tratamiento para la dislipidemia, se han utilizado alternativas como el consumo de omega-3 y el ácido nicotínico que reducen el daño entre un 30 y 50%, la administración de estatinas (reducción del daño entre 20-40%) y, fibratos (reducción del daño entre 40-60%) (Stewart *et al.*, 2020; Husain *et al.*, 2022; Lim, 2023).

Particularmente, para el tratamiento de la EHmet y EHNA, además de procedimientos quirúrgicos, el tratamiento consiste en la administración de orlistat, colina, N-acetilcisteína, vitamina E, vitamina C, betaína, ácido ursodesoxicólico, ácidos grasos libres (hipolipemiantes), pentoxifilina, y en general algunos otros fármacos agonistas de receptores activados por los proliferadores peroxisomales (PPAR)- α , γ , y δ (pioglitazona, elafibranor, y saroglitazar) y receptor nuclear X de farnesoides (FXR, ácido obeticólico); también, es necesario un cambio en el estilo de vida, principalmente en la alimentación con la reducción en la ingesta calórica, el consumo de verdura, legumbres, frutos secos, cereales y otros alimentos ricos en fibra con bajo índice glucémico con aporte de una cantidad adecuada de antioxidantes, así como la actividad física regular (Ampuero *et al.*, 2018; Zhang & Yang, 2021). Otra alternativa en la que el trabajo presente pone interés particular y que ha sido ampliamente estudiada para validar su efecto como tratamiento o protección contra estos daños, ha sido el consumo de probióticos para la regulación de la microbiota gastrointestinal y el papel que tienen estos microorganismos y sus metabolitos en la modulación del metabolismo lipídico (Zhang *et al.*, 2020; Craven *et al.*, 2020).

II. ANTECEDENTES

Microbiota y sus metabolitos activos

El microbioma humano es el material genético combinado de todos los microbios que viven en y dentro del cuerpo humano, incluidas bacterias, hongos, protozoos y virus. La microbiota es el conjunto de los microorganismos presentes en un entorno específico, mientras que el microbioma incluye también sus actividades y funciones (Shanahan *et al.*, 2021).

El tracto gastrointestinal contiene una comunidad microbiana diversa. Los filos microbianos intestinales dominantes son Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, y Verrucomicrobia, y los dos phyla Firmicutes y Bacteroidetes representan el 90% de la microbiota intestinal. El filo Firmicutes está compuesto por géneros diferentes como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, y *Ruminococcus*. Los géneros de *Clostridium* representan el 95% de los filos de Firmicutes. Los bacteroidetes incluyen géneros predominantes como *Bacteroides* y *Prevotella*. Asimismo, el filo Actinobacteria está representado por el género *Bifidobacterium* y es proporcionalmente menos abundante (Ruan *et al.*, 2020; Johnson, 2020). Los miembros de Firmicutes son eficientes para llevar a cabo la descomposición de la fibra no digerible en carbohidratos simples, estos se absorben y almacenan rápidamente como depósitos lipídicos. Un exceso de Firmicutes significa que se absorben hasta un 12% más de calorías en cada comida, por lo tanto, los bacteroidetes reconocen este exceso y metabolizan los carbohidratos excedentes para poder ser excretados a través de las heces. El equilibrio entre Firmicutes y Bacteroides, denominada eubiosis, depende de diversos factores, entre los principales, se encuentran, la dieta y el consumo de diversos fármacos, principalmente antibióticos. Sin embargo, la desregulación de la microbiota, llamada disbiosis (conocida también como disbacteriosis, puede prevenirse y corregirse mediante el consumo de prebióticos y probióticos (Ruan *et al.*, 2020; Clavel *et al.*, 2014; Johnson, 2020; Boer *et al.*, 2019; Rodríguez-Pastén *et al.*, 2023).

Los prebióticos se definen como "un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos huésped que confieren beneficios para la salud", en general son fibras vegetales, que modifican el medio intestinal y promueven o estimulan selectivamente el crecimiento y actividad de microorganismos con efectos benéficos; por otro lado, los probióticos se definen como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero" (Zendebodi *et al.*, 2020; Gibson *et al.*, 2017; Bindels *et al.*, 2015). Para que un organismo sea considerado

probiótico, debe cumplir con varios criterios: no ser patógenos, sobrevivir en un pH ácido, y ser resistentes al efecto de jugos gástricos y de sales biliares, además, deben tener capacidad de adhesión a las células epiteliales y no desplazar a la microbiota presente por naturaleza (Quigley, 2019; Thursby & Juge, 2017; Zendeboodi *et al.*, 2020).

La combinación de prebióticos y probióticos es llamada simbiótico. El uso de simbióticos puede sinergizar el efecto beneficioso sobre el hospedero; por lo tanto, esta combinación se ha mostrado prometedora en el tratamiento y la prevención de trastornos metabólicos y gastrointestinales. Se ha propuesto el término paraprobiótico para referirse a probióticos muertos, células inactivas o fracciones celulares. Específicamente, se ha demostrado que las "células no viables (intactas o no) o los extractos de células que confieren salud al hospedero cuando se administran en cantidades adecuadas y benefician la salud", por ejemplo, al inhibir la adhesión de bacterias patógenas, y han mostrado resultados inmunitarios positivos. Además, a diferencia de los probióticos, los paraprobióticos no pierden bioactividad cuando se administran junto con antibióticos o agentes antifúngicos (Zendeboodi *et al.*, 2020). Por lo tanto, pueden ser útiles en personas con inmunidad reducida, barrera intestinal alterada, sepsis, y bebés prematuros. Del mismo modo, se ha propuesto que los probióticos pueden producir postbióticos. Los postbióticos se han definido como sobrenadantes biogénicos libres de células, metabolitos y desechos metabólicos de la actividad probiótica. También se define como cualquier efecto obtenido de los metabolitos de los probióticos o cualquier molécula extraída o secretada que directa o indirectamente ofrezca beneficios para la salud del hospedero. Estos incluyen enzimas, exopolisacáridos, y endopolisacáridos, proteínas de superficie, vitaminas, ácidos orgánicos, ácidos grasos, y péptidos (Zendeboodi *et al.*, 2020; Gibson *et al.*, 2017; Tsilingiri & Rescigno, 2013).

Propiedades de los probióticos en enfermedades hepáticas

Se han realizado estudios diversos que han demostrado que los probióticos tienen capacidad moduladora sobre la microbiota, la permeabilidad intestinal, y la respuesta inmunitaria, además de conferir beneficios frente a diversos padecimientos como trastornos metabólicos, diabetes y enfermedades hepáticas, tales como EHmet, EHNA, cirrosis, e incluso en la prevención de infecciones en personas con trasplante hepático. Por ello, se ha sugerido su uso como tratamiento de hepatopatías y otras enfermedades (Winston & Theriot, 2020; Soriano *et al.*, 2013). En general, la microbiota gastrointestinal juega un papel crucial en enfermedades como la EHNA, debido a que es ampliamente conocido el hecho de que el organismo es capaz de sintetizar ácidos biliares primarios a partir del colesterol

en los hepatocitos. Sin embargo, la biotransformación de ácidos biliares primarios (ácido cólico y ácido quenodesoxicólico) en ácidos biliares secundarios (ácido litocólico, desoxicólico, hiocólico, hiodesoxicólico) únicamente puede ser llevada a cabo por las bacterias que son parte de la microbiota gastrointestinal (Figura 3). En roedores, los ácidos biliares primarios, incluyen además del ácido cólico, el ácido quenodesoxicólico, que es convertido a ácido α -muricólico y ácido β -muricólico (mediante el citocromo CYP2C70, específico en roedores) (Winston & Theriot, 2020; Torres-Maravilla *et al.*, 2016; Kurdi *et al.*, 2006; Ridlon *et al.*, 2014).

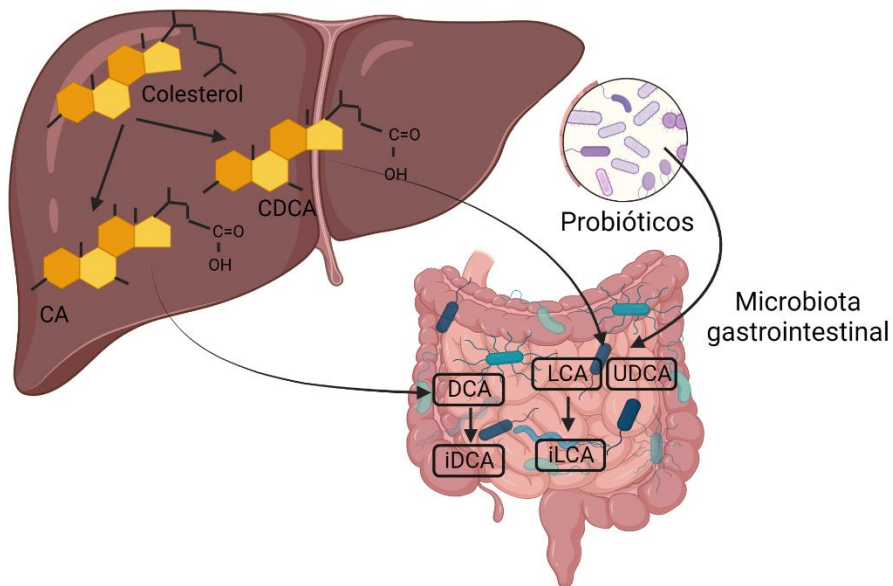


Figura 3. Biotransformación de ácidos biliares. Los probióticos contribuyen a la regulación y el equilibrio de la microbiota gastrointestinal. La microbiota juega un papel importante en la biotransformación de ácidos biliares. Los ácidos biliares primarios (CA y CDCA) son sintetizados en los hepatocitos a partir del colesterol y son conjugados con glicina o taurina. Posteriormente, son secretados en la bilis, almacenados en la vesícula biliar y se secretan en el duodeno. Finalmente, la microbiota gastrointestinal residente transforma los ácidos biliares primarios en ácidos biliares secundarios (principalmente DCA, UDCA, LCA). La biotransformación se lleva a cabo por tres vías microbianas principales que son las reacciones de desconjugación, deshidroxilación, y deshidrogenación (Rodríguez-Pastén *et al.*, 2023).

Existen diversos suplementos alimenticios que permiten mantener una microbiota regulada, además de una variedad amplia de alimentos que contienen prebióticos y probióticos, por ejemplo, alimentos fermentados, principalmente en productos lácteos como yogurt, kéfir, algunas variedades de queso, productos encurtidos y algunas bebidas como leches fermentadas y el pulque. En este sentido, diversos organismos considerados probióticos, llevan a cabo procesos de fermentación, que es un proceso mediante el cual habrá una obtención de energía en ausencia de oxígeno; es decir, la transformación de sustancias orgánicas por diversos microorganismos como bacterias y hongos (levaduras) en condiciones anaeróbicas. El proceso tiene lugar cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles; asimismo, los microorganismos fermentadores, les confieren el sabor y olor característico a los productos elaborados por procesos de fermentación. Cuando el alimento es de tipo ácido y contiene azúcares, serán las levaduras las que crecerán con mayor facilidad y el alcohol que estas producen (fermentación alcohólica) inhibe la actividad de otros microorganismos contaminantes (Torres-Maravilla *et al.*, 2016; Thursby & Juge, 2017; Hill *et al.*, 2014; Lappe-Oliveras *et al.*, 2023).

El pulque

Uno de los alimentos en los que se ha reportado ampliamente la presencia de organismos probióticos, es el pulque; es una bebida fermentada de origen mexicano, con bajo contenido alcohólico y es consumida tradicionalmente en el país, principalmente en la zona central, además, es considerada de consumo milenario ya que existen registros de esta bebida que datan de la época prehispánica, por lo que tiene relevancia religiosa, social, económica, cultural, e incluso se le han atribuido propiedades curativas. Este producto se obtiene de diferentes especies de agave, entre ellas, *Agave salmiana*, *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, entre otras, siendo la principal *A. salmiana*, conocida como maguey pulquero; la producción del pulque parte de la fermentación del aguamiel, que se lleva a cabo dentro del maguey por acción de los microorganismos que están presentes de forma natural en él; posteriormente, el aguamiel es extraído e inoculado con un fermento llamado semilla por los productores, esta cuenta con mayor tiempo de fermentación; una vez que la bebida tiene características físicas específicas, como olor, un aspecto viscoso, y un color blanco turbio, ya es considerada pulque (Escalante *et al.*, 2004; García-Arce & Castro-Muñoz, 2021). Tanto el pulque como el aguamiel son consideradas bebidas con propiedades alimenticias, debido a su alto contenido tanto de prebióticos como de

probióticos. Estudios diversos han reportado la presencia de azúcares, proteínas, hierro, vitaminas hidrosolubles, y aminoácidos esenciales, entre los que se encuentran: lisina, triptófano, histidina, fenilalanina, leucina, tirosina, metionina, valina, y arginina. Además, ha sido ampliamente reportada la presencia de microorganismos considerados probióticos, entre los que destacan los géneros *Zymomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces* sp. y la especie *Kluyveromyces marxianus* (Escalante *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2016).

Efecto de prebióticos y probióticos aislados del aguamiel y el pulque

Particularmente, se han realizado estudios aislando especies diversas de probióticos de productos obtenidos del agave, tales como el pulque y el aguamiel (Estrada-Godina *et al.*, 2001; González-Mesillas *et al.*, 2016). Torres-Maravilla y colaboradores, evaluaron la actividad de algunos probióticos aislados del pulque, específicamente las especies *Lactobacillus plantarum*, *L. sanfranciscensis*, y *L. composti*, en un modelo experimental de colitis inducida por dinitrobenzeno-ácido sulfónico en ratón. Reportaron varios efectos benéficos como la disminución de masa corporal, efectos antiinflamatorios por la disminución de IL-8 e IL-22 y una mejora en la hiperpermeabilidad intestinal (Torres-Maravilla *et al.*, 2016).

Otro estudio realizado por Leal-Díaz y colaboradores, en el que se evaluó el efecto de saponinas extraídas de aguamiel (kammogenina, manogenina, gentrogenina, y hecogenina), en un modelo experimental de obesidad y esteatosis hepática por dieta alta en grasas; observaron efectos como el incremento de tolerancia a la glucosa, de expresión de genes asociados a la oxidación lipídica, y en la población de la especie *Akkermansia muciniphila*, al mismo tiempo, se observó la disminución en el aumento de masa y porcentaje de grasa corporales, glucosa, COL y TG séricos, así como de lípidos hepáticos (Leal-Díaz *et al.*, 2016).

Efecto de prebióticos y probióticos en dislipidemia y daño hepático

Se ha evaluado el efecto de prebióticos y probióticos que en general han demostrado efectos hepatoprotectores e hipolipemiantes (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de prebióticos y probióticos en daño hepático y dislipidemia

Modelo	Prebióticos o Probióticos/Tratamiento	Efecto	Referencia
Ratas Wistar. Fibrosis por TAA	• <i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i> , <i>Weissella confusa</i>	↓TNF- α ↓TGF- β ↓ α -SMA ↓ALT, AST, FA	(Jantararussamee <i>et al.</i> , 2021)
Ratas Sprague Dawley. Daño hepático inducido por D-galactosamina	• <i>L. casei</i> Shirota	↓GGTP ↓TBA ↓G-CSF ↓RANTES ↓IL-5 ↑IL-10	(Yan <i>et al.</i> , 2022)
Pacientes con EHmet	• Simbiótico (Oligofruktosa y <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i>)	↓ALT, AST, GGTP, FA ↓TG, CT, LDL	(Behrouz <i>et al.</i> , 2020)
Pacientes con EHmet	• <i>B. coagulans</i> e inulina	↓ALT, GGTP ↓TNF- α ↓NF- κ B	(Abhari <i>et al.</i> , 2020)
Pacientes con EHNA	• Simbiótico (<i>B. longum</i> y FOS)	↓AST ↓TNF- α ↓LDL-C ↓CRP ↓Endotoxinas séricas, resistencia a la insulina, esteatosis.	(Malaguarnera <i>et al.</i> , 2012)
Ratas Wistar. Daño hepático inducido con acetaminofén	• <i>B. licheniformis</i> , <i>B. indicus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. coagulans</i>	↓AST, ALT ↓TNF- α , ↓IL-1 β ↓Necrosis Capacidad antioxidante	(Neag <i>et al.</i> , 2020)
Ratas Zucker-Lepr ^{fa/fa} . EHmet	• <i>B. breve</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	↓MDA, ↓MPO ↓Acumulación lipídica ↓TNF- α , IL-6 ↓LPS ↑IgA	(Fontana <i>et al.</i> , 2021)
Ratas Sprague-Dawley. Hiperlipidemia por dieta alta en grasas	• <i>L. rhamnosus</i> LV108, <i>L. casei</i> grx12, <i>L. fermentum</i> grx08	↓CT, ↓VLDL, ↓LDL, ↓TG ↓SREBP-1c ↓CYP7A1 ↑PPAR- α	(Wa <i>et al.</i> , 2019)
Ratas Sprague-Dawley. Hiperlipidemia por dieta alta en grasas	• <i>L. argentoratensis</i>	↓CT, ↓LDL, ↓TG	(Lim <i>et al.</i> , 2020)

*Favor de revisar la lista de abreviaturas.

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades como la dislipidemia y la esteatohepatitis representan un problema de salud pública ya que se considera que afectan a una tercera parte de la población a nivel mundial y a nivel nacional, estas enfermedades se han mantenido entre las principales causas de mortalidad durante las últimas décadas por el riesgo que representan para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cirrosis o carcinoma hepatocelular. Existen pocos tratamientos realmente efectivos para controlarlas como el uso de medicamentos que resulta muy costoso a largo plazo además de un tratamiento nutricional que implica cambios importantes en el estilo de vida. Por ello, es de gran relevancia continuar con la búsqueda de nuevas alternativas que coadyuven en la prevención y tratamiento de estos padecimientos. Por lo que el pulque en una dosis adecuada y junto con una alimentación balanceada, debido a su alto contenido de microorganismos podría coadyuvar a la prevención de las enfermedades relacionadas con el incremento de lípidos y sus efectos derivados. Sin embargo, el consumo de este producto regional ha disminuido notablemente; por ello, la información generada en el trabajo presente pretende contribuir a que los productores de aguamiel en regiones de Hidalgo tengan un valor agregado en el producto, así como validar al pulque como una alternativa para la prevención y el tratamiento de enfermedades como la dislipidemia y la esteatohepatitis.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la ingesta del pulque mediante su caracterización y análisis *in vivo* en modelos agudos de dislipidemia y esteatohepatitis en rata para evidenciar sus propiedades.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el pulque mediante análisis microbiológicos y químicos para conocer su composición y asegurar su calidad para el uso en el estudio.
- Inducir dislipidemia con TI o la EHNA con TC en ratas Wistar macho para establecer modelos donde se evalúe el efecto del pulque.
- Evaluar el efecto del pulque mediante parámetros bioquímicos e histológicos, para identificar su actividad en dislipidemia y EHNA.
- Determinar el efecto del pulque mediante parámetros moleculares, para identificar el mecanismo de acción probable.

V. HIPÓTESIS

La ingesta de pulque tiene un efecto protector contra la DSL y EHNA por acción de los microorganismos que contiene.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio consta de dos fases; la fase I está enfocada en la caracterización microbiológica y química del pulque y la fase II en la evaluación del efecto del pulque en modelos *in vivo* de dislipidemia y esteatohepatitis, utilizando 16 grupos de ratas Wistar macho de 5-6 semanas de edad.

6.1 Fase 1. Caracterización microbiológica y química del pulque

Se utilizaron muestras de pulque natural (PN) producido en la región de Epazoyucan, Hidalgo, y fueron recolectadas diariamente con una hora de haber sido inoculadas con la semilla (aguamiel con mayor tiempo de fermentación); y el pulque envasado (PE) se obtuvo con productores locales de la región de San Martín de las Pirámides, Estado de México. Las muestras de PN se mantuvieron a una temperatura de entre -4 y 6 °C durante su traslado y manipulación; las muestras de PE se mantuvieron a temperatura ambiente durante su traslado y una vez abiertas se conservaron en refrigeración. Los análisis se realizaron por duplicado y utilizando muestras de lotes diferentes; además el PE se utilizó como punto de referencia ya que es sometido a un proceso de pasteurización. Antes de administrarse a los animales, ambos tipos de pulque se mantuvieron en agitación durante al menos 1 hora con agitador magnético. La caracterización consistió en los siguientes análisis.

Análisis microbiológico.

Conteo de microorganismos. Se cuantificaron bacterias ácido-lácticas según el método establecido en la norma ISO/FDIS 15214-1998, en agar MRS a 30°C por 72 h ± 3 h; mesófilos aerobios según lo establecido por la NOM-092-SSA1-1994, en un agar para cuenta estándar a 35 ± 2°C por 48 h ± 2 h; hongos y levaduras conforme la NOM-111-SSA1-1994, en PDA a 25 ± 1°C durante 5 días.

Identificación de especies predominantes. Se realizó la identificación de especies de bacterias y levaduras predominantes en el pulque por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se obtuvieron alícuotas (2 mL) de pulque natural y fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 13 minutos a 5°C; el sobrenadante fue eliminado y se recuperó el sedimento. Posteriormente, se llevaron a cabo los procedimientos descritos a continuación.

Extracción de ADN por método orgánico fenol-cloroformo isoamílico

Se extrajo el ADN utilizando el método orgánico fenol-cloroformo isoamílico, colocando en tubos Eppendorf 300 µL de la muestra, 700 µL de amortiguador de extracción (TRIS 0.01 M, EDTA 0.02 M y SDS AL 5%) y 20 µL de proteinasa K. Se incubó a 65 °C/1.5 h, para después agregar fenol- cloroformo-isoamílico en proporción 25:24:1 y agitar por inversión (5 min). El ADN fue precipitado con acetato de sodio y un volumen de isopropanol. A continuación, se recuperó el material genético por centrifugación (2000 rpm/ 5 min). El sobrenadante fue eliminado y se añadió etanol al 70% (500 µL). Finalmente, se centrifugó a 8000 rpm/ 2 min y se desechó el etanol para dejar secar al aire. La extracción fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 3 %.

Amplificación del segmento 16S rDNA y 18S rDNA por PCR

Se emplearon los iniciadores o “primers” universales “forward” DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') y reversa RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') para bacterias (segmento 16S rDNA), y “forward” ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y reversa ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para levaduras (segmento 18S rDNA) a una concentración 10 µM. Los fragmentos amplificados (amplicones) fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Se utilizaron 2 mL del marcador de peso molecular 1 kb plus Ladder de InvitroGen. La potencia de electroforesis fue de 100 V y se aplicó durante 30 min. El gel fue analizado utilizando un marcador de 400 pb (amplificación de 350 pb (gen 16S rDNA) de bacterias) y un marcador de 600 pb (amplificación de 550 pb (gen 18S rDNA) de levaduras).

Secuenciación de los segmentos 16S rDNA y 18S rDNA

La reacción de secuenciación se realizó utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies) y utilizando un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El producto seco fue suspendido con formamida e inyectado en el secuenciador masivo de cuatro capilares ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied BioSystems). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el software BioEdit Aligment Sequence Editor 7.2.0 de acceso libre y el alineamiento se obtuvo en el banco de genes en línea Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análisis químico proximal. El análisis se realizó por los métodos establecidos por AOAC método oficial 977.20 (Cap. 44.4.13) para la determinación de carbohidratos, la NOM-116-SSA1-1994 para la determinación de humedad, NMX-F-608-NORMEX-2011 para la determinación de proteínas y NMX-V-017-NORMEX-2014 para la determinación de cenizas.

Contenido etanólico. La determinación del contenido etanólico se llevó a cabo conforme lo establece la NMX-V-013-NORMEX-2013.

Cuantificación de fenoles totales. La determinación se llevó a cabo utilizando el método Folin-Ciocalteu. Previo a la cuantificación, el pulque fue homogenizado mediante agitación, posteriormente se obtuvieron alícuotas de 1 mL que fueron filtradas utilizando una jeringa con un trozo de algodón en la punta. Se colocaron 100µL de muestra, 500 µL de Folin-Ciocalteu 10% y 400 µL de Na₂CO₃ 7%. Se colocaron alícuotas de 200 µL en la placa y se dejó en incubación a temperatura ambiente, en la oscuridad y durante 30 min. Posteriormente las muestras fueron leídas a 765 nm. Se preparó un curva estándar de 6 puntos con ácido gálico al 40% y el blanco se preparó con agua Milli Q.

6.2 Fase 2. Análisis *in vivo*

Se trabajó con 16 grupos de ratas Wistar macho de 5-6 semanas de edad y una masa de 130-140 g; los grupos sin inducción de daño con n=8 y los grupos con inducción de dislipidemia o EHNA con n=10; cada grupo se formó aleatoriamente. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo constante de 12 h luz/oscuridad a 21 ± 3 °C y se les proporcionó alimento estándar y agua *ad libitum*. Recibieron un trato humanitario de acuerdo con los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, concerniente a la producción, cuidado, y uso de animales de laboratorio.

El tratamiento tuvo una duración total de 28 días, en los que los animales fueron administrados diariamente con Enterogermina® (EN) como control positivo (2 mil millones de UFC en una dilución con agua potable para administrar una concentración microbiana equivalente a la del PN), pulque envasado (PE), pulque natural (PN), p.o. en una dosis de 6 mL/kg. Se trabajó con dos modelos de dislipidemia agudos; consistieron en administrar tiloxapol para inducción de dislipidemia, i.p. en una dosis única de 400 mg/kg, en el primer modelo se indujo 48 horas antes de la eutanasia y en el segundo, 24 horas previas a la eutanasia. Para la inducción de EHNA, se administró tetracloruro de carbono (TC), en una

dosis única de 2.5 mL/kg p.o., 24 horas previas a la eutanasia. En la Tabla 2 se detalla cada uno de los grupos y su tratamiento.

Al finalizar el tratamiento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y sacrificados por exanguinación mediante punción cardíaca con una jeringa heparinizada (1000 U/mL), el plasma se obtuvo centrifugando las muestras a 3000 rpm durante 10 min. El hígado fue aislado y enjuagado en solución isotónica; posteriormente, 0.5 g de hígado fueron homogenizados en 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato de potasio, durante 1 minuto para obtener así el extracto de tejido hepático. Ambas muestras, se colocaron en hielo para su conservación durante su uso y almacenados a -70 °C para análisis posteriores. Finalmente, se recolectaron muestras fecales de la porción cecal del colon con la finalidad de realizar un análisis coproparasitológico.

Tabla 2. Distribución y tratamiento administrado por grupo.

Controles	EHNA	DSL (24 h)	DSL (48 h)
Grupo 1 SI+VTC+VTI n = 8	Grupo 5 SI+TC+VTI n = 10	Grupo 9 SI+VTC+TI n = 10	Grupo 13 SI+VTC+TI n = 10
Grupo 2 EN+VTC+VTI n = 8	Grupo 6 EN+TC+VTI n = 10	Grupo 10 EN+VTC+TI n = 10	Grupo 14 EN+VTC+TI n = 10
Grupo 3 PE+VTC+VTI n = 8	Grupo 7 PE+TC+VTI n = 10	Grupo 11 PE+VTC+TI n = 10	Grupo 15 PE+VTC+TI n = 10
Grupo 4 PN+VTC+VTI n = 8	Grupo 8 PN+TC+VTI n = 10	Grupo 12 PN+VTC+TI n = 10	Grupo 16 PN+VTC+TI n = 10

SI: solución isocalórica (solución de sacarosa y agua potable 24 kcal/100 mL); EN: Enterogermina®; PE: pulque envasado; PN: pulque natural; VTI: vehículo tiloxapol (solución salina); VTC: vehículo de tetracloruro de carbono (aceite mineral); TI: tiloxapol; TC: tetracloruro de carbono.

Análisis bioquímico

La actividad de fosfatasa alcalina (FA), se determinó mediante el método basado en la hidrólisis del *p*-nitrofenilfosfato por la FA, para producir fosfato inorgánico y *p*-nitrofenol. Se colocaron 250 µL de buffer de glicina 0.1 M y MgCl₂ 1 mM, pH 10.5 + 250 µL de sustrato en baño maría a 37 ° C/5 min. La reacción se inició con 50 µL de plasma y se incubó a 37 °C/30 min, posteriormente se detuvo la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N. Finalmente se leyó en un espectrofotómetro a 410 nm (Berger & Rudolph, 1967).

La actividad de gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP), se midió colocando 400 µL de Tris HCl 200 mM, pH 8.2 + 100 µL MgCl₂ 200 mM + 100 µL Glicil glicina 40 mM, pH 8.2 + 200 µL gamma-glutamil-*p*-nitroanilida 10 mM. Se inició la reacción agregando 200 µL de plasma y se mantuvo en incubación a 37 °C/30 min. Finalmente, se detuvo la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5 M y se leyó a 410 nm (Glossmann & Neville, 1972). Ambas enzimas son marcadores de colestasis.

Además, se midió la actividad de alanina-aminotransferasa (ALT) como marcador de necrosis. La técnica permite la obtención de piruvato a partir de la transaminación entre la alanina y el ácido alfaoxoglutarico. Para ello se colocaron en incubación (37 °C/ 60 min) 250 µL de sustrato + 50 µL de plasma. Posteriormente se agregaron 250 µL de reactivo cromógeno y 15 min. después se detuvo la reacción con 2.5 mL de NaOH 0.4 N. Finalmente, se leyó a 515 nm (Reitman & Frankel, 1957).

La actividad de la catalasa (CAT), se determinó agregando alícuotas de extracto de tejido hepático en agua oxigenada (H₂O₂) para iniciar la reacción. Pasando 3 minutos la reacción se detuvo agregando ácido sulfúrico (H₂SO₄ 6 N) y 7 mL de una solución de permanganato de potasio (KMnO₄), que continuó la reacción con H₂O₂. Finalmente, el KMnO₄ residual se leyó a 480 nm y la actividad de CAT fue calculada con el índice constante de reacción de la descomposición de H₂O₂ (K*10²/min) (Cohen *et al.*, 1970; Galicia-Moreno *et al.*, 2013).

El grado de LP por TBARS (MDA) se determinó agregando 300 µL del extracto de tejido hepático + 700 µL de Tris HCl 150 mM (pH = 7.4). Después de 30 minutos de incubación a 37 ° C, se agregaron 2 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético al 15 %. Posteriormente, se colocó a ebullición y transcurridos 45 minutos, se centrifugó (3000 rpm/10 min) y el sobrenadante se leyó a 532 nm (Buege & Aust, 1978). Los resultados se expresan como nmol de MDA/mg proteína, las proteínas se cuantificaron con el método de Bradford. Brevemente, se agregaron 100 µL de extracto de tejido hepático + 900 µL de

agua destilada. De esta dilución, se tomaron 20 µL + 80 µL de agua y se agregó el reactante Bradford (2.4 mL) para leer a 595 nm (Bradford, 1976).

El glucógeno hepático, se midió utilizando la técnica de la antrona 0.2 % en solución de H₂SO₄. Para ello, se agregaron 0.5 g de hígado en 1.5 mL de KOH 30% y se dejó en baño de agua hirviendo por 30 minutos. La solución resultante se aforó a 25 mL con agua destilada para posteriormente tomar una alícuota de 100 µL y agregar 900 µL de agua destilada + 2 mL de antrona. Finalmente, se colocó en baño de agua hirviendo y transcurridos 15 minutos, se dejó enfriar en hielo y se leyó a 630 nm (Seifter & Dayton, 1950).

Se realizó la cuantificación de bilirrubinas totales (BT), bilirrubinas directas (BD) y glucosa como marcadores de funcionalidad hepática, mediante las técnicas descritas por el fabricante de los Kits (Spinreact).

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de colesterol total (COLT), de alta (HDL) y baja densidad (LDL), triglicéridos (TG) y lípidos totales (LT) como marcadores de dislipidemia. Las técnicas que se utilizaron son las descritas por el fabricante del Kit (Spinreact).

Análisis coproparasitológico

El análisis coproparasitológico se realizó mediante el método de Faust que consiste en colocar las muestras fecales en un medio de mayor densidad (sulfato de zinc al 33%), lo que permite que quistes y larvas de parásitos floten al ser de menor densidad (Becerril-Flores, 2014).

Análisis histológico

Tinciones histológicas. Para las tinciones, las muestras hepáticas fueron fijadas en formaldehído al 10% en solución salina reguladora de fosfatos (PBS). El tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas. Posteriormente, fueron enjuagadas con agua y deshidratadas utilizando alcohol, para su posterior inclusión con parafina. Se obtuvieron cortes de aproximadamente 6-7 µm de espesor utilizando un microtomo. Posteriormente, las muestras fueron sumergidas en xilol para desparafinar (2-5 min), rehidratadas en baños con etanol en diferentes concentraciones (100°, 90° y 70°/ 7 min) y enjuagadas en agua (7 min) para finalmente realizar la tinción Hematoxilina/eosina (HE) para evidenciar el daño causado por estrés oxidativo; ésta, permite observar el núcleo en color azul, el citoplasma de los hepatocitos en color rosa, el músculo en tonos rojizos, los glóbulos rojos de color naranja-rojizo, además de la fibrina en rosa intenso (Fernández-Martínez *et al.*, 2019).

Análisis molecular: Lipidómica

Se realizó un análisis lipidómico para el que se seleccionaron aleatoriamente 5 muestras de hígado por grupo. Posteriormente se realizó una extracción de lípidos totales mediante el método de Folch; para ello se pesaron aproximadamente 300 mg de tejido hepático que fueron colocados en tubos para “bead-bug” con 5 perlas de circonio y se agregó 1 mL de metanol-cloroformo en proporción 1:2. Los tubos fueron colocados en el “bead-bug” (Benchmark Scientific D1030, 115V, 60 Hz) durante 2 ciclos (400 rpm/ 180 segundos cada uno). Se centrifugaron durante 15 min/14000 g/ 4 °C (Folch *et al.*, 1957) y se separó la fase orgánica, este procedimiento se realizó por duplicado.

Las fases de cloroformo se recolectaron en los tubos Eppendorf previamente pesado y, estos permanecieron abiertos y cubiertos con papel aluminio para para la evaporación del disolvente por toda la noche. Una vez secos, se registraron las masas nuevamente, se agregaron 400 µL de cloroformo deuterado (CDCl₃) hasta la disolución de la muestra. Finalmente, las muestras fueron colocadas en tubos para RMN filtrando con algodón y se llevó a un volumen total de 600 µL de CDCl₃. Los espectros fueron obtenidos en un equipo Bruker Ascend 400 (Bruker BioSpin GmbH) a una frecuencia de Larmor para núcleo de Hidrógeno de 400.17 MHz, a 289°K, empleando la secuencia de pulsos zg30, con un tiempo de relajación de 1.000 ms, un tiempo de adquisición de 4.0894 ms, se realizaron 64 escaneos por muestra con una resolución de 0.06 ppm. Los espectros fueron procesados con el programa MestReNova x64 (Li *et al.*, 2017).

Análisis estadístico.

Para el tratamiento de resultados bioquímicos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando la prueba de ANOVA fue significativa, se aplicó la prueba *a posteriori* de Student-Newman-Keuls para determinar cuáles grupos difieren significativamente entre sí, considerando como nivel de significancia una $P < 0.05$. Todos los valores se reportaron como la media \pm EE. Este análisis se realizó mediante un paquete computacional Sigma-Stat versión 12.0 (Systat Software, USA). Para el análisis lipidómico se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA) y un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) mediante el programa SIMCA 14.1.

VII. RESULTADOS

7.1 Fase 1. Caracterización microbiológica y química del pulque

Análisis microbiológico

Conteo de microorganismos

La composición de microorganismos de ambos lotes de pulque se reporta en la Tabla 3. Los resultados se encuentran como la media de ambos análisis. Se observó que la composición microbiana no varía en ambos lotes analizados tanto del PN como del PE.

Tabla 3. Conteo de microorganismos en pulque natural (PN) y pulque envasado (PE).

Microorganismos	PN (UFC/mL)	PE (UFC/mL)
Bacterias ácido-lácticas	9.2×10^6	0
Mesófilos aerobios	8.05×10^6	0
Hongos filamentosos	0	0
Levaduras	1.3×10^7	0
TOTAL	3×10^7	0

La concentración de microorganismos se presenta como la media del análisis de ambos lotes.

Como se observa en la Tabla 3, el PN presenta una carga microbiana importante en comparación con el PE, en el que la ausencia de microorganismos se atribuye al proceso de pasteurización que se lleva a cabo durante la elaboración del producto.

Identificación de especies predominantes

El análisis para ambos tipos de microorganismos se realizó por duplicado utilizando dos lotes de pulque natural, el primero corresponde a un pulque con 1 hora de haber sido inoculado con la “semilla” (PN lote 1) y el otro 5 horas más de fermentación (PN lote 2). Además, se evaluaron dos lotes diferentes de PE, uno producido en verano (PE lote 1) y otro en invierno PE (lote 2).

En la Figura 5 se presenta el análisis por electroforesis llevado a cabo posterior a la extracción y amplificación para comprobar la presencia de los segmentos 16 S rDNA de bacterias y 18 S rDNA levaduras.

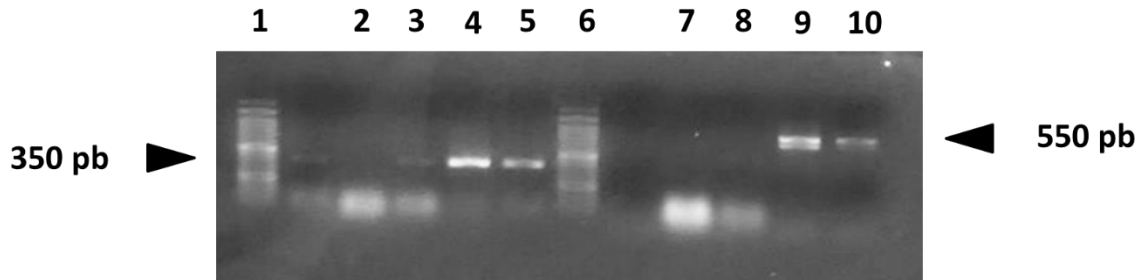


Figura 4. Electroforesis en gel. Gel de agarosa al 3%. Los carriles 1-5 corresponden a bacterias. Carril 1-marcador de peso molecular (PM 350 pb); carriles 2 y 3 - pulque envasado (PE) lote 1 y 2 respectivamente; carriles 4 y 5 – pulque natural (PN) lote 1 y 2 respectivamente. Los carriles 6-10 corresponden a levaduras. Carril 6 - marcador de peso molecular (PM 550 pb); carriles 7 y 8 - PE lote 1 y 2 respectivamente; carriles 9 y 10 – PN lote 1 y 2 respectivamente.

Como se observa, en ninguno de los lotes de PE se amplificaron los segmentos 16S ni 18S rDNA para bacterias ni levaduras; esto se debe al proceso de pasteurización llevada a cabo en el PE. Por el contrario, en las muestras de ambos lotes de PN, se observa la presencia del material genético buscado tanto en el caso de bacterias como en el de levaduras. Posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos para determinar la especie de bacterias y levaduras predominantes; en la Figura 6 A y B se presentan los electroferogramas obtenidos para la identificación de bacterias y en la Fig. 7 A y B para la identificación de levaduras.

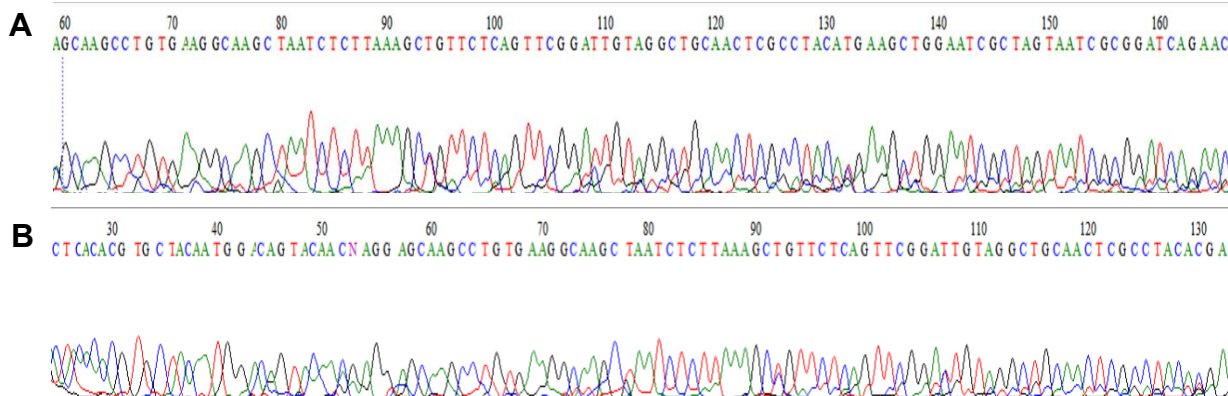


Figura 5. Electroferogramas de bacterias en pulque natural (PN). **A.** Electroferograma correspondiente a la muestra de PN lote 1. **B.** Electroferograma correspondiente a la muestra de PN lote 2.

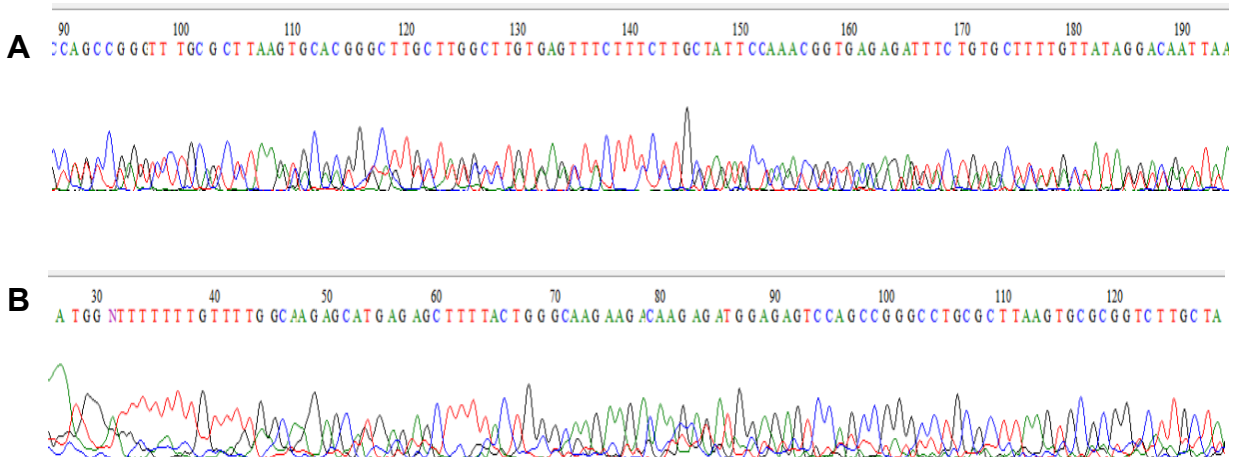


Figura 6. Electroferogramas de levaduras en pulque natural (PN). **A.** Electroferograma correspondiente a la muestra de PN lote 1. **B.** Electroferograma correspondiente a la muestra de PN lote 2.

El alineamiento se llevó a cabo en el banco de genes en línea Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). El ruido que se observa en los electroferogramas se debe a que se utilizaron “primers” universales para bacterias y levaduras respectivamente, además, del material genético abundante que pertenece a los consorcios microbianos tan amplios presentes en el pulque. Las secuencias de bacterias se alinean en una cobertura del 100% con una identidad del 91.72% (PN lote 1) y 94.86% (PN lote 2) con *Lactobacillus jensenii*. En el caso de las levaduras, las secuencias se alinean en cobertura del 100% con una identidad de 96.06% (PN lote 1) y 99.87% (PN lote 2) *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, se sugiere la presencia de ambas especies en el PN, y ambas han mostrado actividad como probióticos. Particularmente, a nivel especie, *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado ampliamente en la composición del pulque; contrario a *Lactobacillus jensenii*, ya que no es reportada en esta bebida. Para poder comprobar la identidad y la presencia de estas especies, especialmente en el caso de bacterias, se requiere realizar prospectivamente un PCR específico con genes característicos de *Lactobacillus*.

Análisis químico proximal, contenido etanólico y de fenoles totales.

Los resultados obtenidos (Tabla 4), muestran un contenido calórico menor en el PN en comparación con el PE. Se considera que el aporte calórico mayor del PE respecto al PN se debe principalmente a que tiene sacarosa añadida, que no fue detectada en el PN. Otros carbohidratos fueron cuantificados tanto en el PN, como en el PE, aunque en cantidades bajas. Sin embargo, ambas muestras se encuentran dentro de las especificaciones de la NOM-199-SCFI-2017 que establece que para que una bebida sea considerada pulque debe contener entre 4% y 7.5 % Alc. Vol. Respecto a la cuantificación de compuestos fenólicos, se determinó su presencia en ambos tipos de pulque; por lo que realizar un perfil prebiótico y un análisis cualitativo de los compuestos fenólicos, arrojaría información importante y complementaria relacionada a los compuestos bioactivos presentes y sus posibles efectos positivos en la salud, así como los mecanismos de acción asociados. En general, se observó que la composición química de ambos lotes, tanto para el PN y el PE, no difieren sin importar la temporada en la que el pulque haya sido producido.

Tabla 4. Análisis químico proximal, contenido etanólico y de fenoles totales en pulque natural (PN) y pulque envasado (PE).

Componentes	PN (g/100 mL)	PE (g/100 mL)
Humedad	97.8%*	93.4%*
Sólidos totales	0.24%*	11.91%*
Cenizas	0.31 ± 0.03 %	0.21 ± 0.07 %
Contenido calórico (kcal/100 mL)	24.64 ± 0.04	63.30 ± 12.34
Proteína	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0
Lípidos totales	0	0
Azúcares reductores totales	2.26*	10.36*
Fructosa	0.03 ± 0.03	0.82 ± 0.41
Glucosa	0.16 ± 0.16	0.58 ± 0.14
Sacarosa	N/D	7.91 ± 1.08
% Etanol (Vol. a 20 °C)	4.05 ± 0.15	4.45 ± 1.05
Fenoles totales (µg EAG/mL)	236 ± 9.15	137 ± 23.51

Los valores se reportan como la media ± EE. *La determinación no se realizó por duplicado. N/D: No detectado.

7.2 Fase 2. Análisis *in vivo*

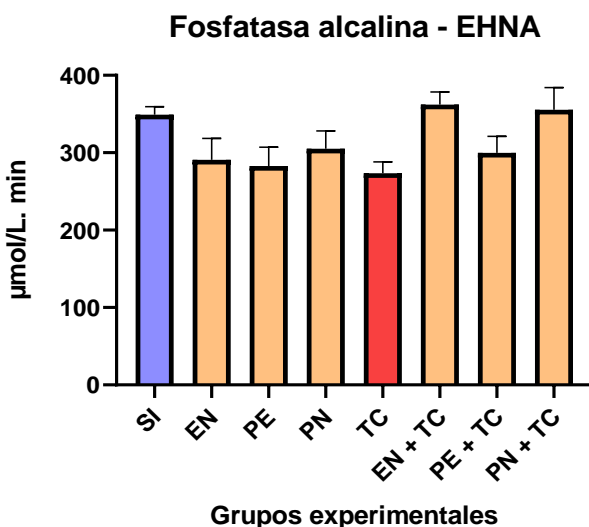
Análisis bioquímico

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los marcadores bioquímicos en EHNA, dislipidemia de 24 h y dislipidemia de 48 h; es importante enfatizar que ninguno de los tratamientos utilizados (EN, PE, PN), incrementaron el valor de ningún marcador en ninguno de los modelos al ser administrados sin daño; es decir, ninguno de los tratamientos indujo *per se* algún tipo de daño.

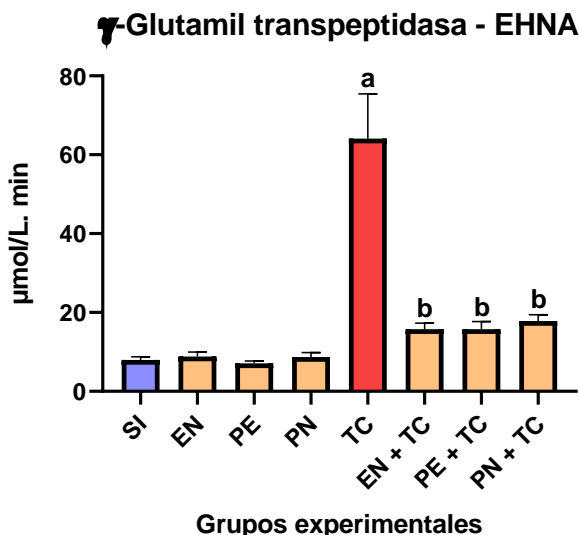
Marcadores de colestasis y funcionalidad hepática en EHNA

En FA (marcador de colestasis) no se observó diferencia significativa entre ninguno de los grupos (Gráfica 1) por la administración de los tratamientos con respecto al control sano (SI), e incluso, no hubo un incremento significativo del grupo dañado (TC) con respecto al grupo sano. Esto se atribuye a que FA no es una enzima específica del hígado y al ser cuantificada en plasma, los valores no corresponden únicamente a los niveles hepáticos.

Sin embargo, en los valores de GGTP (el indicador de colestasis más sensible) hubo un incremento marcado en el grupo dañado (TC) con respecto al grupo sano (SI); en este marcador, todos los tratamientos administrados, EN, PE, y PN, lograron revertir los valores hasta valores normales (Gráfica 2), sugiriendo un efecto anticoléstatco.

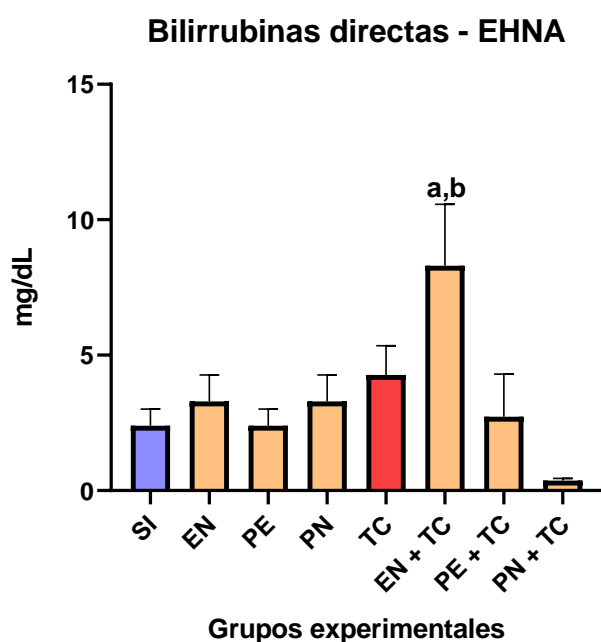


Gráfica 1. Fosfatasa alcalina. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

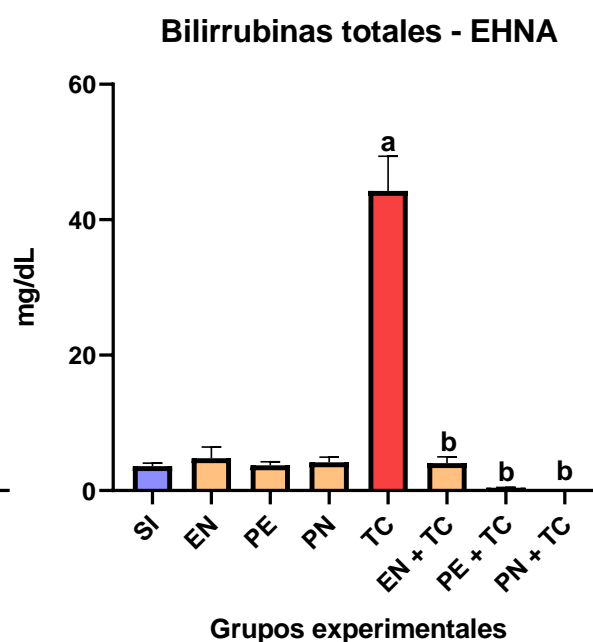


Gráfica 2. γ -Glutamyl transpeptidasa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

Los resultados anteriores son congruentes con la determinación de bilirrubinas directas (BD, o conjugadas) y totales (BT = BD + BI). Como se muestra en la Gráfica 3, la diferencia de la concentración de BD entre los grupos administrados con PE y PN no es significativa con respecto al grupo dañado, aunque se aprecia una tendencia a la disminución; sin embargo, el tratamiento con EN induce una elevación ostensible ($p < 0.05$) en la BD con respecto al grupo sano (SI) y al grupo dañado (TC). La concentración de BT se incrementó significativamente al administrar TC (Gráfica 4), sugiriendo que las bilirrubinas indirectas (BI, no conjugadas) se aumentaron marcadamente, quizás por alguna modificación de la funcionalidad hepática durante la conjugación. El tratamiento con EN y ambos tipos de pulque (PE y PN) retornaron a valores normales las BT, confirmando el efecto anticoléstatco.

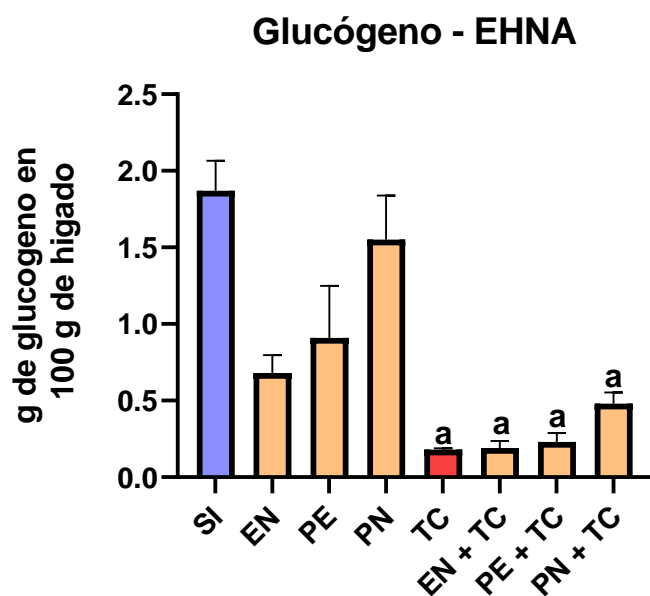


Gráfica 3. Bilirrubinas directas. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.



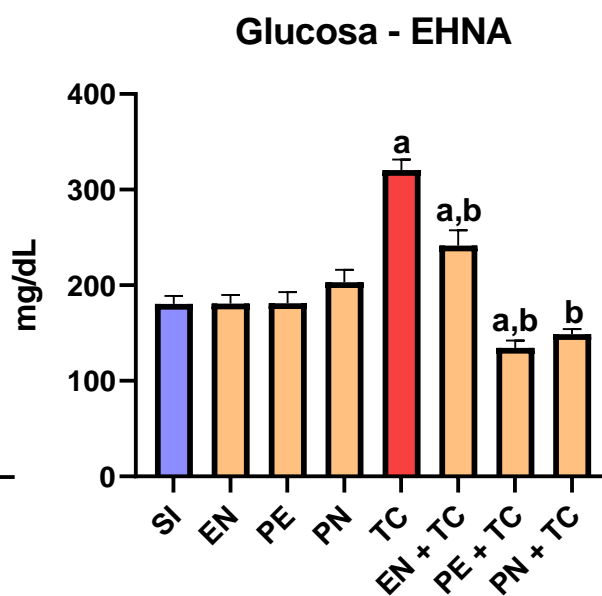
Gráfica 4. Bilirrubinas totales. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

Otros indicadores de funcionalidad hepática corresponden a glucógeno y glucosa; el glucógeno hepático disminuye (incluso hasta depletarse) durante el daño hepático; en la Gráfica 5, el glucógeno disminuyó considerablemente ($p < 0.05$) por la intoxicación con TC comparado con el grupo sano y, a pesar de que ninguno de los tres tratamientos logró mantener las reservas de glucógeno, se observa una tendencia muy ligera al incremento, principalmente por el PN. Estos resultados son consistentes con los valores obtenidos en la cuantificación de glucosa sérica (Gráfica 6), pues la glucogenólisis hepática por estrés induce el incremento en la glucosa plasmática, tal como se observó debido a la administración del TC, pues la glucosa se incrementó significativamente con respecto a los valores de animales sanos; asimismo, como hubo una tendencia a incrementar el glucógeno hepático con los tratamientos se promovió la disminución de glucosa sérica por los mismos. De hecho, el tratamiento con EN redujo significativamente el nivel de glucosa comparado al grupo dañado; sin embargo, la administración de PE y PN disminuyeron la glucosa sérica hasta valores normales.



Grupos experimentales

Gráfica 5. Glucógeno. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

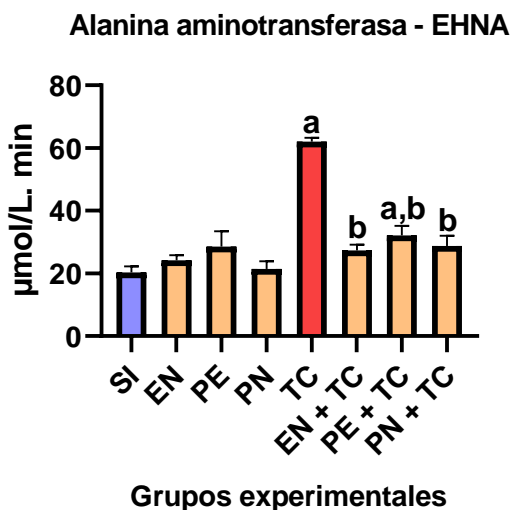


Grupos experimentales

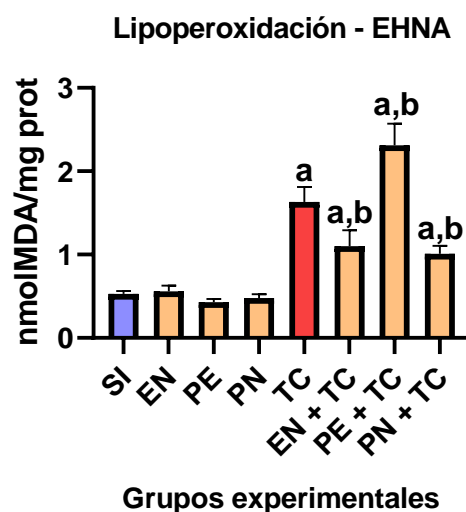
Gráfica 6. Glucosa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

Marcadores de necrosis, daño membranal y estrés oxidativo en EHNA

En la Gráfica 7 se muestra que el marcador de necrosis ALT incrementó significativamente durante el daño inducido con TC, mientras que la administración de EN, PE, y PN, tuvieron un efecto antinecrótico, incluso EN y PN previnieron completamente el daño manteniendo valores normales. El grado de LP se incrementó marcadamente en el grupo con daño respecto a los valores normales (Gráfica 8). El tratamiento con EN y PN previno parcialmente ($p < 0.05$) la LP membranal; en contraste, la administración de PE incrementó el deterioro oxidativo promovido por el TC (cuantificado mediante MDA).

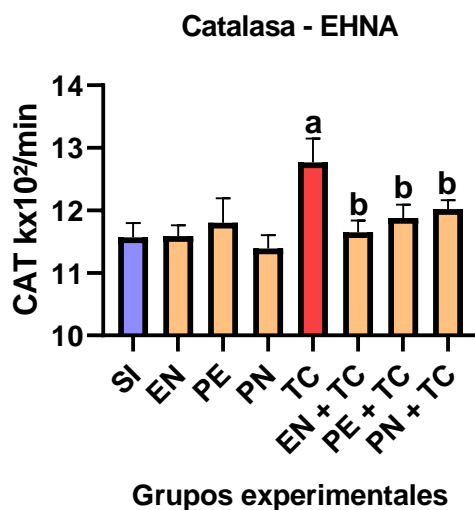


Gráfica 7. Alanina aminotransferasa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.



Gráfica 8. Lipoperoxidación. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

Finalmente, en la actividad enzimática de CAT (Gráfica 9) se observa una respuesta frente al daño por el incremento de esta enzima antioxidante en el grupo administrado con TC; pero, la administración de los tres tratamientos previno completamente su elevación, sugiriendo la protección contra el estrés oxidativo.

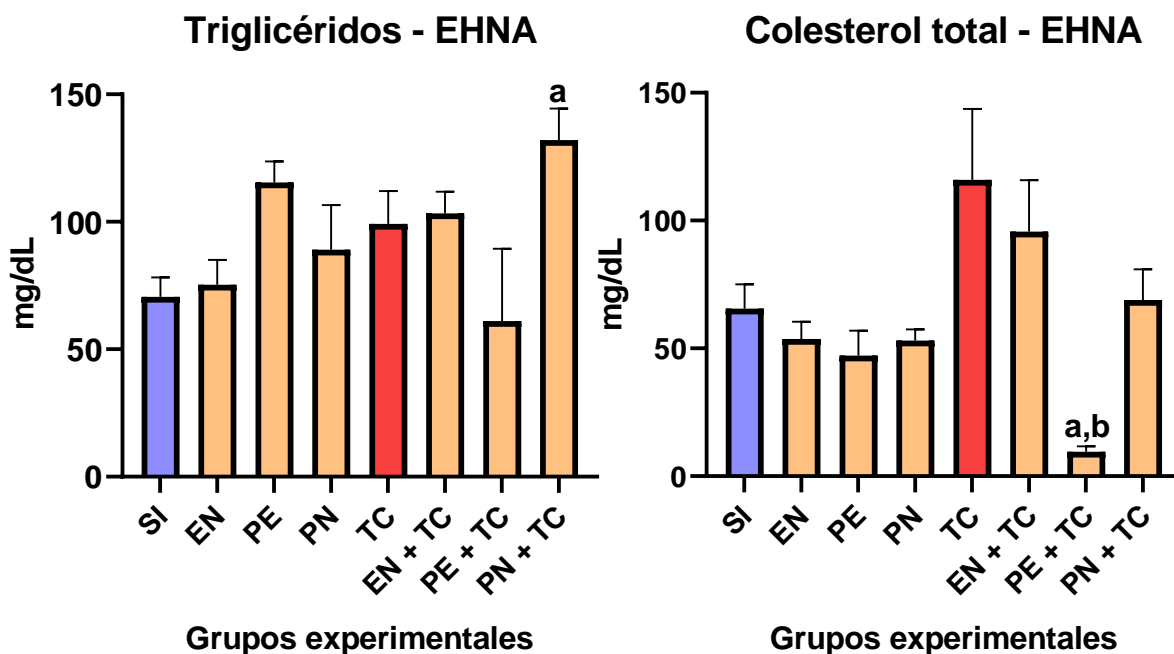


Gráfica 9. Catalasa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

Perfil lipídico en EHNA

El daño inducido con TC no incrementó significativamente el nivel de TG séricos (Gráfica 10), aunque se observa una tendencia al alza. Ninguno de los tratamientos administrados mejoraron este marcador; incluso, el PN aumentó la concentración más que el TC y de manera estadísticamente significativa, aunque se mantuvo dentro de valores normales (26-145 mg/dL).

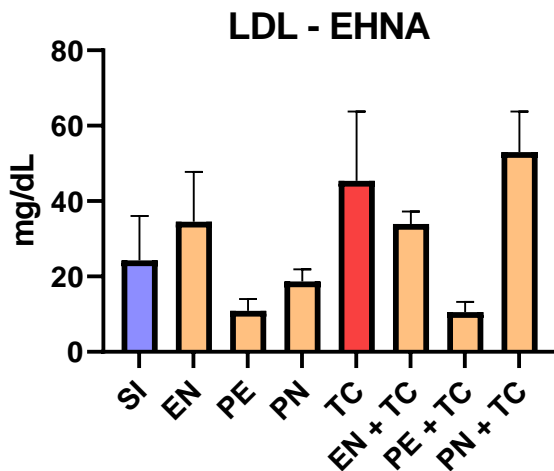
Los niveles de COLT se presentan en la Gráfica 11. Se observa un incremento marcado en el grupo con EHNA pero no significativo con respecto al grupo sano, y los grupos tratados con EN y PN tuvieron valores similares; por el contrario, el grupo administrado con PE redujo drásticamente la concentración de COL, aún más baja que la del grupo sano, cuyos valores deben rondar los 10-54 mg/dL.



Gráfica 10. Triglicéridos. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

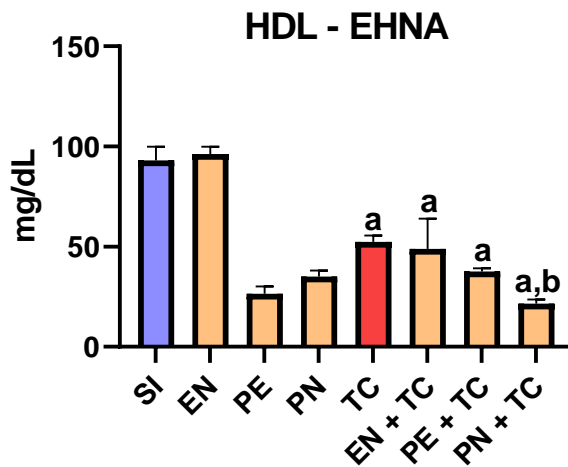
Gráfica 11. Colesterol total. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

Los niveles de LDL mostraron un patrón fluctuante (Gráfica 12), aunque ningún grupo tuvo valores estadísticamente diferentes al del grupo control de controles (sano); no obstante, el grupo dañado por TC y la administración con PN tuvieron las concentraciones más elevadas, mientras que el de PE la más baja. Por otro lado, la Gráfica 13 muestra las concentraciones de HDL, donde todos los grupos afectados por el TC tuvieron niveles disminuídos significativamente comparados con el control sano (SI); por lo tanto, ninguno de los tratamientos mantuvo o elevó las HDL protectoras.



Grupos experimentales

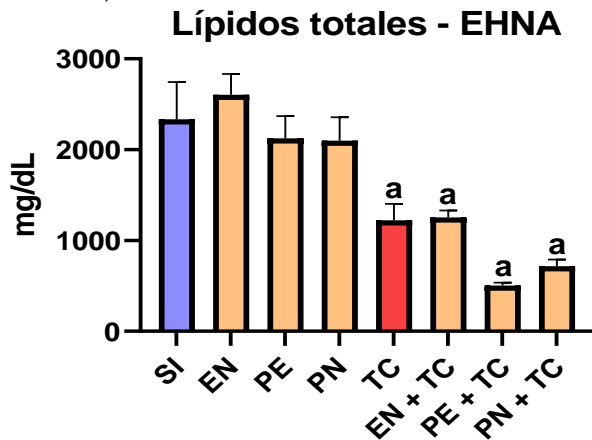
Gráfica 12. LDL. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.



Grupos experimentales

Gráfica 13. HDL. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

Finalmente, en la cuantificación de lípidos totales séricos (Gráfica 14), se observa un perfil similar al de HDL, donde los grupos con EHNA presentaron niveles significativamente más bajos con respecto al grupo SI; asimismo, ninguno de los tratamientos preservaron los valores normales durante la EHNA.



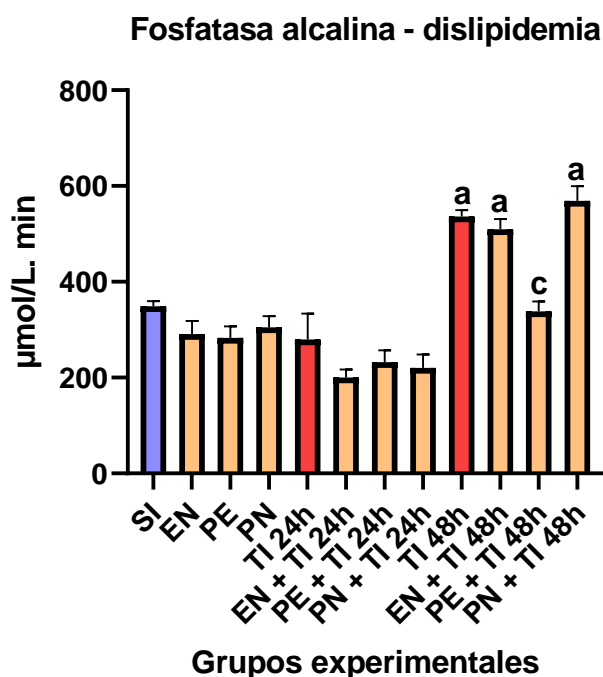
Grupos experimentales

Gráfica 14. Lípidos totales. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TC.

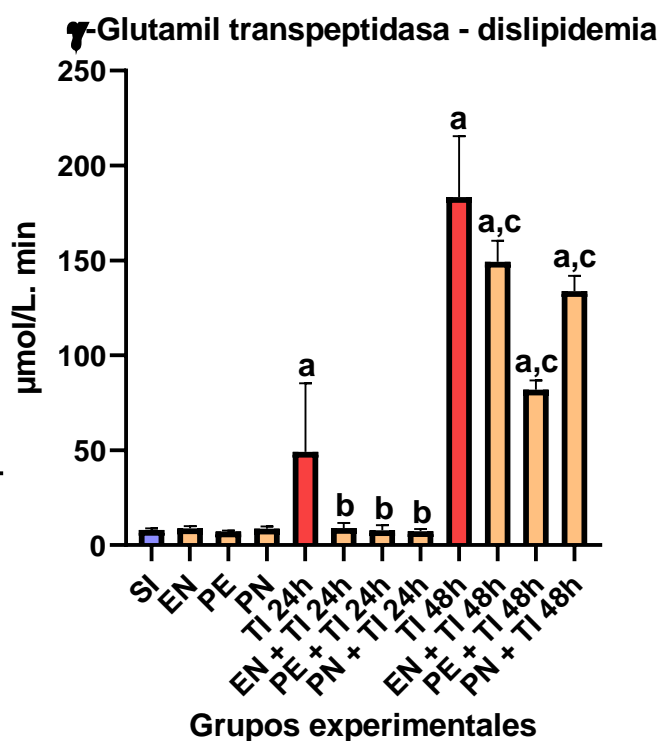
Marcadores de colestasis y funcionalidad hepática en dislipidemia

En la Gráfica 15 se muestran los niveles de FA de ambos modelos de dislipidemia, donde, de manera similar a lo observado en EHNA, en el modelo de 24 h, no se observó diferencia significativa entre ninguno de los grupos. Sin embargo, en el modelo de 48 h, la administración de tiloxapol (TI) incrementó la actividad de FA al doble ($p < 0.05$) con respecto al control; asimismo, la administración de EN y PN no redujo este marcador. Por el contrario, la administración de PE logró disminuir este marcador hasta valores normales.

El TI de 24 h elevó al marcador de colestasis GGTP, mientras que todos los tratamientos previnieron su elevación, indicando un efecto anticoléstatco (Gráfica 16). El mismo modelo de dislipidemia inducida por TI en 48 h resulta en un daño mayor; sorprendentemente, a pesar de la agresividad de este modelo, los tres tratamientos tuvieron un efecto anticoléstatco parcial, aunque estadísticamente significativo.



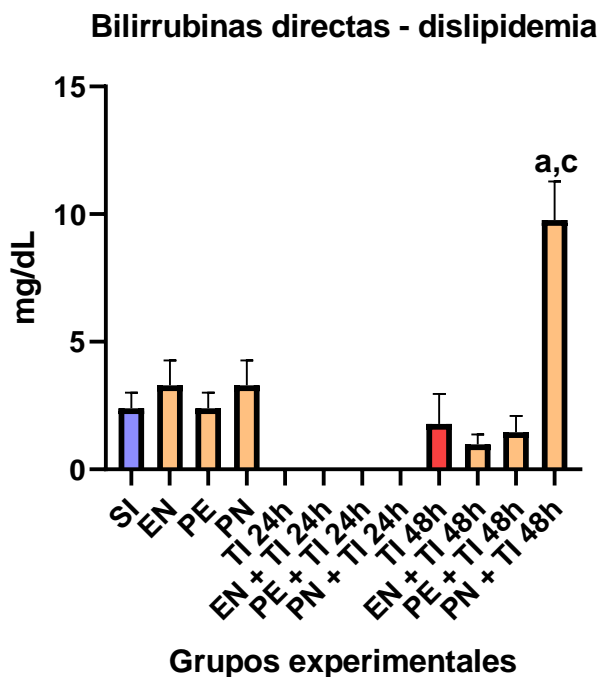
Gráfica 15. Fosfatasa alcalina. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.



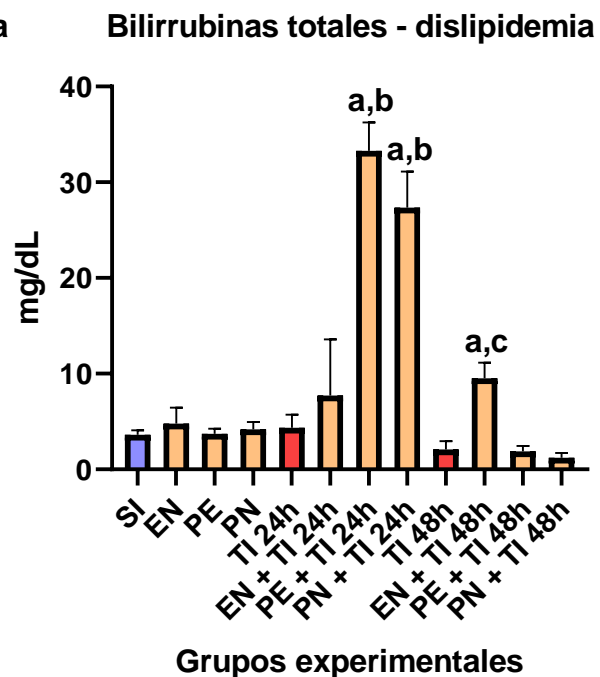
Gráfica 16. γ -glutamil transpeptidasa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

La concentración de BD no fue detectable en ninguno de los grupos con inducción de dislipidemia de 24 h (Gráfica 17); incluso, a las 48 h las BD se mantuvieron en niveles normales, pero en contraste marcado, la administración de PN elevó 5 veces su concentración ($p < 0.05$).

Los valores de BT se muestran en la Gráfica 18. En el modelo de dislipidemia de 24 h, las BT se mantuvieron normales con el TI y EN; por el contrario, la administración de PE y PN promovieron un incremento ostensible ($p < 0.05$). Con respecto a las concentraciones de BT en la inducción de 48 h por TI, ni ese grupo o los tratamientos las modificaron comparadas con el grupo SI.



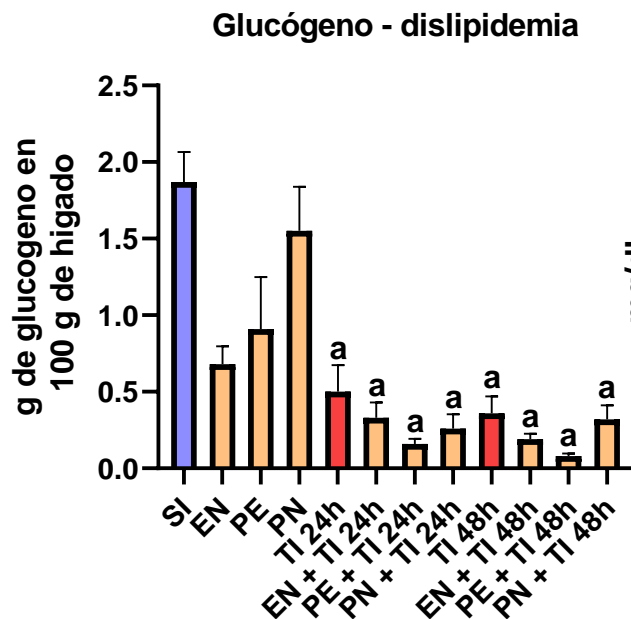
Gráfica 17. Bilirrubinas directas. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.



Gráfica 18. Bilirrubinas totales. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

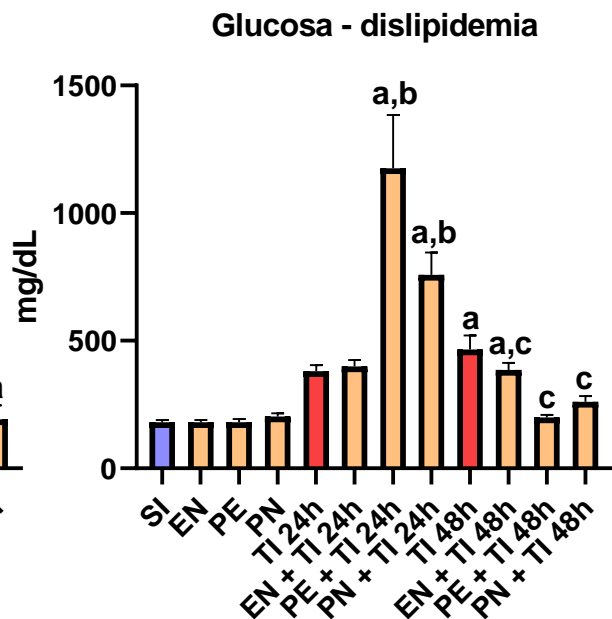
Los almacenes de glucógeno hepático (Gráfica 19), marcador de estrés y funcionalidad, fueron disminuidos por el tratamiento *per se* de EN y PE, aunque no alcanzaron una diferencia estadística con respecto a los valores normales de los grupos SI y PN. Empero, la dislipidemia de 24 y 48 h redujo significativamente los depósitos de glucógeno y ninguno de los tratamientos previno su reducción.

Los niveles de glucosa sérica (Gráfica 20), se incrementan ligeramente en los grupos TI 24 h solo y tratado con EN, sin embargo, en los grupos PE y PN hay un aumento significativo con respecto a los controles sano y dañado. Esto sugiere un efecto sinérgico del daño causado por el TI 24 h y los constituyentes del PE y el PN que no elevaron glucosa por sí mismos, aun cuando PE tiene un contenido elevado de sacarosa. En el modelo de 48 h, se repite el incremento en los grupos TI 48 h y EN, aunque en este caso ambos alcanzan diferencia estadística respecto al grupo sano; de manera contraria, en este modelo se observa la disminución de los niveles de glucosa hasta valores normales con la administración de PE y PN.



Grupos experimentales

Gráfica 19. Glucógeno. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

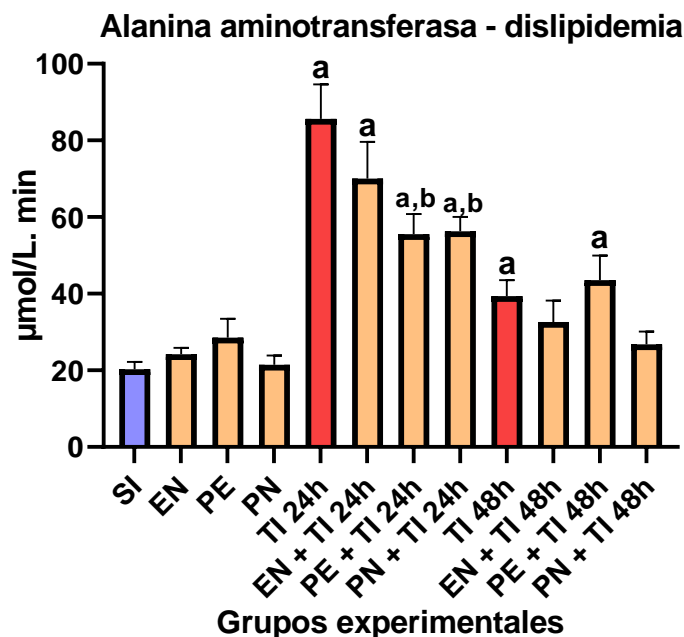


Grupos experimentales

Gráfica 20. Glucosa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

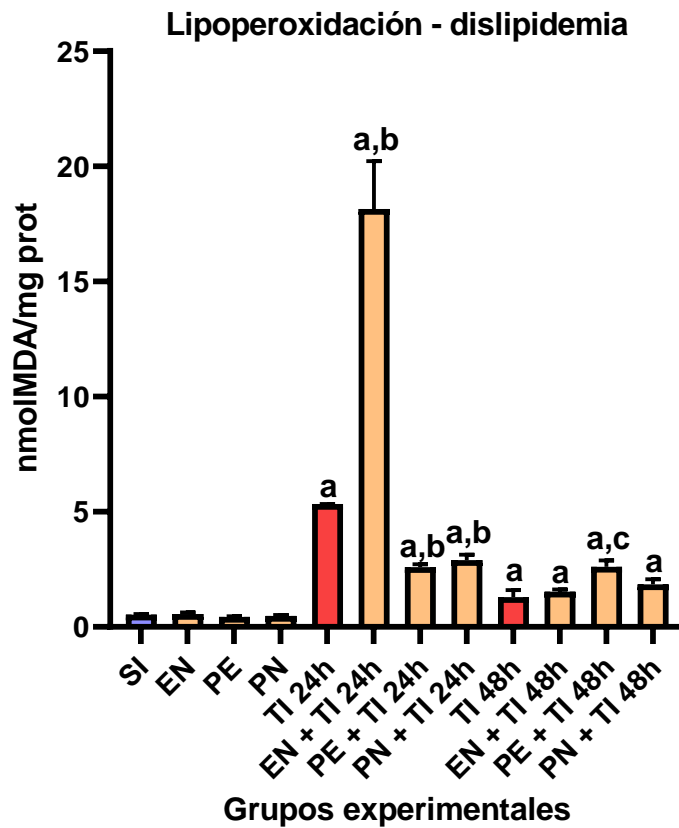
Marcadores de necrosis, daño membranal y estrés oxidativo en dislipidemia

En la Gráfica 21 se observa cómo necrosis incrementó de manera importante durante la administración de TI 24 h, e igual ocurrió en el grupo dosificado con EN y no mostró una disminución importante; sin embargo, los tratamientos con PE y PN, disminuyeron los niveles parcial pero significativamente contra el control dislipidémico. El daño con TI 48 h causó un incremento de ALT menos marcado ($p < 0.05$) y la administración de PE no lo disminuye; aunque el tratamiento con EN y PN previno la necrosis manteniendo valores normales.



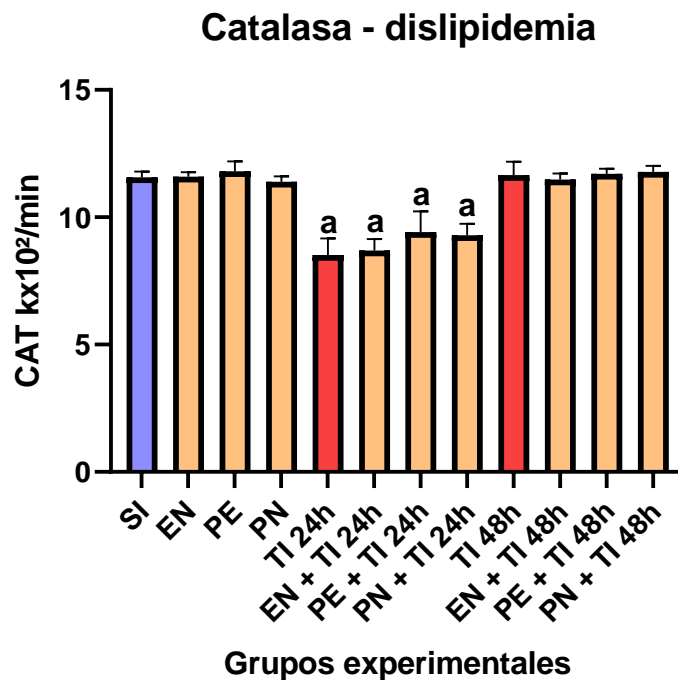
Gráfica 21. Alanina aminotransferasa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

La LP membranal (Gráfica 22) fue promovida en el grupo TI 24 h de forma estadísticamente significativa con respecto al grupo SI, mientras que la EN administrada la eleva también; por el contrario, los tratamientos con PE y PN la disminuyen parcial pero significativamente. El incremento de LP en el modelo de TI 48 h, fue significativo aunque moderado, en contraste con el inicio del daño dislipidémico durante las primeras 24 h y que desciende posteriormente; de hecho, ninguno de los tratamientos disminuyó a los valores del grupo sano.



Gráfica 22. Lipoperoxidación. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

Finalmente, no se aprecian cambios relevantes en el nivel de CAT (Gráfica 23) en casi todos los grupos, tanto controles de administración sanos y los dañados en el modelo de dislipidemia de TI 48 h; sin embargo, en todos los grupos del modelo de TI 24 h la actividad de CAT se redujo ligera aunque significativamente, donde ningún tratamiento tuvo efecto antioxidante.

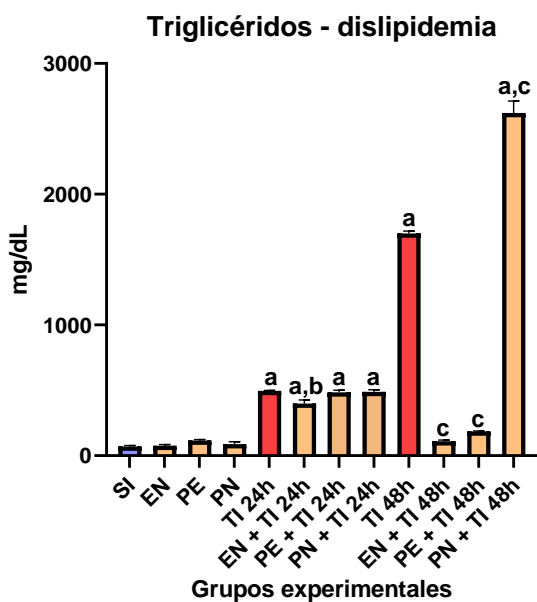


Gráfica 23. Catalasa. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio +/- EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48 h.

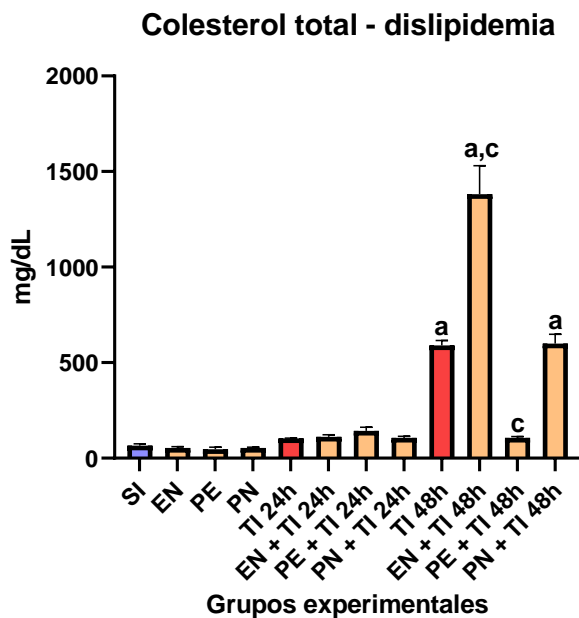
Perfil lipídico en dislipidemia

En la Gráfica 24 se presentan los valores de TG, donde en el modelo de TI 24 h la concentración se quintuplicó ($p < 0.05$) con relación al control SI y la administración de PE y PN no mostraron algún efecto y únicamente el tratamiento con EN redujo ligera pero significativamente los TG. El modelo de dislipidemia con TI 48 h de incrementó drásticamente la concentración de TG, pues en este es más pronunciada respecto al modelo de 24 h. Se observó una protección total en los grupos administrados con EN y PE, no así en el grupo administrado con PN, donde el incremento fue todavía mayor que en el grupo dislipidémico.

Los niveles de COLT se presentan en la Gráfica 25. En el modelo de TI 24 h, si bien se observa una tendencia al alza, es leve y no se obtuvo diferencia significativa entre ninguno de los grupos. En contraste marcado, el aumento de COLT en el grupo TI 48 h es significativo con respecto al grupo sano, el tratamiento con EN produjo una elevación todavía mayor, el grupo tratado con PE previno totalmente el aumento, y el PN mantiene los niveles sin diferencia significativa con respecto al daño por dislipidemia.



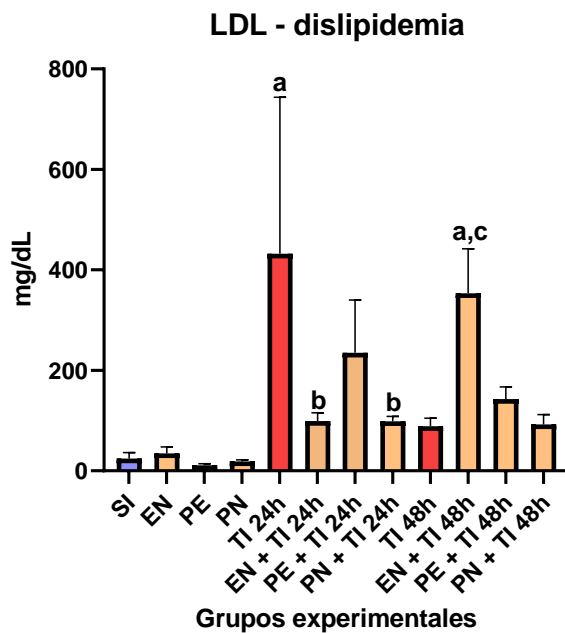
Gráfica 24. Triglicéridos. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.



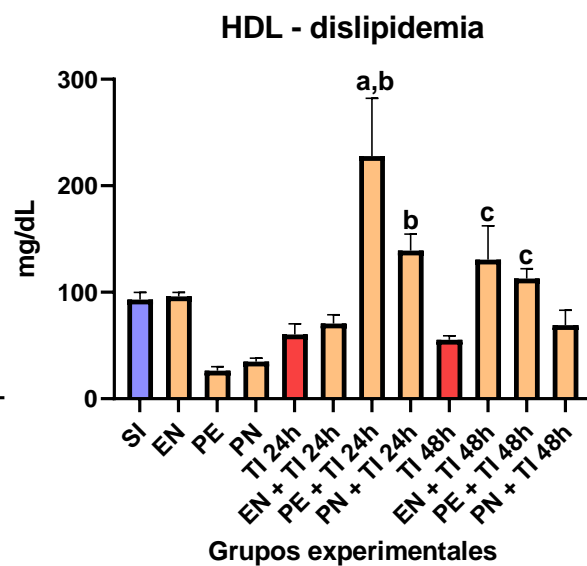
Gráfica 25. Colesterol total. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

Como se esperaba, durante la dislipidemia inducida por TI 24 h la concentración de LDL (Gráfica 26) se incrementó ($p < 0.05$), la administración de PE no la redujo y, en cambio, EN y PN sí tuvieron un efecto hipolipemiante significativo. Nuevamente, en el modelo de TI 48 h la concentración de LDL fue disminuyendo en el tiempo, la dosificación de EN la triplicó, mientras que PE y PN la conservaron similar al grupo dislipidémico respectivo.

La dislipidemia causada por TI 24 h redujo la concentración de HDL (Gráfica 27) aunque no significativamente al ser comparada con el grupo SI y la administración de EN no previno tal decremento; mientras que los tratamientos con PE y PN aumentan de manera marcada las HDL ($p < 0.05$). El modelo de TI 48 h produjo una baja en la concentración de HDL similar al modelo de 24 h, así como la administración de PN no la mejoró; empero, EN y PE previnieron su descenso manteniendo valores parecidos al grupo sano.

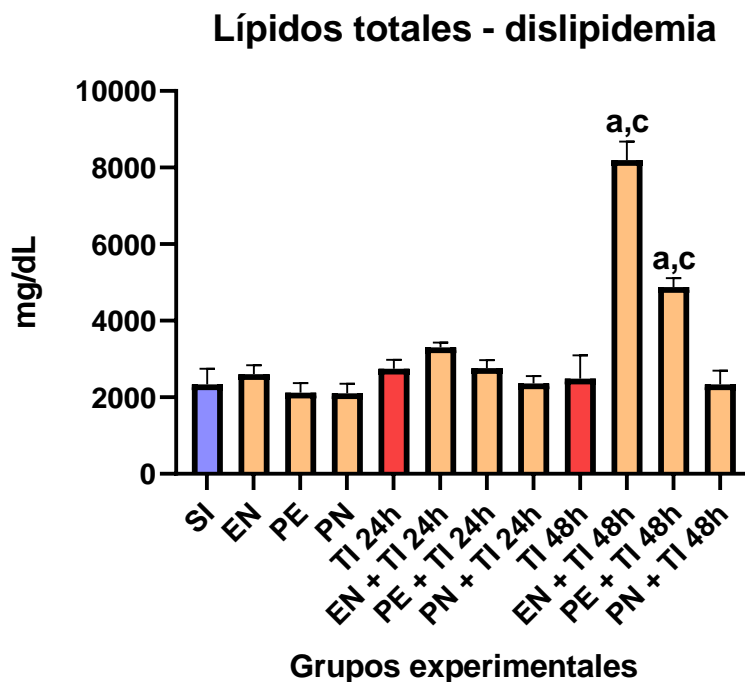


Gráfica 26. LDL. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.



Gráfica 27. HDL. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

La Gráfica 28 muestra la cuantificación de lípidos totales séricos. La dislipidemia causada por TI 24 h no modificó la concentración lipídica, así como ninguno de los tratamientos; incluso, TI 48 h y la dosificación de PN en ese modelo tampoco tuvieron diferencias respecto a los valores normales. Solamente los tratamientos con EN y PE aumentaron la lipemia ostensiblemente ($p < 0.05$) y se corresponden con los valores incrementados de colesterol, LDL, y HDL.



Gráfica 28. Lípidos totales. El análisis se realizó por duplicado y los valores se reportan como el promedio \pm EE; ANOVA Student-Newman-Kewls, $p < 0.05$. a = diferente vs. SI; b = diferente vs. TI 24h; c = diferente vs. TI 48h.

Análisis coproparasitológico

El análisis coproparasitológico arrojó resultados negativos para todos los grupos. Este se llevó a cabo con la finalidad de sustentar que el PN no induce parasitosis; aunado a estos resultados, el análisis químico, microbiológico, y bioquímico, sugieren que el consumo del pulque no induce ningún daño *per se*.

Análisis histológico

En la Figura 7, se presenta el panel con los resultados del análisis histológico realizado en tejido hepático con la tinción hematoxilina/eosina. A continuación, se describe cada uno de los grupos.

Las letras A a la D, corresponden a los grupos control, es decir a los grupos sin inducción de daño.

El grupo control de controles (SI; Figura 7. A), mostró cambio graso macrovesicular ausente a mínimo/difuso; cambio graso microvesicular ausente; hipertrofia hepatocelular ausente; necrosis ausente; cariocitomegalia ausente; infiltración focal de células inflamatorias en zonas mediolobular, centrilobular, y periportal; hipertrofia de células endoteliales ausente; hiperplasia de conductillos biliares y colangiofibrosis en mayoría presente; e hiperplasia de células ovales presente de manera minoritaria.

En el grupo control de EN, (Figura 7. B), se reporta cambio graso macrovesicular ausente-mínimo/difuso; cambio graso microvesicular ausente-mínimo/difuso, hipertrofia hepatocelular mayoritariamente presente/mediozonal; necrosis ausente; cariocitomegalia ausente; infiltración de células inflamatorias principalmente focalizada en zonas periportal y mediolobular; hipertrofia de células endoteliales ausente; hiperplasia de conductillos biliares presente en mayoría; colangiofibrosis presente de forma minoritaria; e hiperplasia de células ovales ausente.

En el control de PE (Figura 7. C), se observó cambio graso macrovesicular ausente a mínimo/difuso; cambio graso microvesicular principalmente ausente o mínimo/difuso; hipertrofia hepatocelular ausente; necrosis ausente; cariocitomegalia ausente; infiltración focal de células inflamatorias en zonas centrilobular, mediolobular y periportal; ausencia de hipertrofia de células endoteliales; hiperplasia de conductillos biliares presente; colangiofibrosis presente; e hiperplasia de células ovales en mayoría ausente.

El control de PN (Figura 7. D), presentó cambio graso macrovesicular ausente a mínimo/difuso; cambio graso microvesicular principalmente ausente o mínimo/periportal; hipertrofia hepatocelular ausente; ausencia de necrosis; ausencia de cariocitomegalia; ligeramente infiltración focal de células inflamatorias en zonas mediolobular y periportal; hipertrofia de células endoteliales ausente; hiperplasia de conductillos biliares presente aunque en mayoría ausente; colangiofibrosis ausente; e hiperplasia de células ovaes ausente.

De la letra E a la H, corresponden a los grupos tratados con TC, es decir, al modelo de EHNA.

El control de daño con TC (Figura 7. E), exhibió cambio graso macrovesicular difuso de mínimo a leve; cambio graso microvesicular difuso de mínimo a moderado; hipertrofia hepatocelular ausente; necrosis ausente; cariocitomegalia presente; infiltración focal de células inflamatorias en zonas centrilobular, mediolobular y periportal; hipertrofia de células endoteliales ausente; hiperplasia de conductillos biliares presente; colangiofibrosis presente; e hiperplasia de células ovaes presente.

La Figura 7. F, corresponde al grupo EN + TC; este manifestó menor cambio graso macrovesicular difuso; cambio graso microvesicular difuso de mínimo a moderado; ausencia de hipertrofia hepatocelular; ausencia de necrosis; cariocitomegalia ausente; infiltración focal de células inflamatorias en zonas centrilobular, mediolobular y periportal; hipertrofia de células endoteliales ausente; hiperplasia de conductillos biliares presente; colangiofibrosis presente; e hiperplasia de células ovaes ausente.

En el grupo PE + TC (Figura 7. G), se observó ausencia de cambio graso macrovesicular; cambio graso microvesicular mínimo a leve y difuso; hipertrofia hepatocelular ausente; ligeramente necrosis multifocal; cariocitomegalia ausente; infiltración focal de células inflamatorias en zonas centrilobular, mediolobular y periportal; hipertrofia de células endoteliales ausente; hiperplasia de conductillos biliares presente; colangiofibrosis ausente; e hiperplasia de células ovaes presente en minoría.

El grupo PN + TC (Figura 7. H), presentó cambio graso macrovesicular difuso de mínimo a moderado; cambio graso microvesicular difuso mínimo-marcado; hipertrofia hepatocelular ausente; ausencia de necrosis; ausencia de cariocitomegalia; infiltración focal de células inflamatorias en zonas mediolobular y periportal; presencia de hipertrofia de células

endoteliales; hiperplasia de conductillos biliares presente; presencia de colangiofibrosis; e hiperplasia de células ovaes ausente.

El modelo de dislipidemia de 24 h corresponde a las imágenes con la letra I a la L.

El control dañado con TI 24 h (Figura 7. I), mostró cambio graso macrovesicular mínimo en la región periportal; cambio graso microvesicular mínimo y difuso; hipertrofia hepatocelular ausente; necrosis limitada y multifocal; ausencia de cariocitomegalia; infiltración de células inflamatorias, en mayoría focalizada en zona periportal; ausencia de hipertrofia de células endoteliales; presencia de hiperplasia de conductillos biliares; colangiofibrosis presente; y, presencia parcial de hiperplasia de células ovaes.

En el grupo administrado con EN + TI 24 h (Figura 7. J), se observó cambio graso macrovesicular ausente, cambio graso microvesicular mínimo y difuso; hipertrofia hepatocelular ausente; necrosis multifocal; ausencia de cariocitomegalia; infiltración de células inflamatorias focalizada principalmente en la región periportal; hipertrofia de células endoteliales ausente; presencia de hiperplasia de conductillos biliares; presencia de colangiofibrosis; y presencia de hiperplasia de células ovaes.

El grupo tratado con PE + TI 24 h (Figura 7. K), presentó ausencia total de cambio graso macrovesicular; cambio graso microvesicular mínimo y difuso; hipertrofia hepatocelular ausente; necrosis multifocal; mínima presencia de cariocitomegalia; infiltración focal de células inflamatorias principalmente en zona periportal; presencia minoritaria de hipertrofia de células endoteliales; presencia de hiperplasia de conductillos biliares; presencia mayoritaria de colangiofibrosis; y se observó la presencia de hiperplasia células ovaes.

En el tratamiento con PN + TI 24 h (Figura 7. L), se evidenció la ausencia de cambio graso macrovesicular; cambio graso microvesicular mínimo y difuso; ausencia de hipertrofia hepatocelular; necrosis de ligera zonal/difusa a multifocal; cariocitomegalia ausente; mínima infiltración de células inflamatorias focalizada en regiones periportal, mediolobular y centrilobular; presencia en mayoría de hipertrofia de células endoteliales; presencia de hiperplasia de conductillos biliares; presencia de colangiofibrosis en mayoría de las muestras y del mismo modo la presencia de hiperplasia de células ovaes.

Finalmente, las imágenes de la M a la P, se presentan los grupos del modelo de dislipidemia 48 h.

La Figura 7. M, presenta el grupo dañado con TI 48 h, donde se observó cambio graso macrovascular de ausente a mínimo difuso; cambio graso microvascular mínimo difuso;

hipertrofia hepatocelular ausente; ausencia de necrosis; presencia en minoría de cariocitomegalia; infiltración de células inflamatorias focal en zonas mediolobular, periportal y centrilobular; no se observó la presencia de hipertrofia de células endoteliales; hiperplasia de conductillos biliares presente; colangiofibrosis presente en la mayoría de muestras; y la presencia de hiperplasia de células ovaes.

El tratamiento con EN + TI 48 h corresponde a la Figura 7. N; se evidencia un cambio graso macrovesicular y microvesicular de ausente a mínimo-difuso; ausencia de hipertrofia hepatocelular; ausencia de necrosis; cariocitomegalia ausente; infiltración de células inflamatorias principalmente focalizada en regiones periportal, mediolobular y centrilobular; hipertrofia de células endoteliales ausente; presencia de hiperplasia de conductillos biliares; colangiofibrosis ausente en mayoría; e hiperplasia de células ovaes en minoría.

En el grupo administrado con PE + TI 48 h (Figura 7. Ñ), se observó cambio graso macrovesicular ausente en mayoría; cambio graso microvesicular ausente a mínimo difuso; hipertrofia hepatocelular ausente; necrosis con distribución multifocal; cariocitomegalia presente; infiltración de células inflamatorias focal en zonas periportal, mediolobular y centrilobular; presencia de hipertrofia de células endoteliales; hiperplasia de conductillos biliares presente; ausencia mayoritaria de colangiofibrosis; e hiperplasia de células ovaes presente.

El tratamiento con PN + TI 48 h (Figura 7. O), presentó cambio graso macrovesicular principalmente ausente y mínimo o leve/ difuso en una minoría; cambio graso microvesicular de leve a marcado difuso; ausencia de hipertrofia hepatocelular; necrosis multifocal en minoría; cariocitomegalia ausente; infiltración focal de células inflamatorias, principalmente en zonas periportal y mediolobular; presencia de hipertrofia de células endoteliales; hiperplasia de conductillos biliares presente en mayoría; presencia de colangiofibrosis; finalmente, no se observó la presencia de hiperplasia de células ovaes.

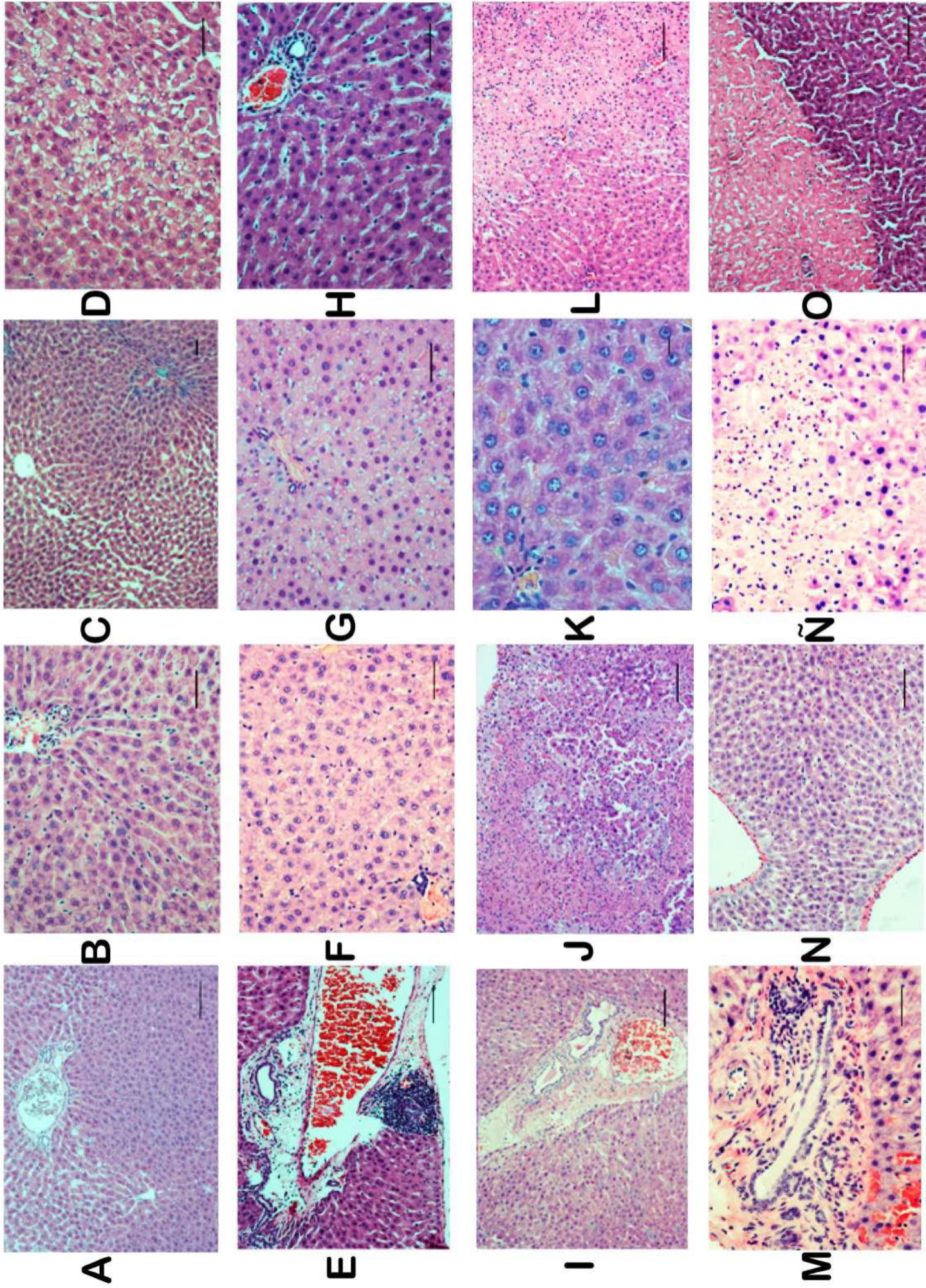


Figura 7. Panel del análisis histológico. Cortes de tejido hepático; tinción hematoxilina/eosina. **A.** Sl; **B.** EN; **C.** PE; **D.** PN; **E.** TC; **F.** EN+TC; **G.** PE+TC; **H.** PN+TC; **I.** T124; **J.** EN+T124; **K.** PE+T124; **L.** PN+T124; **M.** T148; **N.** EN+T148; **Ñ.** PE+T148; **O.** PN+T148. **Sl:** solución isocalórica; **EN:** Enterogermina®; **PE:** pulque envasado; **PN:** pulque natural; **Ti:** tiloxapoli; **TC:** tetracloruro de carbono.

Análisis molecular: Lipidómica

Los espectros de RMN obtenidos fueron procesados incluyendo apodización (exponencial=-0.3 Hz, Gaussiana= 0.6 Hz), corrección de fase, corrección de línea base, alineamiento y normalización por el pico de tetrametilsilano (TMS, 0.0 ppm) y la división en regiones o binning (desde -0.01 ppm – 7.00 ppm, ancho= 0.04 ppm).

La Figura 8 muestra un espectro representativo general de ^1H NMR en el que se observan las señales representativas de grupos de lípidos como el CH_3 -18 del colesterol (0.6 ppm), los CH_3 - ácidos grasos libres (FA) (1.2 ppm – 1.4 ppm); saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) (0.8 – 0.9 ppm, 1.6 ppm, 2.0 ppm, 2.3 ppm, 2.8 ppm). Además de los grupos $-\text{N}(\text{CH}_3)$ de la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) (3.3 ppm) y $-\text{CH}_2$ de los glicerolípidos (GL) (5.3 ppm) (Li *et al.*, 2017).

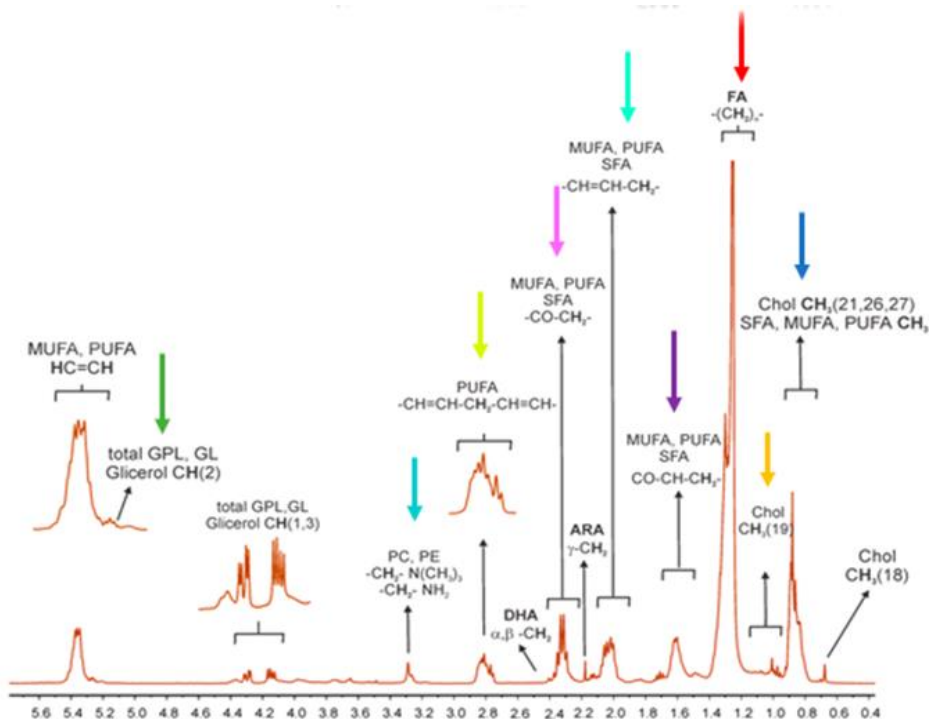


Figura 8. Espectro representativo general de ^1H NMR. Las flechas muestran las señales de los grupos de lípidos analizados presentes en los tres modelos realizados.

Los espectros de se normalizaron por la señal más alta y se alinearon para realizar un binning de 0.04 ppm. El anglicismo *binning*, en ocasiones llamado *bucketing* es una técnica de preprocesamiento de datos, la cual permite disminuir la interferencia de artefactos y facilita el análisis separando los datos en pequeños intervalos que adquirirán un valor numérico representativo, habitualmente la media (Figura 9). De esta manera los espectros de RMN se convierten en una tabla o matriz de datos, la cual facilita el análisis estadístico multivariado.

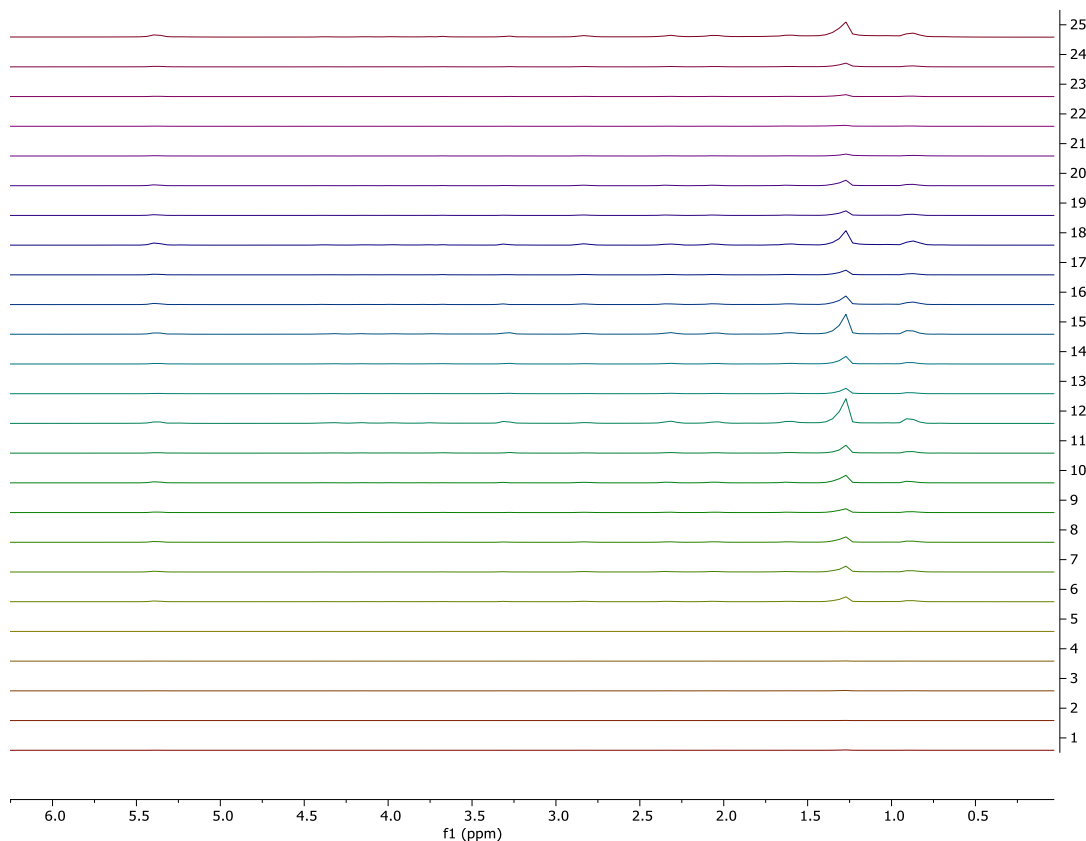


Figura 9. Espectros representativos (alineado). Los trazos marcados del 1-5 corresponden al grupo control (SI); 6-10 al control dañado con CCl_4 (TC); 11-15 al tratamiento con pulque natural (PN); 16-20 al tratamiento con Enterogermina® (EN); 21-25 al tratamiento con pulque envasado (PE).

Se realizó un análisis multivariado incluyendo métodos no supervisados como análisis de componentes principales (PCA) y, posteriormente, supervisados como análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para cada uno de los modelos de daño, comparando los grupos tratados, el control de daño y el control sano. Es importante mencionar que los grupos administrados con EN, PE y PN, pero sin inducción de daño, no se incluyen ya que los análisis bioquímicos e histológicos realizados no exhibieron

modificaciones con respecto al grupo sano. Aun así, el análisis multivariado se realizó comparando el grupo control de controles y el control de daño de cada modelo contra los grupos control de cada tratamiento, y en ninguno se observó una separación evidente.

EHNA

El gráfico de puntuación de PCA (Figura 10) muestra una evidente separación entre los grupos, sin destacar cualquier valor atípico. Dos componentes principales (PC-1 y PC-2) se calcularon en la construcción del modelo con los siguientes porcentajes de variación: PC-1 = 89.4 % y PC-2 = 5.12 %. El diagrama de cargas para PC-1 (Figura 11) muestra los grupos de lípidos de importancia para la separación de PCA entre las muestras de grupos con tratamiento (EN, PE o PN), y los grupos control (SI y TC).

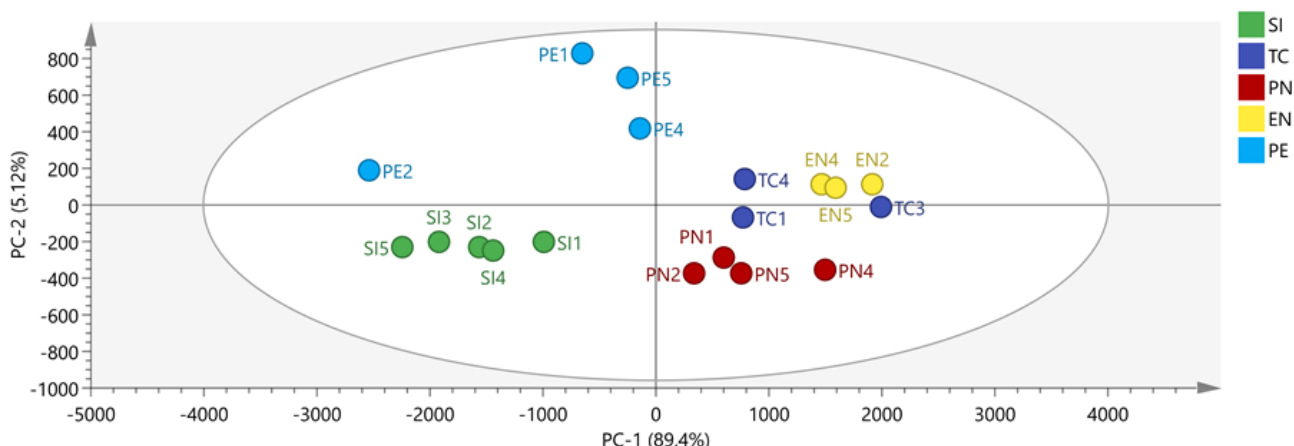


Figura 10. Gráfico de puntuación de PCA (EHNA). Gráfico de puntuación de PCA derivado de los espectros de ^1H NMR de los grupos de cada uno de los tratamientos y los controles sano y dañado.

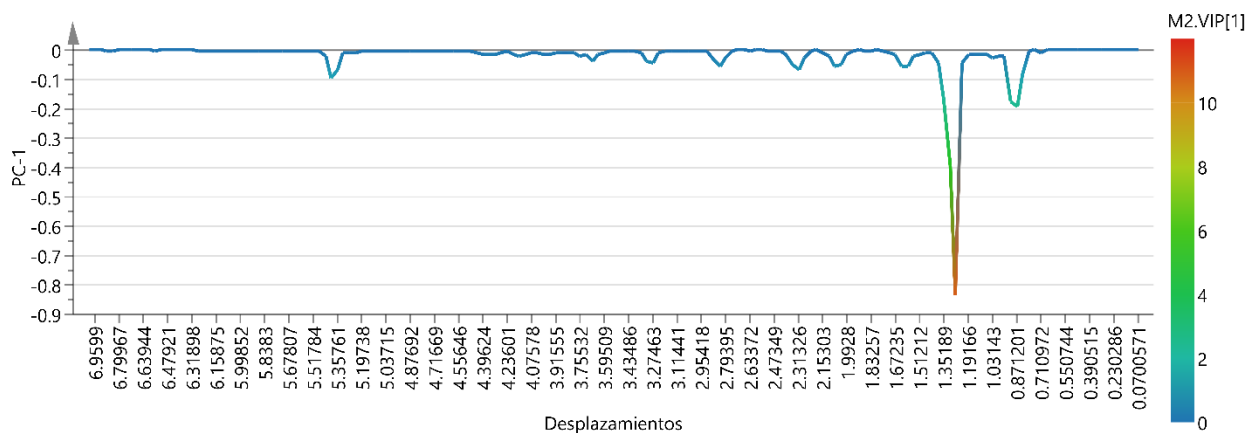


Figura 11. Diagrama de cargas. Importancia de la variable para la predicción (VIP).

Para optimizar las diferencias entre los perfiles metabólicos de los grupos de estudio se llevó a cabo un análisis supervisado PLS-DA (F-1= 89.4 % y F-2= 5.09 %), mostrando resultados similares a PCA y una clara separación entre los grupos EN, PE, PN, SI y TC. Por otra parte, los parámetros en la prueba de permutación de la variación ($R^2 = 0.988$) y la capacidad de predicción ($Q^2 = 0.343$) fueron significativos, lo que indica una capacidad predictiva satisfactoria del análisis (Figura 12).

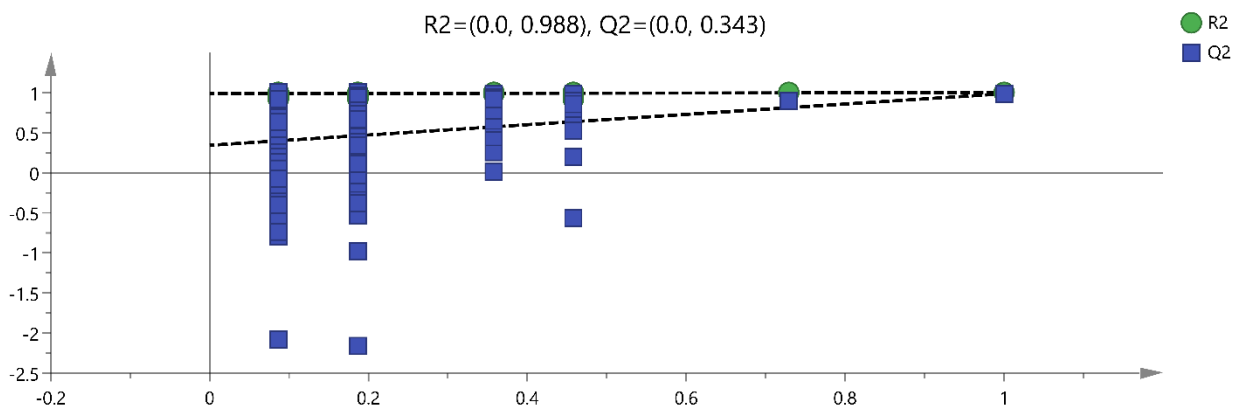


Figura 12. Diagrama de coeficiente de correlación. Análisis de permutación (200 veces) para validación estadística.

Dislipidemia 24 h

El gráfico de puntuación de PCA (Figura 13) muestra una evidente separación entre los grupos SI, PE, EN, PN y el grupo TI. Dos componentes principales (PC-1 y PC-2) se calcularon en la construcción del modelo con los siguientes porcentajes de variación: PC-1 = 93.5 % y PC-2 = 4.77 %. El diagrama de cargas para PC-1 (Figura 14) muestra los grupos de lípidos de importancia para la separación de PCA entre las muestras de grupos con cada uno de los tratamientos, y los grupos control sano y dañado.

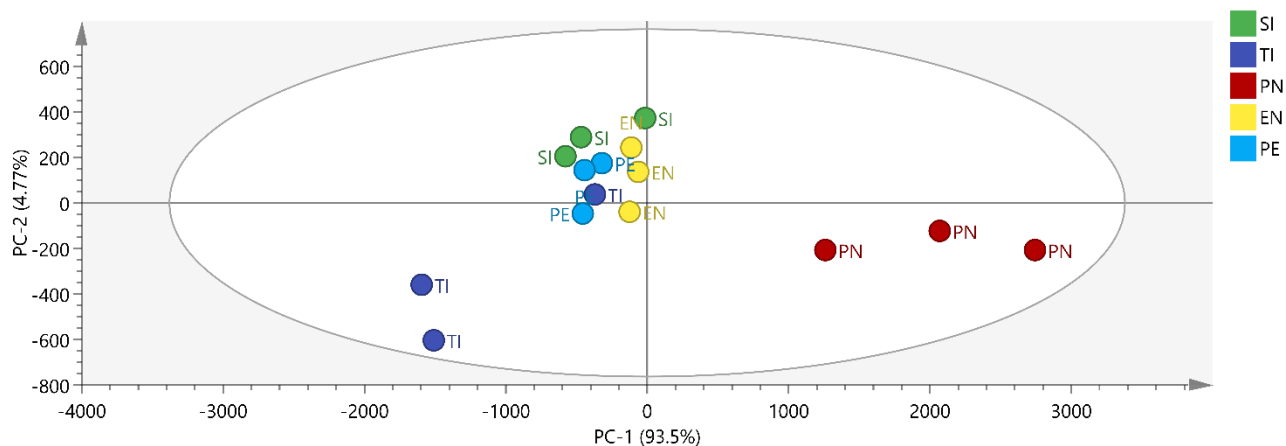


Figura 13. Gráfico de puntuación de PCA (DSL 24 h). Gráfico de puntuación de PCA derivado de los espectros de ^1H NMR de los grupos de cada uno de los tratamientos y los controles sano y dañado.

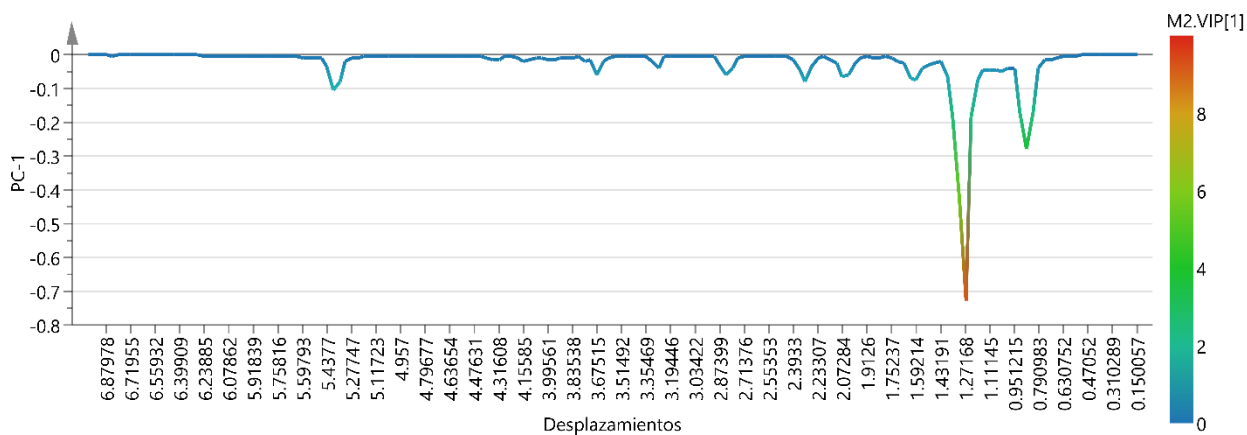


Figura 14. Diagrama de cargas. Importancia de la variable para la predicción (VIP).

El análisis supervisado PLS-DA (F-1= 93.5 % y F-2= 4.77 %), mostró resultados similares a PCA y una clara separación entre los grupos con cada uno de los tratamientos y el grupo dañado con TI. Los parámetros en la prueba de permutación de la variación ($R^2 = 0.299$) y la capacidad de predicción ($Q^2 = -0.281$) fueron bajos, lo que indica una capacidad predictiva no satisfactoria del análisis (Figura 15).

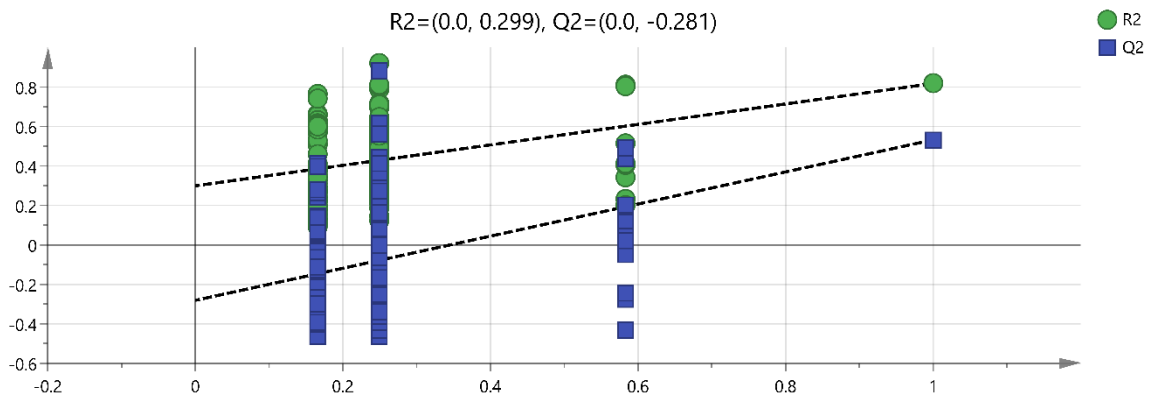


Figura 15. Diagrama de coeficiente de correlación. Análisis de permutación (200 veces) para validación estadística.

Dislipidemia 48 h

La Figura 16 corresponde al gráfico de puntuación de PCA del modelo de dislipidemia de 48 h muestra una evidente separación entre los grupos control sano (SI) y dañado (TI) y, los grupos con tratamiento PE, EN, PN. Los dos componentes principales (PC-1 y PC-2) se calcularon en la construcción del modelo con los siguientes porcentajes de variación: PC-1 = 92.2 % y PC-2 = 3.38 %. El diagrama de cargas para PC-1 (Figura 17) muestra los grupos de lípidos de importancia para la separación de PCA entre las muestras de grupos con cada uno de los tratamientos, y los grupos control sano y dañado.

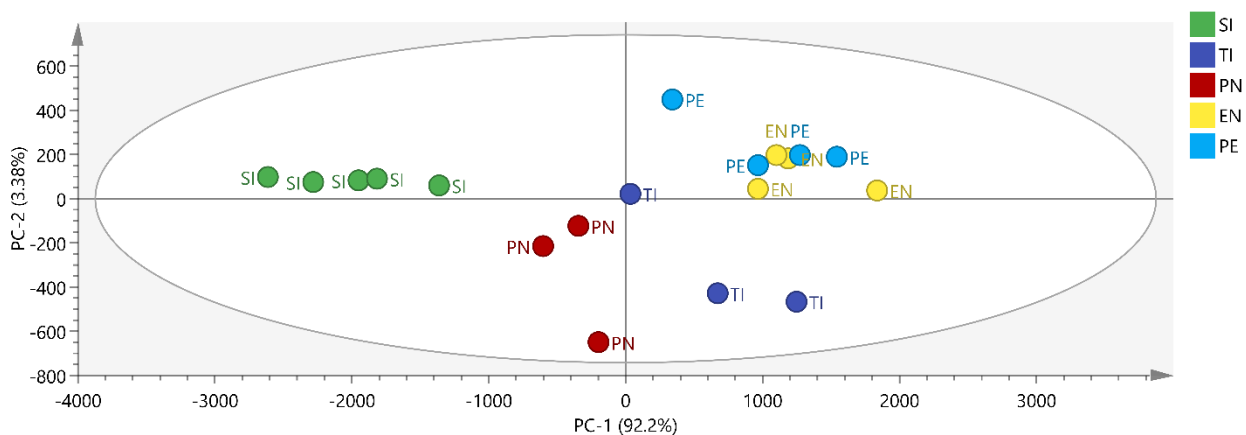


Figura 16. Gráfico de puntuación de PCA (DSL 48 h). Gráfico de puntuación de PCA derivado de los espectros de ^1H NMR de los grupos de cada uno de los tratamientos y los controles sano y dañado.

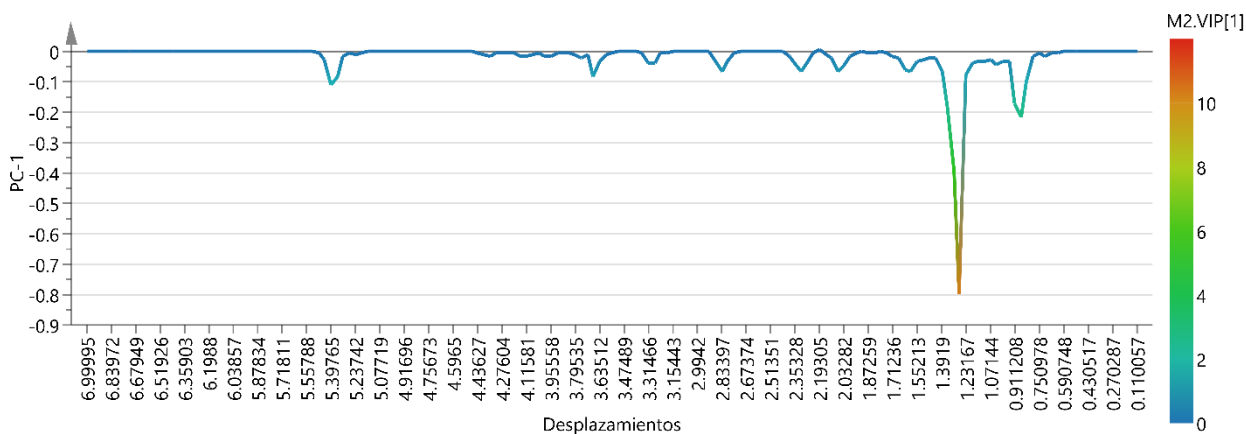


Figura 17. Diagrama de cargas. Importancia de la variable para la predicción (VIP).

El análisis supervisado PLS-DA realizado (F-1= 92.2 % y F-2= 3.29 %), mostró resultados similares a PCA y una clara separación entre los grupos con cada uno de los tratamientos y los grupos control sano y dañado. En la Figura 18 se muestran la prueba de permutación donde los parámetros de la variación ($R^2 = 0.115$) y la capacidad de predicción ($Q^2 = -0.324$) fueron bajos, lo que indica una capacidad predictiva no satisfactoria del análisis.

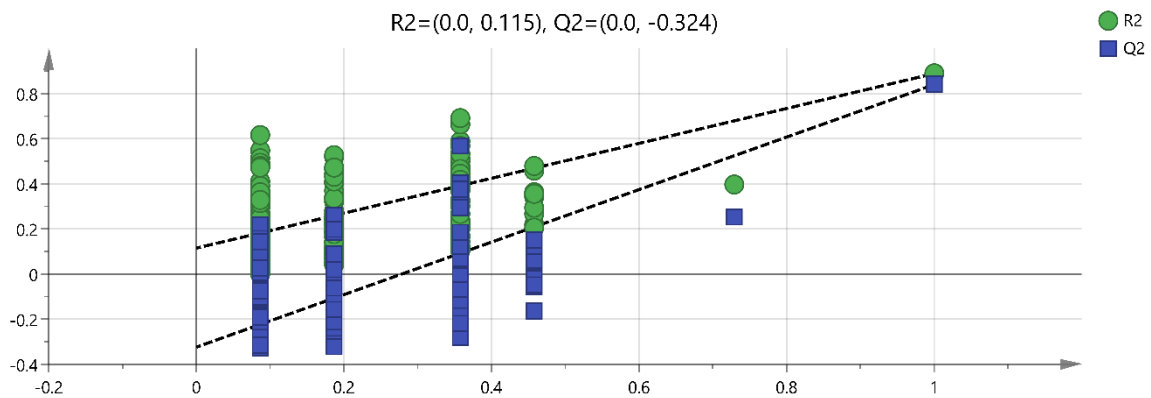


Figura 18. Diagrama de coeficiente de correlación. Análisis de permutación (200 veces) para validación estadística.

De forma general, los principales grupos de lípidos responsables de la separación entre grupos para cada uno de los modelos se muestran en la Figura 19 que corresponde a las gráficas de puntuación según la importancia de la variable para la predicción (VIP), obtenidas a partir del análisis PLS-DA. A la carga de cada variable se les asignó el color por VIP y se muestran los desplazamientos de los grupos de lípidos significativos responsables de los patrones de agrupamiento. Los valores positivos indican los metabolitos sobre-regulados en los grupos con tratamiento en comparación con los grupos sano y dañado, principalmente FA. Por otra parte, los valores en la dirección negativa indican los metabolitos con regulación a la baja, incluyendo COL y fosfolípidos (PC y PE). Estas tendencias son similares a las observadas por el análisis no supervisado PCA y son consistentes con los diagramas de cargas presentados en cada uno de los modelos.

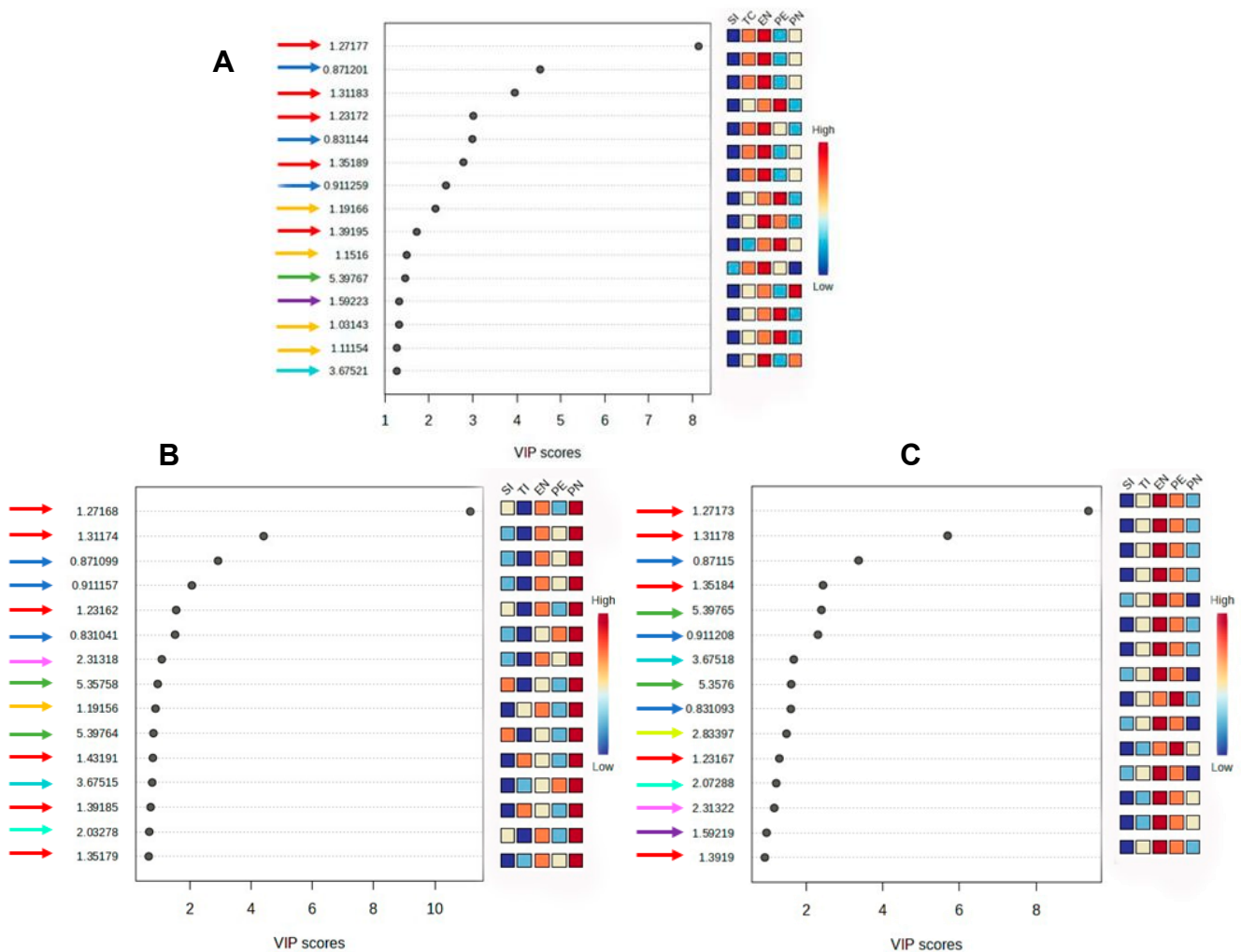


Figura 19. Gráfica de puntuación para la importancia de la variable para la predicción (VIP). **A.** EHNA. **B.** Dislipidemia 24 h. **C.** Dislipidemia 48 h.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Fase 1. Caracterización microbiológica y química del pulque

Análisis microbiológico

La carga microbiana del PN (3×10^7 UFC/mL) resultó menor con relación a otros estudios, por ejemplo, los resultados del conteo difieren con reportes en los que la carga total de UFC es de 7×10^7 UFC/mL; esta diferencia estaría relacionada con el tiempo de fermentación de cada producto, es decir, el pulque analizado en dicho artículo cuenta con 6 horas más de fermentación (Escalante et al., 2008), mientras que el pulque utilizado en este estudio cuenta únicamente con una hora de fermentación. Otros autores señalan que, particularmente, las bacterias ácido-lácticas se encuentran en concentraciones desde 6×10^7 hasta 2×10^{11} UFC/mL, sin embargo, para tal concentración también influiría el tiempo de fermentación y el proceso de elaboración del pulque (Valadez-Blanco et al., 2012; Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020). Con relación a la ingesta sugerida de UFC, es necesario considerar que una parte no llegará viva a nivel gastrointestinal, por ello, no será viable; por ello, algunos autores refieren concentraciones aceptables entre 10^8 y 10^{11} UFC (Marco et al., 2020); así, generalmente los productos comerciales como Enterogermina®, Sinuberase®, o un variedad amplia de nutracéuticos y suplementos alimenticios contienen en promedio concentraciones de miles de millones (10^9) UFC e incluso, la FAO y la OMS sugieren que para que los microorganismos viables proporcionen un nivel de funcionalidad o un efecto mínimo terapéutico, el producto debe contener como mínimo 10^6 UFC por gramo de cepas probióticas viables (Duysburgh et al., 2023; Ramírez-Olea et al., 2024). Es importante realizar análisis como una cinética de crecimiento para determinar la fase exponencial, así como la fase fija de la curva de crecimiento y, de esta forma, optimizar la concentración de microorganismos e intentar incrementar en la menor cantidad posible la ingesta de etanol (Üçok & Sert, 2020).

La identificación de microorganismos en el pulque no varió entre lotes diferentes, sin embargo, la composición tanto microbiana como química del pulque puede variar según factores numerosos, entre ellos, la especie de agave utilizada, su localización geográfica, la edad de la planta, la proporción aguamiel fresco y fermentado (semilla), las condiciones de la región, así como el proceso de producción en general (Astudillo-Melgar et al., 2023). Por ejemplo, algunos estudios demuestran los cambios en la diversidad y proporción microbiana y la dinámica poblacional con relación el tiempo de fermentación e incluso al

contenido de fructooligosacáridos (FOS, agavinas y saponinas) disponible, los géneros principales reportados son *Zymomonas*, *Sphingomonas*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Halomicronema*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Marivitia*, *Serratia*, *Weissella*, *Obesumbacterium*, *Saccharomyces*, *Candida* y *Clavispora* (Astudillo-Melgar *et al.*, 2023; Rocha-Arriaga *et al.*, 2020; Chacón-Vargas *et al.*, 2020; Peralta-García *et al.*, 2020). Los géneros identificados en este trabajo, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* se encuentran entre la descripción anterior y son consistentes con reportes diversos; de hecho, *Saccharomyces* se considera el género principal relacionado con el proceso de fermentación alcohólica del pulque y, algunas bacterias, principalmente *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acinetobacter*, *Acetobacter*, y *Gluconobacter*, son responsables de las propiedades organolépticas del producto (*Leuconostoc* spp. asociado con sabor y viscosidad principalmente) ya que producen ácido láctico y acético, respectivamente (Escalante *et al.*, 2008; Mora-López *et al.*, 2011; Escalante *et al.*, 2016). Sin embargo, caracterizaciones como las mencionadas se han realizado en diferentes tiempos del proceso de fermentación, y secuenciando los amplicones del gen ARNr 16S (regiones V3 y V4) (357F (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')) y (939R (5'-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC-3')) para bacterias y para levaduras ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'), como se mencionó anteriormente es necesario seleccionar genes específicos para obtener resultados concretos y amplios (Chomczynski *et al.*, 1997; Astudillo-Melgar *et al.*, 2023; Rocha-Arriaga *et al.*, 2020; Huevo-Sánchez *et al.*, 2023).

Se ha considerado el potencial probiótico de algunos microorganismos aislados del pulque, principalmente los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* e incluso *Saccharomyces*; sin embargo, es necesario realizar análisis para confirmar la capacidad probiótica y capacidad fermentable de los compuestos tanto químicos como microbianos encontrados en el pulque (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020; Pais *et al.*, 2021).

Existen propiedades diversas que permiten caracterizar a una especie como probiótico útil. Entre las propiedades funcionales, se encuentran la capacidad de supervivencia y al tránsito, en este caso, desde la cavidad oral hasta el tracto gastrointestinal, esto implica además resistencia a enzimas digestivas, sales biliares, ácidos gástricos, y condiciones de pH y temperatura del hospedero. Además, la capacidad de colonización (incluyendo autoagregación, coagregación) y adherencia a las células epiteliales; también, es necesario comprobar su seguridad, descartando la producción de toxinas y patogenicidad. En el caso

del trabajo presente, no ha sido evaluada la capacidad de los microorganismos del pulque para llegar al tracto gastrointestinal en concentraciones adecuadas, sobrevivencia y colonización; sin embargo, con base en los reportes referentes a concentraciones de UFC y antecedentes propios de las especies halladas, resulta un reto, pero con resultados prometedores (Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021).

Análisis químico proximal, contenido etanólico y de fenoles totales.

Los resultados obtenidos en este análisis químico proximal y contenido etanólico, son consistentes, con reportes bromatológicos de otros autores (León-de la O *et al.*, 2012). Sin embargo, la composición del pulque podría variar según la especie de maguey, las condiciones ambientales, la localización, la madurez y edad de la planta, además del proceso de elaboración en general y el tiempo de fermentación (esta última relacionada también con la proporción de los microorganismos); sin embargo, estas variaciones serían particularmente relativas a la concentración de los componentes tanto microbiológicos como químicos, ya que dichos componentes coinciden cualitativamente en los análisis realizados por autores diversos, principalmente en cuanto a la presencia de bacterias ácido lácticas, levaduras, y acetobacterias; asimismo, la composición química coincide con reportes de autores que han evaluado pulque producido en diferentes partes del país, diferentes tiempos de fermentación, y en diferentes temporadas (Robledo-Márquez *et al.*, 2021; Dávila-Ortiz *et al.*, 2022).

En especies de maguey diferentes y en el pulque, se ha reportado la presencia compuestos fenólicos, de saponinas, y FOS, en particular, agavinas (estructuras similares a la inulina, pero, a diferencia de esta que es lineal, están formadas por cadenas ramificadas), que han sido aislados y evaluados; de hecho, las agavinas y los demás metabolitos han mostrado actividad como prebióticos (Santiago-García *et al.*, 2021; Puente-Garza *et al.*, 2018; Robledo-Márquez *et al.*, 2021). En el aguamiel, que es la materia prima para la elaboración del pulque, también se ha identificado la presencia de fructanos, vitaminas, minerales, aminoácidos como lisina y triptófano, saponinas, ácidos grasos y compuestos fenólicos, principalmente kaempferol, miricetina, y quercetina, que se considera participan en la modulación de la microbiota, por ejemplo, incrementando la población de *Bifidobacterium bifidum* (Dávila-Ortiz *et al.*, 2022). En este estudio se obtuvo una concentración menor de compuestos fenólicos (236 ± 9.15 y 137 ± 23.51 μg EAG/mL en el PN y PE, respectivamente), lo que difiere mucho con la concentración hallada en el maguey donde se cuantificaron 5-13 mg EAG/g; sin embargo, los autores reportan que la concentración de

EAG varía de acuerdo con la etapa de desarrollo del maguey, encontrando el máximo en la segunda etapa evaluada. En general, en cualquier etapa los compuestos identificados de forma mayoritaria corresponden a kaempferol, quercetina y miricetina; esto podría variar en el pulque, así como las agavinas, debido a los mismos factores, así como a que los componentes del maguey no tienen que estar presentes en la misma cantidad o calidad luego de la fermentación (Puente-Garza *et al.*, 2018).

8.2 Fase 2. Análisis *in vivo*

Análisis bioquímico

Los resultados de los marcadores de este análisis, sobre todo los indicadores de necrosis, colestasis, y del perfil lipídico, son consistentes con reportes de varios autores que han administrado probióticos, prebióticos, e incluso simbióticos en modelos de EHmet, EHNA, e hiperlipidemia; se ha reportado ampliamente que la administración de especies como *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Weizmannia* spp., y acompañadas de prebióticos, principalmente FOS, logran disminuir los niveles de ALT, AST, GGTP, FA, citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, y TNF- α (Yan *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2021; Jantararussamee *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2020; Behrouz *et al.*, 2020; Malaguarnera *et al.*, 2012; Abhari *et al.*, 2020). El consumo de probióticos y prebióticos también ha mostrado regular los niveles de triglicéridos, colesterol total, y LDL, que se ha relacionado con el incremento en la generación de ácidos grasos de cadena corta, esto principalmente debido a la administración de especies como *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Sacharomyces* spp., entre otras y, generalmente, acompañados de prebióticos como la inulina (Yoo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; He & You, 2020; Wa *et al.*, 2019).

Específicamente el PN mostró mejorar parcial o totalmente la mayoría de los marcadores antes mencionados en el modelo de EHNA y en dislipidemia de 24 h, excepto el nivel de triglicéridos, esto se atribuye a la presencia de diferentes especies con potencial probiótico que implican una mejora en la diversidad de la microbiota gastrointestinal; el PE, a pesar de ser un producto pasteurizado logró mejorar algunos niveles de EHNA y dislipidemia de 24 h, esto se atribuye a que pese a no tener microorganismos vivos, contiene metabolitos secundarios producidos por las bacterias y levaduras presentes antes del proceso de pasteurización, mismos que se conocen como posbióticos. Por su parte, la EN también mostró un efecto positivo en algunos marcadores, pero contrario a lo esperado, no mejoró en su totalidad ninguno de los padecimientos, e incluso, durante el modelo de 24 h,

presumiblemente causó un efecto sinérgico en el daño. Lo anterior puede ser debido a que, igual que para el PN, la concentración de UFC se administró en una cantidad menor a la dosis del producto, es decir, el producto contiene 2 mil millones de UFC/5 mL, sin embargo se realizó una dilución para administrar una carga microbiana equivalente a la del PN; por lo tanto, las UFC no llegarían en cantidades suficientes para colonizar a nivel gastrointestinal y tener el efecto esperado, además es importante considerar que se trata de una especie en particular, *Bacillus clausii*, y como se ha observado en apartados previos, es más efectivo administrar una diversidad de especies y, preferentemente, acompañarlas de prebióticos y en concentraciones mayores para asegurar la supervivencia necesaria. El modelo de dislipidemia 48 h resultó mucho más agresivo, por lo que no se observó un efecto positivo en general, esto probablemente se debe a que durante la inducción de dislipidemia por tiloxapol, el nivel de TG y COLT llega a su punto más alto a partir de las 48 h, comenzando a descender a partir de las 72 h, por ello, al ser un modelo preventivo, el modelo de 24 h simularía mejor al curso natural de la dislipidemia en humanos, en la que el incremento es gradual a través del tiempo (Marco *et al.*, 2020; Üçok & Sert, 2020; Tsilingiri & Rescigno, 2013; Rasouli *et al.*, 2016).

Estos efectos positivos relacionados con la microbiota se atribuyen a diversos mecanismos de acción asociados a diversos receptores, ya que la microbiota produce ácidos biliares secundarios y terciarios que son reguladores de esos receptores y factores nucleares de transcripción, así como metabolizan fibra, lípidos, y azúcares que pueden generar ácidos grasos de cadena corta (AGCC), entre otros compuestos bioactivos (Rodríguez-Pastén *et al.*, 2023). Como se ha mencionado en el cuerpo de este trabajo, la dislipidemia y la EHNA, conllevan un descontrol significativo en el metabolismo de lípidos, el mecanismo asociado involucra la activación de diversos receptores; algunos de los receptores principales implicados son el receptor X a farnesoide (FXR), que se expresa en gran medida en los órganos enterohepáticos junto con el receptor 5 acoplado a proteínas G (TGR-5, Takeda G protein-coupled receptor 5) (Ducastel *et al.*, 2020). Los ácidos biliares son las moléculas de señalización que modulan los receptores FXR y TGR-5 y estos desempeñan un papel clave en el control de la homeostasis energética mediante el control de los lípidos y la glucosa (Figura 20); además, juegan un papel clave en la regulación de la circulación enterohepática de ácidos biliares y el transporte desde el hígado al intestino, que es un mecanismo fisiológico importante para mantener la homeostasis de glucosa, lípidos, y energía y con ello, prevenir la hiperglucemia, dislipidemia, obesidad, y enfermedades metabólicas inflamatorias de los sistemas digestivo y cardiovascular. Específicamente, la activación de

FXR hepático ejerce efectos beneficiosos sobre la esteatosis, la inflamación, la fibrosis, y las funciones endoteliales del hígado, por lo tanto, el uso de análogos de FXR resulta útil en el tratamiento de la ENHA (Ducastel *et al.*, 2020; Chiang & Ferrel, 2020).

Por otro lado, los receptores X del hígado (LXR), juegan un papel fundamental en la homeostasis del COL y el metabolismo de los ácidos biliares, pero a diferencia de FXR y TGR-5, la activación de LXR da como resultado una síntesis elevada de ácidos grasos hepáticos, esteatosis y un aumento de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad ricas en TG, resultando en el desarrollo de HTG. Por lo tanto, este aumento de la lipogénesis hepática se ha atribuido en gran medida a la regulación positiva dependiente de LXR de la expresión de la proteína de unión a elementos reguladores de colesterol (SREBP) (Cha & Repa, 2007; Katsoli *et al.*, 2020). Las proteínas SREBP, son cruciales en la regulación de genes implicados en la síntesis del COL, los ácidos grasos y los TG; durante la EHmet las tasas de lipogénesis son tres veces más altas que en individuos sanos, ya que, SREBP1c se activa e incrementa la actividad lipogénica, contribuyendo al progreso a EHNA (Li *et al.*, 2023).

Finalmente, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)- α y - γ , son factores de transcripción nuclear que regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, y proteínas. PPAR- α se expresa en gran medida en los músculos, el hígado, el corazón, y los riñones, mientras que PPAR- γ se expresa abundantemente en tejido adiposo. Ambos, juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y los lípidos y son activados por muchos factores ambientales, desde xenobióticos hasta compuestos alimentarios (Rigano *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2020). Específicamente, PPAR- α se asocia con la regulación de genes clave que codifican proteínas y enzimas involucradas principalmente en el transporte de lípidos y la β -oxidación de ácidos grasos; PPAR- γ se encuentra relacionado, además, con el metabolismo de carbohidratos (Shen *et al.*, 2020).

Otro mecanismo de acción de la microbiota es mediante la producción de metabolitos o postbióticos, específicamente a esto se atribuyen los efectos positivos observados en el tratamiento con PE, ya que no contiene microorganismos vivos; como se mencionó previamente, mediante la digestión y fermentación de las fibras dietéticas se produce una gama amplia de estos metabolitos reguladores de la salud, que incluyen vitaminas específicas, ácidos biliares, AGCC, poliaminas, aminoácidos de cadena ramificada o ácidos teicoicos, y los efectos principales reportados son antiinflamatorios, antioxidantes,

antihipertensivos, antiproliferativos, antimicrobianos, hipocolesterolémicos, e inmunomoduladores, aunque principalmente, los AGCC se relacionan con la inhibición de la lipogénesis mediante la regulación a la baja de la ácido graso sintasa; particularmente el ácido butírico ha mostrado mejorar la EHmet, además de promover el incremento de la población de bacterias ácido lácticas (Pelton, 2020; Arellano *et al.*, 2022; Barros *et al.*, 2020; Aguilar *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2018). De hecho, la administración de un extracto celular de *L. paracasei* mostró la reducción de TG, CT, LDL, VLDL, AST y ALT, el efecto fue mejor incluso que la atorvastatina (Osman *et al.*, 2021).

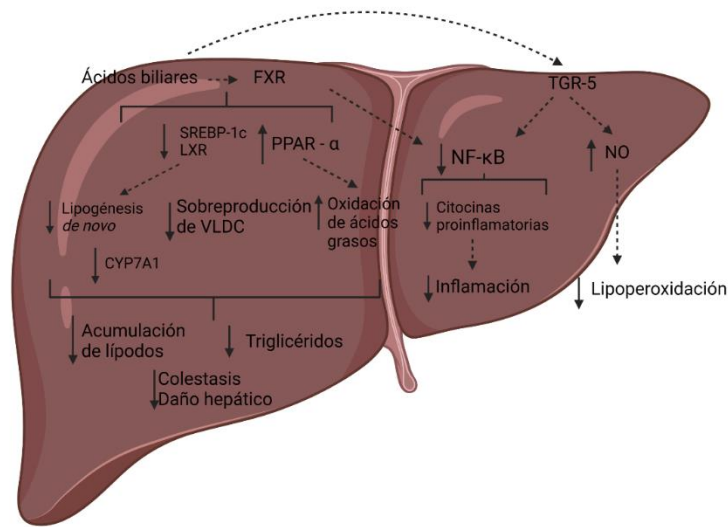


Figura 20. Mecanismo de acción de FXR y TGR-5. Los ácidos biliares se unen a FRX, cuando se activa, se suprime la expresión de CYP7A1 y, por lo tanto, se reduce la síntesis de lípidos *de novo*; sin embargo, la capacidad de activación de FXR difiere entre ácidos biliares (CDCA> DCA> LCA> CA). Además, FXR inhibe la lipogénesis mediada por SREBP-1c y LXR e induce el receptor PPAR-α, que promueve la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación). Luego, la activación de FXR contribuye a la reducción de la acumulación de grasa en el hígado y la reducción de TG séricos al inhibir la lipogénesis y controlar la sobreproducción de VLDL. Asimismo, FXR, ejerce un efecto antiinflamatorio al suprimir NF- κ B, lo que implica disminuir la secreción de citocinas proinflamatorias. De igual forma, TGR-5 está involucrado en la supresión de NF- κ B, por lo tanto, en la reducción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Finalmente, TGR-5 se asocia con la síntesis de ON, sugiriendo su participación como promotor de un efecto antioxidante y la disminución del proceso de lipoperoxidación (Rodríguez-Pastén *et al.*, 2023).

Análisis coproparasitológico

El pulque es una bebida que se considera histórica en México y existen registros de su elaboración y consumo desde la época prehispánica, sin embargo, la industria pulquera ha sido afectada, ya que, desde hace varias décadas han surgido mitos que permanecen en la actualidad alrededor de la higiene durante la elaboración, y específicamente sobre el proceso de fermentación, por ejemplo, existen cuestionamientos sobre el uso de material fecal como acelerador del proceso de fermentación; sin embargo, esta idea es equivocada ya que las características químicas y organolépticas del pulque se verían afectadas, el olor, el color, la viscosidad, etc. (Navarrete-Torres & García Muñoz-Aparicio, 2021). Por ello, se realizó de forma complementaria el estudio coproparasitológico en el trabajo presente y no se observó la presencia de parásitos intestinales después de la administración del pulque; además, ha sido estudiada ampliamente la elaboración y la composición microbiana tanto del pulque como del aguamiel. Como se menciona en apartados previos, el proceso de fermentación del pulque es un proceso no controlado y llevado a cabo por los microorganismos presentes de forma natural en el maguey además de la adición de un fermento o semilla (procedimiento de lote alimentado), la mezcla se lleva a cabo en contenedores de madera, barro o plástico, para mantener un volumen constante, y este se retira hasta su consumo; por ello, la semilla se considera el iniciador de pulque y se usa precisamente para optimizar la fermentación de la bebida debido a que incrementa la carga microbiana (García-Arce & Castro-Muñoz, 2021); también, se conocen detalladamente las especies que participan en la fermentación de este producto y le proporcionan las características específicas a la bebida; las principales son *Saccharomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Acinetobacter* spp., *Acetobacter* spp., y *Gluconobacter* spp. (Escalante *et al.*, 2008; Mora-López *et al.*, 2011; Escalante *et al.*, 2016).

Análisis histológico

Los hepatocitos esteatósicos y la infiltración de células inflamatorias se observaron en todos los grupos del presente estudio, las causas probables se describen a continuación. Durante la EHmet, la presencia de macrovesículas de grasa en áreas perivenulares es una característica típica, sin embargo, los cambios grasos microvesiculares son característicos y aparecen comúnmente en estadios más avanzados como la EHNA y su aparición se atribuye a una lesión mitocondrial; conforme la esteatosis progresa, la aparición de microvesículas deja de focalizarse en forma zonal para distribuirse homogéneamente por toda la zonas acinares. Las vesículas o vacuolas se aprecian como espacios vacíos y transparentes debido a que los lípidos se eliminan durante el procesamiento del tejido (Cataldo *et al.*, 2021). Otra característica de la EHNA es la inflamación lobulillar, donde se observa la infiltración de células inflamatorias, generalmente se presenta de forma leve y se caracteriza por focos pequeños de células inflamatorias, linfocitos T CD4+ y CD8+, junto con macrófagos y, ocasionalmente, se encuentran neutrófilos. Los hepatocitos rodeados de estas células se denominan lipogranulomas; sin embargo, a pesar de estar presentes, no tienen una implicación grave sin acompañarse de cambios en los marcadores bioquímicos, ya que, para un diagnóstico, se requiere que ambos criterios (bioquímicos e histológicos), estén correlacionados, lo anterior sugiere fuertemente que hay una tendencia del PN a mejorar tales condiciones (Burt *et al.*, 2015; Cataldo *et al.*, 2021).

La hipertrofia hepatocelular se refiere a un aumento del tamaño de los hepatocitos y se considera un rasgo de la inducción de enzimas adaptativas; por ello, su presencia es atribuida a varios factores, desde respuestas fisiológicas relacionadas con la regulación positiva de isoformas del CYP450, hasta efectos adversos relacionados con patologías que pueden ser toxicidad e incluso carcinogenicidad. Esta se observó exclusivamente en el grupo control de EN, por lo tanto, se atribuye a una respuesta fisiológica a la presencia de *Bacillus clausii*, ya que, en otros marcadores bioquímicos, moleculares, y en el tejido, no se observó la generación de algún daño a causa de la EN (Pischon *et al.*, 2021).

En general, los procesos de inflamación y fibrosis son procesos que se presentan en respuesta a la muerte celular; el tipo de muerte celular durante la EHmet y EHNA se ha relacionado con el tipo de inducción de daño, porque se considera que cada uno tiene diferente grado de inflamación, cambios de masa, y muerte celular. Particularmente, la necrosis se caracteriza por hinchazón celular y la ruptura de la membrana plasmática; esta puede ser inducida iniciada por toxinas o estrés oxidativo, por lo tanto, era esperado

encontrar focos de necrosis especialmente en grupos tratados con PE o PN debido a la presencia de etanol, aunque el contenido es bajo, sumado a la presencia del agente inductor de daño, pues no se observó en grupos sin inducción de daño (Shojaie *et al.*, 2020).

Otro tipo de daño celular observado en los grupos control de daño TC y TI 48 h y, particularmente, en los grupos tratados con PE + inducción de daño, es la cariocitomegalia. Esta se ha observado en modelos murinos con dieta semisintética, que muestra relación con la acumulación de lípidos, así como el metabolismo hepático de lípidos y ácidos biliares, también se ha reportado en modelos de fibrosis inducida por tioacetamida en rata; su presencia indica poliploidía y una mayor tasa de división celular misma que podría actuar como compensación a la necrosis, además de estar relacionada al grado de inflamación hepatocelular, y almacenamiento de glucógeno (Ronda *et al.*, 2020; Massoid *et al.*, 2022).

La hipertrofia de las células endoteliales, generalmente se acompaña de capilarización y se asocia con el desarrollo temprano de hipertensión portal en EHmet, esto se debe a la contracción sinusoidal del hígado por acumulación lipídica en los hepatocitos, lo que conlleva resistencia vascular intrahepática e implica el aumento de la presión portal, aun en ausencia de fibrosis; este daño en células endoteliales se observó particularmente en los grupos que fueron tratados con PE y PN con inducción de daño (en los tres modelos), por lo que se atribuye a un efecto sinérgico entre el etanol presente en las bebidas y los agentes tóxicos (TC o TI), por el estrés oxidativo que implican, ya que en los controles de PE y PN, donde no hay inducción de daño, no se observó esta condición (Nababan & Lesmana, 2022).

Finalmente, la presencia de hiperplasia de conductillos biliares, colangiofibrosis, y la hiperplasia de células ovals están estrechamente relacionadas con los procesos de muerte celular e inflamatorios característicos de la EHmet y la EHNA, su presencia se atribuye al desarrollo de fibrosis asociada a dichos padecimientos; se ha observado la presencia de colangiofibrosis incluso en ratas Zucker con obesidad y diabetes inducidas por dieta alta en grasas, por lo tanto, esto se debe probablemente a la acumulación de lípidos en los hepatocitos que deriva en la destrucción del tejido (Tacke & Weiskirchen, 2021; Maeda *et al.*, 2021; Saigo *et al.*, 2024).

Análisis molecular: Lipidómica

La lipidómica se refiere a la caracterización de las especies moleculares de lípidos dentro de una matriz, misma que puede ser células, tejidos, o fluidos biológicos (Hyötyläinen & Orešič, 2014). Este campo de investigación se considera relativamente reciente y es una categoría de la metabolómica que ofrece un enfoque particular y una descripción general del metabolismo lipídico en un sistema biológico o durante alguna patología específica. Para la separación y detección de lípidos, se utilizan principalmente técnicas como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), la cual se aplicó en este estudio (Han & Gross, 2003; Oresic *et al.*, 2008).

Debido al papel clave que juegan los lípidos en el curso de la EHmet, la lipidómica es una herramienta poderosa para entender los cambios que ocurren en el contenido y calidad de lípidos, tanto en el hígado como circulantes. En este sentido, se hizo el análisis en tejido hepático al usar animales de experimentación, sin embargo, cuando se trata de pacientes, resulta menos invasivo utilizar muestras de plasma, aunque se considera necesario profundizar en el análisis de ambos tipos de muestra, ya que algunos autores consideran los resultados inconsistentes; probablemente por este motivo los resultados obtenidos en este estudio, puntualmente los lípidos totales séricos, no son completamente consistentes con lo observado en el perfil lipidómico hepático (Alonso *et al.*, 2017; Kartsoli *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que el lipidoma hepático se altera durante la esteatosis y la esteatohepatitis y estas alteraciones tanto en cantidad como calidad de los lípidos están relacionadas con la progresión de la enfermedad; por ello, algunos autores han descrito cambios principalmente en la composición de ácidos grasos, glicerofosfolípidos, y esfingolípidos, lo que involucra procesos de estrés oxidativo, inflamación (citocinas proinflamatorias, activación de células HSC, y de Kupffer, así como lipotoxicidad) y muerte celular (Kartsoli *et al.*, 2020). Específicamente, se relaciona la EHmet con la acumulación de grasa en forma de triglicéridos (TG) en los hepatocitos y aunque está relacionada con diversos factores como, hábitos alimenticios acompañados de sedentarismo, factores genéticos, y ambientales en general, así como la alteración en la microbiota gastrointestinal, el principal factor de riesgo se considera la resistencia a la insulina (Manne *et al.*, 2018; Pouwels *et al.*, 2022).

Los resultados obtenidos en este análisis son consistentes con dichos reportes; se observó una separación clara entre grupos con tratamiento y el grupo sano en comparación con el control dañado, tanto en el modelo de EHNA como en los de dislipidemia; los principales grupos de lípidos de interés en el análisis multivariado son FA, SFA, MUFA, PUFA, COL, PE, PC y, GLP; estos se describen a continuación.

Los lípidos simples incluyen ácidos grasos libres y triglicéridos; los ácidos grasos se obtienen a partir de acetil-CoA y están compuestos por un ácido carboxílico con una cadena larga hidrofóbica que puede estar saturada o no. Los triglicéridos están compuestos por tres ácidos grasos esterificados con una molécula de glicerol; y, los lípidos complejos están compuestos por ácidos grasos esterificados con alcohol y agregados a otros grupos de moléculas (Béland-Bonenfant *et al.*, 2023).

En estudios de lipidómica realizados en biopsias de pacientes con EHmet, mostraron la disminución de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) de la serie n-3 y n-6; esto fue relacionado con estudios posteriores que demostraron la disminución de $\Delta 5$ -desaturasa. En general, reportes diversos afirman que en pacientes con EHmet presentan un incremento de ácidos grasos monoinsaturados, pero disminuyen los PUFA; esto sugiere el incremento de la lipogénesis *de novo*, que produce principalmente ácidos grasos saturados (Araya *et al.*, 2004; Allard *et al.*, 2008; Chiappini *et al.*, 2017; Jung & Choi, 2014).

Los glicerofosfolípidos (componentes principales de las membranas celulares), derivan del ácido fosfatídico unido a un alcohol como colina, etanolamina, serina, inositol, o glicerol. Dependiendo del alcohol, los glicerofosfolípidos se denominan fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o fosfatidilglicerol ((Li *et al.*, 2006; Béland-Bonenfant *et al.*, 2023); tienen actividad como moléculas de señalización y participan en el anclaje de las proteínas en las membranas; se ha observado en muestras de tejido que, principalmente la fosfatidilcolina disminuye durante la EHmet, contrario a lo observado en los niveles séricos (Ma *et al.*, 2016, Puri *et al.*, 2009; Tiwari-Heckler *et al.*, 2018; Kartsoli *et al.*, 2020). Otros autores reportan la disminución significativa de la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina en biopsias de pacientes con EHmet (Arendt *et al.*, 2013; Alonso *et al.*, 2017). Los niveles hepáticos bajos de fosfatidilcolina, reducen los niveles de lipoproteínas VLDL circulantes y, por lo tanto, conduce a la acumulación hepática de TG (Jacobs *et al.*, 2010). Además, se considera que la baja en la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina podría incrementar la permeabilidad de la membrana a las citocinas proinflamatorias, por un posible cambio en la organización de la

fosfatidiletanolamina en las membranas (Li *et al.*, 2006). La concentración de la lisofosfatidilocolina se observa disminuida en pacientes con EHmet; esta afecta el metabolismo hepático de lípidos, regulando a la baja los genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y al alza los genes relacionados con la síntesis de colesterol (Orešič *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016; Hollie *et al.*, 2014).

Los esfingolípidos son lípidos complejos en los que el glicerol es sustituido por una base de esfingosina como estructura principal; los ceramidas tienen como base esfingosina y se encuentra unida a un ácido graso y, las esfingomielinas tienen una base de esfingosina asociada a fosfocolina y un ácido graso (Béland-Bonenfant *et al.*, 2023). En personas con EHmet y EHNA, se han reportado cambios en los niveles de esfingomielina, ceramidas, y dihidroceramidas, tanto en plasma como en tejido; específicamente, en tejido hepático se ha observado la disminución de esfingomielina, mientras que hay reportes del incremento significativo de niveles séricos de esfingomielina en el grupo con EHmet y EHNA con relación al grupo sano (Chiappini *et al.*, 2017; Tiwari-Heckler *et al.*, 2018). Además, existen reportes referentes al incremento de los niveles de ceramida en el plasma y las biopsias de hígado de pacientes con EHGNA (Gorden *et al.*, 2015; Anjani *et al.*, 2015); incluso, se ha demostrado que la síntesis *de novo* de la ceramida se estimula como consecuencia de una dieta alta en grasas saturadas y del aumento de la afluencia de ácidos grasos libres hepáticos, la inflamación inducida por TNF α e IL-1 y el estrés oxidativo ya que pueden aumentar la actividad de serina palmitoil-CoA transferasa (Gault *et al.*, 2010; Frangioudakis *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 2007).

Lo anterior sugiere un impacto en el metabolismo lipídico por los resultados observados que se relaciona con factores diversos, entre ellos, la alteración de la microbiota gastrointestinal, que deriva en la regulación a la baja de diferentes vías relacionadas con la oxidación de lípidos y un incremento en las vías relacionadas con la lipogénesis y, como se mencionó anteriormente, la administración del pulque muestra una tendencia marcada protectora sobre los marcadores de daño plasmáticos e histológicos, atribuida a la regulación positiva de la microbiota gastrointestinal (Cusi, 2009; Kartsoli *et al.*, 2020; Pouwels *et al.*, 2022). Sin embargo, el efecto de los probables probióticos administrados sobre los lípidos plasmáticos fueron medidos y diversos; así entonces, el tratamiento con EN tuvo casi efecto nulo en TC y TI 24 h, mientras que sobre TI 48 h tuvo efectos opuestos como hipolipemiente e hiperlipemiente. El tratamiento con PE fue mayoritariamente beneficioso en los tres

modelos, a pesar del contenido de etanol ligero y alto en azúcar; asimismo, el PN administrado tuvo efectos protectores menos marcados o incrementó lípidos en plasma.

En general, es importante reiterar que en la alteración lipídica durante la EHNA y la dislipidemia se involucra la activación de receptores como el SREBP (regulador maestro de colesterogénesis y lipogénesis modulado por PUFAS), LXR (regulador maestro del metabolismo del colesterol modulado por derivados de oxicolesterol), y la disminución o incremento en la actividad de algunas rutas metabólicas como la β -oxidación y la lipogénesis, respectivamente; por ello, es indispensable la activación de receptores como FXR y TGR-5 que regulan positivamente el metabolismo lipídico, esta activación se lleva a cabo por ácidos biliares que son transformados por diferentes especies que pertenecen a la microbiota gastrointestinal que muy probablemente fue modificada por la administración de la EN, PE, y PN (Cusi, 2009; Kartsoli *et al.*, 2020; Rodríguez-Pastén *et al.*, 2023).

IX. CONCLUSIONES

La microbiota gastrointestinal tiene un papel clave en la regulación del metabolismo lipídico mediante diferentes mecanismos de acción y que la disbiosis está relacionada con trastornos metabólicos y gastrointestinales; pero, para observar una restauración efectiva de la microbiota gastrointestinal y un efecto máximo es importante que el consumo de probióticos, prebióticos, simbióticos o posbióticos se realice en dosis o concentraciones adecuadas, y preferentemente en conjunto, para así asegurar la colonización exitosa de estas especies.

El PN mostró un efecto anticolestático total, antinecrótico total, protector contra daño membranal parcial y antioxidante total. En el modelo de dislipidemia de 24 h, que es menos agresivo que el de 48 h, el PN mostró un efecto hipolipemiante total específicamente contra hipercolesterolemia, sin embargo, en el modelo de 48 h este efecto solo se observó de manera parcial. Este efecto se atribuye a la presencia de un consorcio microbiano muy variado y al potencial efecto probiótico de las especies que lo conforman, además, en la bebida puede contribuir la presencia de agavinas y otros FOS, a las que se les atribuye actividad prebiótica y posbióticos producidos por los microorganismos, y en conjunto proporcionar el efecto positivo a la salud.

La EN, administrada en dosis menores a la recomendada, no mostró un efecto protector total en los 3 modelos de daño, además, es importante tener presente que la EN contiene únicamente una especie y los mayores efectos mostrados por *Bacillus clausii*, se han observado en suplementos en mezcla con otras especies o como simbióticos; de manera similar se observaron efectos positivos con la administración del PE, a pesar de no haber microorganismos vivos y contener sacarosa añadida, se presume que la presencia probable de posbióticos le confiere efectos benéficos para la salud, ya que se sabe que algunos de estos compuestos contribuyen a la regulación del metabolismo lipídico.

Es importante continuar con investigaciones que permitan elucidar con mayor precisión las cepas específicas presentes en el pulque, además resultaría de gran utilidad realizar el perfil de compuestos con potencial prebiótico así como metabolitos clasificados como posbióticos, mediante técnicas como la RMN que resultó indispensable para conocer los grupos de lípidos alterados durante la EHNA y la dislipidemia en hígado, por ello, también sería importante realizar la detección de la expresión de los receptores asociados al mecanismo de acción mediante el cual la microbiota regula la homeostasis lipídica.

REFERENCIAS

- Abhari, K., Saadati, S., Yari, Z., Hosseini, H., Hedayati, M., Abhari, S., Alavian, S. M., & Hekmatdoost, A. (2020). The effects of *Bacillus coagulans* supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN*, 39, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2020.06.020>
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Allard, J. P., Aghdassi, E., Mohammed, S., Raman, M., Avand, G., Arendt, B. M., Jalali, P., Kandasamy, T., Prayitno, N., Sherman, M., Guindi, M., Ma, D. W., & Heathcote, J. E. (2008). Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *Journal of Hepatology*, 48(2), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.09.009>
- Alonso, C., Fernández-Ramos, D., Varela-Rey, M., Martínez-Arranz, I., Navasa, N., Van Liempd, S. M., Lavín Trueba, J. L., Mayo, R., Ilisso, C. P., de Juan, V. G., Iruarizaga-Lejarreta, M., delaCruz-Villar, L., Mincholé, I., Robinson, A., Crespo, J., Martín-Duce, A., Romero-Gómez, M., Sann, H., Platon, J., Van Eyk, J., ... Mato, J. M. (2017). Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 152(6), 1449–1461.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.015>
- Ampuero, J., Sánchez-Torrijos, Y., Aguilera, V., Bellido, F., & Romero-Gómez, M. (2018). New therapeutic perspectives in non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterología y Hepatología*, 41(2), 128-142. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2017.07.006>
- Anjani, K., Lhomme, M., Sokolovska, N., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Bouillot, J. L., Lesnik, P., Bedossa, P., Kontush, A., Clement, K., Dugail, I., & Tordjman, J. (2015). Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *Journal of Hepatology*, 62(4), 905–912. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.002>
- Ansarullah, A., Jadeja, R. N., Thounaojam, M. C., Patel, V., Devkar, R. V., & Ramachandran, A. V. (2009). Antihyperlipidemic potential of a polyherbal preparation on triton WR 1339 (Tyloxapol) induced hyperlipidemia: A comparison with lovastatin. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 3(2), 119-124. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.54900>

- Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L. A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., & Poniachik, J. (2004). Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 106(6), 635–643. <https://doi.org/10.1042/CS20030326>
- Arellano-García, L., Portillo, M. P., Martínez, J. A., & Milton-Laskibar, I. (2022). Usefulness of Probiotics in the Management of NAFLD: Evidence and involved mechanisms of action from preclinical and human models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3167. <https://doi.org/10.3390/ijms23063167>
- Astudillo-Melgar, F., Hernández-Chávez, G., Rodríguez-Alegría, M. E., Bolívar, F., & Escalante, A. (2023). Analysis of the microbial diversity and population dynamics during the pulque fermentation process. *Fermentation*, 9(4), 342. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040342>
- Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., Ferreira, B. M., Sant'Ana, A. S., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>
- Becerril-Flores, M. A. (2014). *Parasitología Médica* (pp. 363). McGraw Hill.
- Behrouz, V., Aryaeian, N., Zahedi, M. J., & Jazayeri, S. (2020). Effects of probiotic and prebiotic supplementation on metabolic parameters, liver aminotransferases, and systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. *Journal of Food Science*, 85(10), 3611–3617. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15367>
- Béland-Bonenfant, S., Rouland, A., Petit, J. M., & Vergès, B. (2023). Concise review of lipidomics in nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes & Metabolism*, 49(3), 101432. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2023.101432>
- Berger, L., & Rudolph, G. (1967). Alkaline phosphatase. *Standard Methods of Clinical Chemistry*, 5, 211-221.
- Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M. S., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, M. A., Bosques-Padilla, F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J. A., Cisneros-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., Higuera de la Tijera, M. F., Kershenobich-Stalnikowitz, D., ... Velarde- Ruíz Valazco, J. A. (2019). The Mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(1), 69–99. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.11.007>

- Bernal-Reyes, R., Icaza-Chávez, M. E., Chi-Cervera, L. A., Remes-Troche, J. M., Amieva-Balmori, M., Priego-Parra, B. A., ... & Triana-Romero, A. (2023). Prevalence and clinical-epidemiologic characteristics of a Mexican population with metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease: An open population study. *Revista de Gastroenterología de México*, 88(3), 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.rgmxen.2022.04.001>
- Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., & Walter, J. (2015). Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 12(5), 303–310. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>
- Boer, C. G., Radjabzadeh, D., Medina-Gomez, C., Garmaeva, S., Schiphof, D., Arp, P., Koet, T., Kurilshikov, A., Fu, J., Ikram, M. A., Bierma-Zeinstra, S., Uitterlinden, A. G., Kraaij, R., Zhernakova, A., & van Meurs, J. B. J. (2019). Intestinal microbiome composition and its relation to joint pain and inflammation. *Nature Communications*, 10(1), 4881. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12873-4>
- Boll, M., Weber, L. W., Becker, E., & Stampfl, A. (2001). Pathogenesis of carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury bioactivation of CCl₄ by cytochrome P450 and effects on lipid homeostasis. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 56(1-2), 111–121. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-1-218>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Burt, A. D., Lackner, C., & Tiniakos, D. G. (2015). Diagnosis and assessment of NAFLD: Definitions and histopathological classification. *Seminars in Liver Disease*, 35(3), 207–220. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562942>
- Cataldo, I., Sarcognato, S., Sacchi, D., Cacciatore, M., Baciocchi, F., Mangia, A., Cazzagon, N., & Guido, M. (2021). Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Pathologica*, 113(3), 194–202. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-242>
- Cha, J. Y., & Repa, J. J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 743–751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605023200>
- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 10(1), 15115. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>

- Chen, J., Wang, R., Li, X. F., & Wang, R. L. (2012). *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *The British Journal of Nutrition*, 107(10), 1429–1434. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004491>
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2020). Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 318(3), G554–G573. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00223.2019>
- Chiappini, F., Coilly, A., Kadar, H., Gual, P., Tran, A., Desterke, C., Samuel, D., Duclos-Vallée, J. C., Touboul, D., Bertrand-Michel, J., Brunelle, A., Guettier, C., & Le Naour, F. (2017). Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Scientific Reports*, 7, 46658. <https://doi.org/10.1038/srep46658>
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., & Wilfinger, W. (1997). DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques*, 22(3), 550–553. <https://doi.org/10.2144/97223pf01>
- Chung, H., Hong, D. P., Jung, J. Y., Kim, H. J., Jang, K. S., Sheen, Y. Y., Ahn, J. I., Lee, Y. S., & Kong, G. (2005). Comprehensive analysis of differential gene expression profiles on carbon tetrachloride-induced rat liver injury and regeneration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.004>
- Clavel, T., Desmarchelier, C., Haller, D., Gérard, P., Rohn, S., Lepage, P., & Daniel, H. (2014). Intestinal microbiota in metabolic diseases: from bacterial community structure and functions to species of pathophysiological relevance. *Gut Microbes*, 5(4), 544–551. <https://doi.org/10.4161/gmic.29331>
- Cohen, G., Dembiec, D., & Marcus, J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34, 30–38. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90083-7)
- Contreras-Zentella, M. L., Villalobos-García, D., & Hernández-Muñoz, R. (2022). Ethanol metabolism in the liver, the induction of oxidant stress, and the antioxidant defense system. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(7), 1258. <https://doi.org/10.3390/antiox11071258>
- Craven, L., Rahman, A., Nair Parvathy, S., Beaton, M., Silverman, J., Qumosani, K., Hramiak, I., Hegele, R., Joy, T., Meddings, J., Urquhart, B., Harvie, R., McKenzie, C., Summers, K., Reid, G., Burton, J. P., & Silverman, M. (2020). Allogenic fecal microbiota transplantation in patients with nonalcoholic fatty liver disease improves abnormal small intestinal permeability: a randomized control trial. *The American Journal of Gastroenterology*, 115(7), 1055–1065. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000661>
- Cusi, K. (2009). Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 13(4), 545–563. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.07.009>

Dávila-Ortiz, G., Nicolás-García, M., Osorio-Ruiz, A., Hernández-Fernández, M. Á., & Perea-Flores, M. D. J. (2022). Pulque: a traditional Mexican beverage with health benefits due to its nutritional composition. In *Hispanic Foods: Chemistry of Fermented Foods* (pp. 175-189). American Chemical Society.

de Oliveira, C. P. M. S., Cotrim, H. P., & Arrese, M. (2019). Factores de riesgo de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en poblaciones de Latinoamérica: situación actual y perspectivas. *Clinical Liver Disease*, 13(Suppl 1), S5–S8. <https://doi.org/10.1002/cld.837>

de Sousa, J. A., Pereira, P., Allgayer, M. D. C., Marroni, N. P., de Barros Falcão Ferraz, A., & Picada, J. N. (2017). Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.06.009>

Ducastel, S., Touche, V., Trabelsi, M. S., Boulinguez, A., Butruille, L., Nawrot, M., Peschard, S., Chávez-Talavera, O., Dorchies, E., Vallez, E., Annicotte, J. S., Lancel, S., Briand, O., Bantubungi, K., Caron, S., Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Tailleux, A., Staels, B., & Lestavel, S. (2020). The nuclear receptor FXR inhibits Glucagon-Like Peptide-1 secretion in response to microbiota-derived short-chain fatty acids. *Scientific Reports*, 10(1), 174. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56743-x>

Duysburgh, C., Verstrepen, L., Broeck, M. V. D., Righetto, Z., & Perez, M., 3rd. (2023). Investigation of Enterogermina's protective and restorative mechanisms on the gut microbiota with PPI, using SHIME technology. *Nutrients*, 15(3), 653. <https://doi.org/10.3390/nu15030653>

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>

Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>

Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>

Estrada-Godina, A. R., Cruz-Guerrero, A. E., Lappe, P., Ulloa, M., García-Garibay, M., & Gómez-Ruiz, L. (2001). Isolation and identification of killer yeasts from *Agave* sap (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 557-560. <https://doi.org/10.1023/A:1012210106203>

Fernández-Martínez, E. (2017). Cholestasis, contraceptives, and free radicals. In *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants* (pp. 239-258). Academic Press.

Fernández-Martínez, E., Lira-Islas, I. G., Cariño-Cortés, R., Soria-Jasso, L. E., Pérez-Hernández, E., & Pérez-Hernández, N. (2019). Dietary chia seeds (*Salvia hispanica*) improve acute dyslipidemia and steatohepatitis in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 43(9), e12986. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12986>

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.

Fontana, L., Plaza-Díaz, J., Robles-Bolívar, P., Valente-Godínez, H., Sáez-Lara, M. J., Abadía-Molina, F., Gómez-Llorented, C., Gil, Á., & Álvarez-Mercado, A. I. (2021). *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 modulate macrophage gene expression and ameliorate damage markers in the liver of Zucker-Leprfa/fa rats. *Nutrients*, 13(1), 202. <https://doi.org/10.3390/nu13010202>

Fraille, J. M., Palliyil, S., Barelle, C., Porter, A. J., & Kovaleva, M. (2021). Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) - A review of a crowded clinical landscape, driven by a complex disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 3997–4009. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S315724>

Frangioudakis, G., Garrard, J., Raddatz, K., Nadler, J. L., Mitchell, T. W., & Schmitz-Peiffer, C. (2010). Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors. *Endocrinology*, 151(9), 4187–4196. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0250>

Galicia-Moreno, M., Favari, L., & Muriel, P. (2013). Trolox mitigates fibrosis in a bile duct ligation model. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 27(3), 308–318. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.01020.x>

García-Arce, Z. P., & Castro-Muñoz, R. (2021). Exploring the potentialities of the Mexican fermented beverage: Pulque. *Journal of Ethnic Foods*, 8, 35. <https://doi.org/10.1186/s42779-021-00111-6>

Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 688, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

- Glossmann, H., & Neville, D. M. (1972). gamma-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters*, 19(4), 340–344. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(72\)80075-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(72)80075-9)
- González-Mesillas, F., Vázquez-Castro, P., Jaimez-Ordaz, J., & Zúñiga-Juárez, M. A. (2016). Potencial probiótico de bacterias aisladas del pulque: Una revisión. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 924-930.
- Gorden, D. L., Myers, D. S., Ivanova, P. T., Fahy, E., Maurya, M. R., Gupta, S., Min, J., Spann, N. J., McDonald, J. G., Kelly, S. L., Duan, J., Sullards, M. C., Leiker, T. J., Barkley, R. M., Quehenberger, O., Armando, A. M., Milne, S. B., Mathews, T. P., Armstrong, M. D., Li, C., ... Brown, H. A. (2015). Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *Journal of Lipid Research*, 56(3), 722–736. <https://doi.org/10.1194/jlr.P056002>
- Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V., Math, A. A., Vernekar, S. N., & Kulkarni, S. S. (2009). A review on laboratory liver function tests. *The Pan African Medical Journal*, 3, 17.
- Han, X., & Gross, R. W. (2003). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 44(6), 1071–1079. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>
- He, Y. J., & You, C. G. (2020). The potential role of gut microbiota in the prevention and treatment of lipid metabolism disorders. *International Journal of Endocrinology*, 2020, 8601796. <https://doi.org/10.1155/2020/8601796>
- Hernández-Conde, M., & Calleja, J. L. (2023). La enfermedad hepática metabólica: una nueva pandemia prevenible. *Revista de Gastroenterología de México*, 88(3), 197-198. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2022.04.002>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Holland, W. L., Brozinick, J. T., Wang, L. P., Hawkins, E. D., Sargent, K. M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K. L., Knotts, T. A., Siesky, A., Nelson, D. H., Karathanasis, S. K., Fontenot, G. K., Birnbaum, M. J., & Summers, S. A. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metabolism*, 5(3), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.002>

- Hollie, N. I., Cash, J. G., Matlib, M. A., Wortman, M., Basford, J. E., Abplanalp, W., & Hui, D. Y. (2014). Micromolar changes in lysophosphatidylcholine concentration cause minor effects on mitochondrial permeability but major alterations in function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(6), 888–895. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.11.013>
- Huezo-Sánchez, A. R., Ortega-Rodríguez, E. M., Pérez-Armendáriz, B., & El-Kassis, E. G. (2023). Characterization of bacterial diversity in aguamiel and two types of pulque from the Zacatlán region, México. *Fermentation*, 9(6), 564. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060564>
- Husain, M. J., Spencer, G., Nugent, R., Kostova, D., & Richter, P. (2022). The cost-effectiveness of hyperlipidemia medication in low- and middle-income countries: A review. *Global Heart*, 17(1), 18. <https://doi.org/10.5334/gh.1097>
- Hyötyläinen, T., & Orešič, M. (2014). Systems biology strategies to study lipidomes in health and disease. *Progress in Lipid Research*, 55, 43–60. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.06.001>
- Ingawale, D. K., Mandlik, S. K., & Naik, S. R. (2014). Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 118–133. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.08.015>
- Jacobs, R. L., Zhao, Y., Koonen, D. P., Sletten, T., Su, B., Lingrell, S., Cao, G., Peake, D. A., Kuo, M. S., Proctor, S. D., Kennedy, B. P., Dyck, J. R., & Vance, D. E. (2010). Impaired de novo choline synthesis explains why phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-deficient mice are protected from diet-induced obesity. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22403–22413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108514>
- Jantararussamee, C., Rodniem, S., Taweechoitipatr, M., Showpittapornchai, U., & Pradidarcheep, W. (2021). Hepatoprotective effect of probiotic lactic acid bacteria on thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(1), 40–50. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09663-6>
- Johnson, K. V. (2020). Gut microbiome composition and diversity are related to human personality traits. *Human Microbiome Journal*, 15, None. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2019.100069>
- Jung, U. J., & Choi, M. S. (2014). Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 6184–6223. <https://doi.org/10.3390/ijms15046184>
- Kartsoli, S., Kostara, C. E., Tsimihodimos, V., Bairaktari, E. T., & Christodoulou, D. K. (2020). Lipidomics in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 12(8), 436–450. <https://doi.org/10.4254/wjh.v12.i8.436>

- Kisseleva, T., & Brenner, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 151-166. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- Kumar, N. A., & Anamika, S. (2023). Significance of hepatic enzymes: a review. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 7, 95-100. <https://doi.org/10.33545/26174693.2023.v7.i1b.170>
- Kuntz, E., & Kuntz, H. D. (2006). *Hepatology: Principles and Practice; History, Morphology, Biochemistry, Diagnostics, Clinic, Therapy* (pp. 906). Springer.
- Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K., & Yokota, A. (2006). Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 188(5), 1979–1986. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1979-1986.2006>
- Kwak, M. S., & Kim, D. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 33(1), 64–74. <https://doi.org/10.3904/kjim.2017.343>
- Lappe-Oliveras, P., Avitia, M., Sánchez-Robledo, S. D., Castillo-Plata, A. K., Pedraza, L., Baquerizo, G., & Le Borgne, S. (2023). Genotypic and phenotypic diversity of *Kluyveromyces marxianus* isolates obtained from the elaboration process of two traditional Mexican alcoholic beverages derived from *Agave*: Pulque and henequen (*Agave fourcroydes*) mezcal. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 9(8), 795. <https://doi.org/10.3390/jof9080795>
- Leal-Díaz, A. M., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., López-Romero, P., Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Furuzawa-Carballeda, J., Velázquez-Villegas, L. A., Avila-Nava, A., Ordáz, G., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., & Tovar, A. R. (2016). Aguamiel concentrate from *Agave salmiana* and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased *Akkermansia muciniphila* in C57BL6 mice. *Scientific Reports*, 6, 34242. <https://doi.org/10.1038/srep34242>
- León-de la O, D. I., Méndez-Colín, D. S., Rodríguez-Padilla, D. P., Puente-Hurle, L., García-Sorrondegui, F. I., & Salgado-Brito, R. (2012). Bromatological analysis and isolation of microorganisms with probiotic potential from pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 11, 115-122.
- Levine, S., & Saltzman, A. (2007). A procedure for inducing sustained hyperlipemia in rats by administration of a surfactant. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55(2), 224–226. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.009>

- Li, B., Zhang, C., & Zhan, Y. T. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease cirrhosis: A review of its epidemiology, risk factors, clinical presentation, diagnosis, management, and prognosis. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2784537. <https://doi.org/10.1155/2018/2784537>
- Li, J., Vosegaard, T., & Guo, Z. (2017). Applications of nuclear magnetic resonance in lipid analyses: An emerging powerful tool for lipidomics studies. *Progress in Lipid Research*, 68, 37–56. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.09.003>
- Li, M. M., Zhou, Y., Zuo, L., Nie, D., & Li, X. A. (2021). Dietary fiber regulates intestinal flora and suppresses liver and systemic inflammation to alleviate liver fibrosis in mice. *Nutrition*, 81, 110959. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110959>
- Li, N., Li, X., Ding, Y., Liu, X., Diggle, K., Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2023). SREBP regulation of lipid metabolism in liver disease, and therapeutic strategies. *Biomedicines*, 11(12), 3280. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123280>
- Li, Z., Agellon, L. B., Allen, T. M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., & Vance, D. E. (2006). The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 3(5), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.007>
- Lim, G. B. (2023). Limited benefit of triglyceride lowering with fibrates in statin-treated patients. *Nature Reviews. Cardiology*, 20(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00814-6>
- Lim, P. S., Loke, C. F., Ho, Y. W., & Tan, H. Y. (2020). Cholesterol homeostasis associated with probiotic supplementation *in vivo*. *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1374–1388. <https://doi.org/10.1111/jam.14678>
- Lozano, J. A. (2005). Dislipidemias Pautas para su abordaje terapéutico. *Farmacoterapia*, 24(9), 100–108.
- Ma, D. W., Arendt, B. M., Hillyer, L. M., Fung, S. K., McGilvray, I., Guindi, M., & Allard, J. P. (2016). Plasma phospholipids and fatty acid composition differ between liver biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease and healthy subjects. *Nutrition & Diabetes*, 6(7), e220. <https://doi.org/10.1038/nutd.2016.27>
- Maeda, S., Hikiba, Y., Fujiwara, H., Ikenoue, T., Sue, S., Sugimori, M., Matsubayashi, M., Kaneko, H., Irie, K., Sasaki, T., & Chuma, M. (2021). NAFLD exacerbates cholangitis and promotes cholangiocellular carcinoma in mice. *Cancer Science*, 112(4), 1471–1480. <https://doi.org/10.1111/cas.14828>
- Malaguarnera, M., Vacante, M., Antic, T., Giordano, M., Chisari, G., Acquaviva, R., Mastrojeni, S., Malaguarnera, G., Mistretta, A., Li Volti, G., & Galvano, F. (2012). *Bifidobacterium longum* with fructo-oligosaccharides in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(2), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1887-4>

- Manne, V., Handa, P., & Kowdley, K. V. (2018). Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 22(1), 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.08.007>
- Mantovani, A., Scorletti, E., Mosca, A., Alisi, A., Byrne, C. D., & Targher, G. (2020). Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 111S, 154170. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154170>
- Marco, M. L., Hill, C., Hutkins, R., Slavin, J., Tancredi, D. J., Merenstein, D., & Sanders, M. E. (2020). Should There Be a Recommended Daily Intake of Microbes?. *The Journal of Nutrition*, 150(12), 3061-3067. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa323>
- Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C., & Viña, J. (2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 709, 108941. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>
- Massoid, M. N., Mohamed, S. H., Abd El Dayem, S., El-Motelp, A., Azmy, B., Eskander, E. F., & Ahmed, H. H. (2022). Mechanisms of the anti-fibrotic impact of natural nutraceuticals in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in obese rats. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(132), 1567-1588. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.135256.5952>
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género *Agave*. *Agrociencia*, 45(4), 465-477.
- Muriel P. (1998). Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*, 56(6), 773–779. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00220-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00220-2)
- Muriel, P. (2017). *Liver pathophysiology: Therapies and antioxidants* (pp. 914). Academic Press.
- Nababan, S. H. H., & Lesmana, C. R. A. (2022). Portal hypertension in nonalcoholic fatty liver disease: From pathogenesis to clinical practice. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 10(5), 979–985. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00593>
- Navarrete-Torres, M. C., & García Muñoz-Aparicio, C. (2021). El pulque la bebida de los dioses con valor y tradición milenaria. *Journal of Tourism and Heritage Research*, 4(1), 19-36.
- Neag, M. A., Catinean, A., Muntean, D. M., Pop, M. R., Bocsan, C. I., Botan, E. C., & Buzoianu, A. D. (2020). Probiotic *Bacillus* spores protect against acetaminophen induced acute liver injury in rats. *Nutrients*, 12(3), 632. <https://doi.org/10.3390/nu12030632>

- Oresic, M., Hänninen, V. A., & Vidal-Puig, A. (2008). Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends in Biotechnology*, 26(12), 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.09.001>
- Orešič, M., Hyötyläinen, T., Kotronen, A., Gopalacharyulu, P., Nygren, H., Arola, J., Castillo, S., Mattila, I., Hakkarainen, A., Borra, R. J., Honka, M. J., Verrijken, A., Francque, S., Iozzo, P., Leivonen, M., Jaser, N., Juuti, A., Sørensen, T. I., Nuutila, P., Van Gaal, L., ... Yki-Järvinen, H. (2013). Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia*, 56(10), 2266–2274. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2981-2>
- Osman, A., El-Gazzar, N., Almanaa, T. N., El-Hadary, A., & Sitohy, M. (2021). Lipolytic postbiotic from *Lactobacillus paracasei* manages metabolic syndrome in albino Wistar rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 472. <https://doi.org/10.3390/molecules26020472>
- Pais, P., Oliveira, J., Almeida, V., Yilmaz, M., Monteiro, P. T., & Teixeira, M. C. (2021). Transcriptome-wide differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: Clues on host survival and probiotic activity based on promoter sequence variability. *Genomics*, 113(2), 530-539. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.11.034>
- Pappan, N., Awosika, A. O., & Rehman, A. (2024). Dyslipidemia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Pathak, P., & Chiang, J. Y. L. (2019). Sterol 12 α -hydroxylase aggravates dyslipidemia by activating the ceramide/mTORC1/SREBP-1C pathway via FGF21 and FGF15. *Gene Expression*, 19(3), 161–173. <https://doi.org/10.3727/105221619X15529371970455>
- Pelton R. (2020). Postbiotic metabolites: How probiotics regulate health. *Integrative Medicine (Encinitas, Calif.)*, 19(1), 25–30.
- Peralta-García, I., González-Muñoz, F., Elena, R. M., Sánchez-Flores, A., & López Munguía, A. (2020). Evolution of fructans in aguamiel (*Agave sap*) during the plant production lifetime. *Frontiers in Nutrition*, 7, 566950. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.566950>
- Pérez-Armendáriz, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Research International*, 136, 109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>
- Pischon, H., Mason, D., Lawrenz, B., Blanck, O., Frisk, A. L., Schorsch, F., & Bertani, V. (2021). Artificial intelligence in toxicologic pathology: Quantitative evaluation of compound-induced hepatocellular hypertrophy in rats. *Toxicologic Pathology*, 49(4), 928–937. <https://doi.org/10.1177/0192623320983244>
- Pouwels, S., Sakran, N., Graham, Y., Leal, A., Pintar, T., Yang, W., Kassir, R., Singhal, R., Mahawar, K., & Ramnarain, D. (2022). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocrine Disorders*, 22(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-00980-1>

- Puente-Garza, C. A., Espinosa-Leal, C. A., & García-Lara, S. (2018). Steroidal saponin and flavonol content and antioxidant activity during sporophyte development of maguey (*Agave salmiana*). *Plant Foods for Human Nutrition* (Dordrecht, Netherlands), 73(4), 287–294. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0684-z>
- Puri, P., Wiest, M. M., Cheung, O., Mirshahi, F., Sargeant, C., Min, H. K., Contos, M. J., Sterling, R. K., Fuchs, M., Zhou, H., Watkins, S. M., & Sanyal, A. J. (2009). The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 50(6), 1827–1838. <https://doi.org/10.1002/hep.23229>
- Quigley, E. M. M. (2019). Prebiotics and probiotics in digestive health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 17(2), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028>
- Ramirez-Olea, H., Herrera-Cruz, S., & Chavez-Santoscoy, R. A. (2024). Microencapsulation and controlled release of *Bacillus clausii* through a novel non-digestible carbohydrate formulation as revolutionizing probiotic delivery. *Heliyon*, 10(2), e24923. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24923>
- Rasouli, M., Tahmouri, H., & Mosavi-Mehr, M. (2016). The long term kinetic of plasma lipids and lipoproteins in tyloxapol injected rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 10(6), BF01–BF5. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18890.7993>
- Reitman, S., & Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28(1), 56–63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(3), 332–338. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000057>
- Rigano, D., Sirignano, C., & Taglialatela-Scafati, O. (2017). The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharmaceutica Sinica*, B, 7(4), 427–438. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.005>
- Robledo-Márquez, K., Ramírez, V., González-Córdova, A. F., Ramírez-Rodríguez, Y., García-Ortega, L., & Trujillo, J. (2021). Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico. Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food Research International*, 147, 110482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110482>

- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D., & Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, 241, 126593. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126593>
- Rodríguez-Pastén, A., Fernández-Martínez, E., Pérez-Hernández, N., Soria-Jasso, L. E., & Cariño-Cortés, R. (2023). Prebiotics and probiotics: Effects on dyslipidemia and NAFLD/NASH and the associated mechanisms of action. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 24(5), 633–646. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220818145350>
- Ronda, O. A. H. O., van de Heijning, B. J. M., de Bruin, A., Thomas, R. E., Martini, I., Koehorst, M., Gerding, A., Koster, M. H., Bloks, V. W., Jurdzinski, A., Mulder, N. L., Havinga, R., van der Beek, E. M., Reijngoud, D. J., Kuipers, F., & Verkade, H. J. (2020). Spontaneous liver disease in wild-type C57BL/6JOLA^{Hsd} mice fed semisynthetic diet. *PLoS One*, 15(9), e0232069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232069>
- Ruan, W., Engevik, M. A., Spinler, J. K., & Versalovic, J. (2020). Healthy human gastrointestinal microbiome: Composition and function after a decade of exploration. *Digestive Diseases and Sciences*, 65(3), 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4>
- Saigo, Y., Uno, K., Ishigure, T., Odake, T., & Ohta, T. (2024). Pathophysiological features of rat models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *In vivo (Athens, Greece)*, 38(3), 990–999. <https://doi.org/10.21873/invivo.13532>
- Sánchez-Crisóstomo, I., Fernández-Martínez, E., Cariño-Cortés, R., Betanzos-Cabrera, G., & Bobadilla-Lugo, R. A. (2019). Phytosterols and triterpenoids for prevention and treatment of metabolic-related liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20(3), 197–214. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190219122357>
- Santiago-García, P. A., Mellado-Mojica, E., León-Martínez, F. M., Dzul-Cauich, J. G., López, M. G., & García-Vieyra, M. I. (2021). Fructans (agavins) from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* as fat replacement in yogurt: Effects on physicochemical, rheological, and sensory properties. *LWT*, 140, 110846. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110846>
- Schwabe, R. F., Tabas, I., & Pajvani, U. B. (2020). Mechanisms of fibrosis development in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 158(7), 1913–1928. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.311>
- Seifter, S., & Dayton, S. (1950). The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives of Biochemistry*, 25(1), 191–200.

- Shanahan, F., Ghosh, T. S., & O'Toole, P. W. (2021). The healthy microbiome-what is the definition of a healthy gut microbiome?. *Gastroenterology*, 160(2), 483–494. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.057>
- Sheka, A. C., Adeyi, O., Thompson, J., Hameed, B., Crawford, P. A., & Ikramuddin, S. (2020). Nonalcoholic steatohepatitis: A review. *JAMA*, 323(12), 1175–1183. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2298>
- Shen, Y., Su, Y., Silva, F. J., Weller, A. H., Sostre-Colón, J., Titchenell, P. M., Steger, D. J., Seale, P., & Soccio, R. E. (2020). Shared PPAR α/γ target genes regulate brown adipocyte thermogenic function. *Cell Reports*, 30(9), 3079–3091. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.032>
- Shojaie, L., Iorga, A., & Dara, L. (2020). Cell death in liver diseases: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9682. <https://doi.org/10.3390/ijms21249682>
- Soon, G. S. T., & Torbenson, M. (2023). The liver and glycogen: In sickness and in health. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6133. <https://doi.org/10.3390/ijms24076133>
- Soriano, G., Sánchez, E., & Guarner, C. (2013). Probióticos en las enfermedades hepáticas. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 558-563.
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts-characteristics and food application. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>
- Stewart, J., McCallin, T., Martinez, J., Chacko, S., & Yusuf, S. (2020). Hyperlipidemia. *Pediatrics in Review*, 41(8), 393–402. <https://doi.org/10.1542/pir.2019-0053>
- Tacke, F., & Weiskirchen, R. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH)-related liver fibrosis: mechanisms, treatment and prevention. *Annals of Translational Medicine*, 9(8), 729. <https://doi.org/10.21037/atm-20-4354>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tiwari-Heckler, S., Gan-Schreier, H., Stremmel, W., Chamulitrat, W., & Pathil, A. (2018). Circulating phospholipid patterns in NAFLD patients associated with a combination of metabolic risk factors. *Nutrients*, 10(5), 649. <https://doi.org/10.3390/nu10050649>
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. E., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>

Tsilingiri, K., & Rescigno, M. (2013). Postbiotics: What else?. *Beneficial Microbes*, 4(1), 101–107. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0046>

Üçok, G., & Sert, D. (2020). Growth kinetics and biomass characteristics of *Lactobacillus plantarum* L14 isolated from sourdough: Effect of fermentation time on dough machinability. *LWT*, 129, 109516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109516>

Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I., & Montville, T. J. (2012). The artisanal production of pulque, a traditional beverage of the Mexican highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>

Vega-Badillo, J. (2017). Alteraciones en la homeostasis del colesterol hepático y sus implicaciones en la esteatohepatitis no alcohólica. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(1), 50-65. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.11.005>

Wa, Y., Yin, B., He, Y., Xi, W., Huang, Y., Wang, C., Guo, F., & Gu, R. (2019). Effects of single probiotic and combined probiotic-fermented milk on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1312. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01312>

Weber, L. W., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), 105–136. <https://doi.org/10.1080/713611034>

Winston, J. A., & Theriot, C. M. (2020). Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. *Gut Microbes*, 11(2), 158–171. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1674124>

Assessment of hepatic function and damage in animal species. *Animal Clinical Chemistry Association*. (1988). *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 8(4), 249–254. <https://doi.org/10.1002/jat.2550080405>

Yan, R., Wang, K., Wang, Q., Jiang, H., Lu, Y., Chen, X., Zhang, H., Su, X., Du, Y., Chen, L., Li, L., & Lv, L. (2022). Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota prevents acute liver injury by reshaping the gut microbiota to alleviate excessive inflammation and metabolic disorders. *Microbial Biotechnology*, 15(1), 247–261. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13750>

Yan, Y., Liu, C., Zhao, S., Wang, X., Wang, J., Zhang, H., Wang, Y., & Zhao, G. (2020). Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 attenuates hepatic steatosis and inflammation in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *AMB Express*, 10(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01038-y>

Ye, J., Lv, L., Wu, W., Li, Y., Shi, D., Fang, D., Guo, F., Jiang, H., Yan, R., Ye, W., & Li, L. (2018). Butyrate protects mice against methionine-choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by improving gut barrier function, attenuating inflammation and reducing endotoxin levels. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1967. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01967>

- Yoo, S. R., Kim, Y. J., Park, D. Y., Jung, U. J., Jeon, S. M., Ahn, Y. T., Huh, C. S., McGregor, R., & Choi, M. S. (2013). Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 21(12), 2571–2578. <https://doi.org/10.1002/oby.20428>
- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Ong, J., Trimble, G., AlQahtani, S., Younossi, I., Ahmed, A., Racila, A., & Henry, L. (2021). Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly increasing indication for liver transplantation in the united states. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 19(3), 580–589.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.05.064>
- Yu, C., Wang, F., Jin, C., Wu, X., Chan, W. K., & McKeehan, W. L. (2002). Increased carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in FGFR4-deficient mice. *The American Journal of Pathology*, 161(6), 2003–2010. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64478-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64478-1)
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>
- Zhang, C., & Yang, M. (2021). Current options and future directions for NAFLD and NASH treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7571. <https://doi.org/10.3390/ijms22147571>
- Zhang, C., Yang, M., & Ericsson, A. C. (2020). The potential gut microbiota-mediated treatment options for liver cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 524205. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.524205>
- Zhang, J., Wang, S., Zeng, Z., Qin, Y., Shen, Q., & Li, P. (2020). Anti-diabetic effects of *Bifidobacterium animalis* 01 through improving hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic rat model. *Journal of Functional Foods*, 67, 103843. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103843>
- Zhang, L. X., Lv, Y., Xu, A. M., & Wang, H. Z. (2019). The prognostic significance of serum gamma-glutamyltransferase levels and AST/ALT in primary hepatic carcinoma. *BMC Cancer*, 19(1), 841. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6011-8>
- Zhou, D., Pan, Q., Xin, F. Z., Zhang, R. N., He, C. X., Chen, G. Y., Liu, C., Chen, Y. W., & Fan, J. G. (2017). Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World Journal of Gastroenterology*, 23(1), 60–75. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i1.60>
- Zhou, Y., Orešič, M., Leivonen, M., Gopalacharyulu, P., Hyysalo, J., Arola, J., Verrijken, A., Francque, S., Van Gaal, L., Hyötyläinen, T., & Yki-Järvinen, H. (2016). Noninvasive detection of nonalcoholic steatohepatitis using clinical markers and circulating levels of lipids and metabolites. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 14(10), 1463–1472.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.046>