



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA



MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

T E S I S

**“ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A LA BIOSÍNTESIS DE
LA PIRROLOQUINOLINA QUINONA (PQQ) EN BACTERIAS PRESUNTAMENTE
VINCULADAS A LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

PRESENTA:

LIC. EN BIOMEDICINA GILBERTO JUÁREZ MUNGUÍA

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. RICARDO CARREÑO LOPEZ

CODIRECTORA DE TESIS:

D.C. JULIA MARÍA ALATORRE CRUZ

ENERO 2026



BUAP

Puebla, Pue. a 20 de enero 2026.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

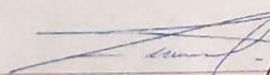
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría del alumno **Gilberto Juárez Munguía**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis de la presencia de genes asociados a la biosíntesis de la Pirroloquinolina quinona (PQQ) en bacterias presuntamente vinculadas a la microbiota intestinal humana”

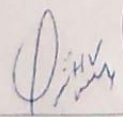
A nuestro juicio, el alumno **Gilberto Juárez Munguía** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Vianey Marín Cevada


D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez


D.C. Verónica Quintero Hernández


D.C. Rebeca Débora Martínez Contreras

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
Microbiota humana	11
Bacillota	11
Bacteroidota	12
Pseudomonadota	12
Actinomycetota	12
Verrucomicrobiota	12
Fusobacteriota	13
Pirroloquinolina quinona (PQQ)	13
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
METODOLOGIA	18
Metodología bioinformática	18
Búsqueda y selección de secuencias con genes <i>pqq</i>	18
Diseño de oligonucleótidos	18
Construcción de árboles filogenéticos	19
Metodología experimental exploratoria	19
Obtención de muestras fecales	19
Purificación de ADN de muestras fecales	20
Amplificación por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
Electroforesis	23
RESULTADOS	24
Bacterias presuntamente asociadas a la microbiota intestinal con genes para la síntesis de PQQ	24
Diseño de oligonucleótidos	27
Análisis filogenético de genes <i>pqq</i>	30

Análisis filogenético en Bacillota y Verrucomicrobiota	30
Análisis filogenético en Pseudomonadota	31
Árboles filogenéticos de referencia basados en ARNr 16	33
Evaluación experimental exploratoria	36
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43
ANEXOS	44
Consentimiento informado	44
α-proteobacteria	45
Tabla suplementaria 1.	45
Figura suplementaria 1.	46
Figura suplementaria 2.	47
Figura suplementaria 3.	48
Figura suplementaria 4.	49
Figura suplementaria 5.	50
β-proteobacteria	51
Tabla suplementaria 2.	51
Figura suplementaria 6.	53
Figura suplementaria 7	54
Figura suplementaria 8.	55
Figura suplementaria 9.	56
Figura suplementaria 10.	57
δ-proteobacteria	58
Tabla suplementaria 3.	58
ϵ-proteobacteria	59
Tabla suplementaria 4	59
Figura suplementaria 11.	60
Figura suplementaria 12.	61
Figura suplementaria 13.	62
Figura suplementaria 14.	63
Figura suplementaria 15.	64
Bacillota	65

Tabla suplementaria 5.	65
Figura suplementaria 16.	66
Figura suplementaria 17.	67
Figura suplementaria 18.	68
Figura suplementaria 19.	69
Figura suplementaria 20.	70
Figura suplementaria 21.	71
Figura suplementaria 22.	72
Figura suplementaria 23.	73
Figura suplementaria 24.	74
Figura suplementaria 25.	75
Figura suplementaria 26.	76
Verrucomicrobiota	77
Tabla suplementaria 6.	77
Figura suplementaria 27.	78
Figura suplementaria 28.	79
Figura suplementaria 29.	80
Figura suplementaria 30.	81
Figura suplementaria 31.	82
Figura suplementaria 32.	83
Figura suplementaria 33.	84
Preparación de soluciones	85
BIBLIOGRAFÍA	88

ABREVIATURAS

μl: microlitro

ADN/DNA: ácido desoxirribonucleico

ARN/RNA: ácido ribonucleico

mg: miligramo

ml: mililitro

NCBI: National Center of Biotechnology

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PQQ: pirroloquinolina quinona

SDS: dodecil sulfato de sodio

RESUMEN

La microbiota intestinal humana constituye un ecosistema complejo cuya diversidad taxonómica y funcional desempeña un papel fundamental en la fisiología del hospedero. Dentro de este contexto, la pirroloquinolina quinona (PQQ) es un cofactor redox producido exclusivamente por bacterias, involucrado en procesos metabólicos clave y asociado a efectos antioxidantes y metabólicos en organismos eucariotas. No obstante, la caracterización del potencial biosintético de PQQ en bacterias presuntamente asociadas a la microbiota intestinal humana permanece limitada.

En el presente estudio se exploró, mediante un enfoque bioinformático complementado con una aproximación experimental de carácter exploratorio, la presencia y diversidad de genes implicados en la biosíntesis de PQQ en bacterias presuntamente asociadas a la microbiota intestinal humana. Para ello, se identificaron organismos con reportes de genes *pqq* a partir de bases de datos especializadas, seleccionándose secuencias correspondientes a los genes *pqqC*, *pqqCD*, *pqqCDE* y *pqqBCDE*. Estas secuencias fueron analizadas filogenéticamente y empleadas en el diseño de oligonucleótidos dirigidos a regiones conservadas, con el objetivo de identificar experimentalmente la presencia de genes *pqq* en la microbiota intestinal humana.

Se identificaron 49 géneros bacterianos, presuntamente asociados con la microbiota intestinal y con genes para la síntesis de PQQ, pertenecientes a los filos Bacillota, Verrucomicrobiota y Pseudomonadota. El análisis filogenético de las secuencias mostró una congruencia parcial entre los árboles basados en regiones conservadas de los genes *pqq* y los contruidos a partir del gen ARNr 16S, particularmente en Bacillota y Verrucomicrobiota, lo que respalda el uso de regiones de estos genes como marcadores de potencial metabólico. Asimismo, se diseñaron 15 juegos de oligonucleótidos para amplificar las regiones conservadas de los genes *pqqC* y *pqqCDE*.

De forma preliminar, se implementó y evaluó una metodología original de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras fecales humanas y amplificación por PCR del gen ARNr 16S y de regiones asociadas a genes *pqq*, lo que confirmó la viabilidad experimental de las metodologías empleadas. En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la utilidad de

los genes *pqq* como marcadores funcionales complementarios a los marcadores taxonómicos tradicionales y establecen una base metodológica para futuros estudios orientados a la caracterización funcional del microbioma intestinal humano.

INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal humana constituye un ecosistema microbiano complejo que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del hospedero. A través de una amplia diversidad de funciones metabólicas, los microorganismos intestinales contribuyen a procesos esenciales como la digestión de compuestos no absorbibles, la producción de metabolitos, la modulación del sistema inmune y la regulación del metabolismo energético.

Este papel crucial ha impulsado el interés por caracterizar metabolitos de origen microbiano con potencial impacto en la salud del hospedero ha ido en aumento. Entre estos metabolitos se encuentra la pirroloquinolina quinona (PQQ), un cofactor redox sintetizado exclusivamente por bacterias y asociado a diversas enzimas deshidrogenasas. Diversos estudios han documentado efectos antioxidantes, metabólicos y neuroprotectores de la PQQ en modelos animales y en humanos; sin embargo, el origen microbiano de la PQQ detectada en organismos eucariotas, así como la identidad de las bacterias intestinales potencialmente productoras de este cofactor, permanecen poco explorados.

La identificación de bacterias con capacidad de biosintetizar PQQ representa un reto metodológico. Los enfoques taxonómicos tradicionales, basados principalmente en marcadores conservados como el gen del ARNr 16S, permiten describir la composición microbiana, pero resultan limitados para inferir funciones metabólicas específicas. Por ello, el análisis de genes funcionales asociados a rutas metabólicas concretas emerge como una estrategia complementaria para explorar el potencial metabólico de la microbiota.

Los genes implicados en la biosíntesis de PQQ, particularmente aquellos que conforman el clúster *pqq* (como *pqqC*, *pqqD* y *pqqE*), representan candidatos ideales como marcadores de potencial metabólico. El estudio comparativo de estos genes permite no solo identificar bacterias con la maquinaria genética necesaria para la síntesis de PQQ, sino también analizar su conservación evolutiva, diversidad y distribución entre distintos grupos taxonómicos.

En este contexto, el uso de herramientas bioinformáticas para la búsqueda de secuencias, el análisis filogenético de genes funcionales y el

diseño de oligonucleótidos constituye un enfoque robusto para la exploración del potencial biosintético de la microbiota. Este enfoque puede complementarse con la validación experimental exploratoria, mediante el desarrollo de protocolos de extracción de ADN y la amplificación dirigida de genes diana, para evaluar la aplicabilidad práctica de los marcadores propuestos tuvo como objetivo explorar, mediante un enfoque bioinformático y experimental exploratorio, la presencia y diversidad de genes asociados a la biosíntesis de PQQ en bacterias de la microbiota intestinal humana.

El presente trabajo se planteó con el objetivo de explorar, desde un enfoque bioinformático y experimental exploratorio, la presencia y diversidad de genes asociados a la biosíntesis de PQQ en bacterias presuntamente asociadas a la microbiota intestinal humana. Asimismo, se evaluó la viabilidad de utilizar estos genes como marcadores de potencial metabólico, con énfasis en su conservación filogenética y en el diseño de oligonucleótidos específicos para distintos grupos taxonómicos. Este trabajo busca sentar las bases para estudios futuros orientados a comprender el papel de la PQQ en el ecosistema intestinal humano.

ANTECEDENTES

Microbiota humana

El conjunto de microorganismos que colonizan las superficies y/o cavidades de un organismo se denomina microbiota. Dicha microbiota puede estar conformada por una amplia diversidad de bacterias, arqueas, levaduras y virus, los cuales coexisten en estrecha interacción entre sí y con su hospedero (Hou *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2024).

El microbioma humano se define como el conjunto de genes presentes en los microorganismos simbioses que colonizan el cuerpo humano (Turnbaugh *et al.* 2007; Ursell, *et al.* 2012). La diversidad de microorganismos presentes en cada persona depende de diversos factores como la dieta, la actividad física, la edad y la genética, por mencionar algunos. El tracto gastrointestinal bajo, específicamente el colon, es el sitio anatómico con mayor presencia de microorganismos (Sender, 2016).

Las bacterias son los microorganismos celulares más abundantes en los seres humanos. Se estima que el cuerpo humano está colonizado por aproximadamente 3.9×10^{13} bacterias, mientras que el ser humano posee cerca de 3×10^{13} células eucariotas, una relación cercana al 1:1 (Sender, 2016). El bacterioma humano se define como el conjunto de genes presentes en la totalidad de las bacterias que colonizan el cuerpo humano.

El bacterioma intestinal está conformado predominantemente por bacterias pertenecientes a los filos Bacteroidota, Bacillota, Actinomycetota, Pseudomonadota, Fusobacteriota y Verrucomicrobiota (Moise, 2017; Nguyen *et al.*, 2019; Oren & Garrity, 2021), los cuales se describen de manera general a continuación.

Bacillota

Bacillota, anteriormente denominado como Firmicutes, constituye uno de los filos predominantes de la microbiota intestinal humana. Se caracteriza por la producción de ácidos grasos de cadena corta (metabolitos clave en la homeostasis intestinal y metabólica del hospedero), en particular el butirato, el cual cumple funciones energéticas para los colonocitos y presenta capacidades antiinflamatorias (Zhang *et al.*, 2021; Martínez-Martínez *et al.*, 2024). La disminución de bacterias productoras de

butirato se relaciona con enfermedades inflamatorias y alteraciones metabólicas (Portune *et al.*, 2021; Oren & Garrity, 2021).

Bacteroidota

Bacteroidota, anteriormente denominado como Bacteroidetes, constituye otro filo dominante de la microbiota intestinal, caracterizado por su capacidad de degradar polisacáridos complejos (Oren & Garrity, 2021; Martínez-Martínez *et al.*, 2024). Su abundancia se asocia con la estabilidad ecológica del microbioma (Portune *et al.*, 2021).

Pseudomonadota

Anteriormente denominado Proteobacteria, es un filo minoritario en condiciones normales; sin embargo, cuenta con más de 200 géneros asociados a la microbiota intestinal, lo que aporta una amplia diversidad metabólica. La variación en este filo es considerada como un marcador de disbiosis intestinal (Oren & Garrity, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Martínez-Martínez *et al.*, 2024).

Actinomycetota

Anteriormente denominado Actinobacteria, constituye un filo menos abundante pero que incluye géneros clave como *Bifidobacterium*, conocidos por contribuir al metabolismo de carbohidratos, la producción de vitaminas y la modulación del sistema inmunitario. Participan en la protección contra patógenos y en la resistencia ecológica del ecosistema intestinal (Oren & Garrity, 2021; Portune *et al.*, 2021; Martínez-Martínez *et al.*, 2024).

Verrucomicrobiota

Verrucomicrobiota es un filo menos abundante dentro de la microbiota intestinal, pero con una relevancia funcional considerable. Destaca la presencia del género *Akkermansia*, particularmente *Akkermansia muciniphila*, conocido por su capacidad de degradar mucinas de la capa protectora del epitelio intestinal. Esta actividad se ha asociado con el fortalecimiento de la barrera intestinal, la regulación de la respuesta inmune y efectos positivos sobre el metabolismo del hospedero (Zhang *et al.*, 2021; Portune *et al.*, 2021; Martínez-Martínez *et al.*, 2024).

Fusobacteriota

Anteriormente denominado Fusobacteria, constituye un filo generalmente minoritario en individuos sanos, integrado principalmente por bacterias anaerobias estrictas asociadas a superficies de mucosas. Su incremento ha sido vinculado con estados de disbiosis y procesos inflamatorios (Zhao *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021; Martínez-Martínez *et al.*, 2024).

Pirroloquinolina quinona (PQQ)

La PQQ es un metabolito secundario sintetizado exclusivamente por bacterias, principalmente durante la fase estacionaria. PQQ actúa como cofactor redox y pertenece a la familia de los cofactores tipo o-quinona. Las proteínas sobre las cuales actúa como cofactor se denominan quinoproteínas (Carreño-López *et al.* 2019).

PQQ ha sido detectada tanto en organismos procariotas como en eucariotas; sin embargo, se considera que su presencia en plantas y animales puede derivar de bacterias asociadas a los alimentos o a la microbiota intestinal. Se ha identificado PQQ en tejido de ratas y humanos en concentraciones del orden de ng/mL (Carreño-López *et al.* 2019), lo que sugiere una interacción constante entre este cofactor y organismos eucariotas.

Se ha demostrado que PQQ ejerce diversos efectos biológicos tanto en modelos animales como en humanos. Entre los efectos reportados se incluyen su actividad antioxidante, la disminución de la proteína C reactiva, la reducción de lipoproteínas de baja densidad, la disminución del porcentaje de grasa corporal, la estimulación de la biogénesis mitocondrial y la mejora de funciones cognitivas (Carreño-López *et al.* 2019). La Tabla 1 resume algunos efectos de PQQ descritos en mamíferos.

Tabla 1. Efectos de PQQ en organismos eucariotas.		
Organismo	Efecto	Fuente
Rata	Mejora del aprendizaje y memoria en condiciones de estrés oxidativo y déficit de vitamina E.	Ohwada <i>et al.</i> (2008)
Humano	Disminución de los niveles de proteína C reactiva en plasma y de interleucina 6 en orina, ambas asociadas con funciones proinflamatorias.	Harris <i>et al.</i> (2013)

Humano	Disminución de los niveles séricos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el porcentaje de grasa corporal.	Nakano <i>et al.</i> (2015)
Ratón	Favorece la flexibilidad metabólica y reduce la expresión de genes proinflamatorios.	Jonscher <i>et al.</i> (2017)
Humano	Aumento de los niveles de la proteína Coactivador 1 α del Receptor Activado Gamma del Proliferador de Peroxisomas (PGC-1 α), implicada en la biogénesis mitocondrial.	Hwang <i>et al.</i> (2020)
Ratón	Atenuación de la reducción de las capacidades auditivas, por acción de especies reactivas de oxígeno (ROS), en tejido coclear.	Gao <i>et al.</i> (2022)
Humano	Mejora de las funciones cognitivas en adultos independientemente del sexo de los individuos.	Tamakoshi <i>et al.</i> (2023)

Se han descrito diversos genes involucrados en la biosíntesis de PQQ, de los cuales cinco han demostrado ser esenciales en la mayoría de las bacterias. Adicionalmente, existen genes que codifican proteínas con funciones accesorias en este proceso. Las características generales de los genes principales implicados en la síntesis de PQQ se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Genes principales que intervienen en la síntesis de PQQ (Carreño-López <i>et al.</i> 2019).	
Gen	Características
<i>pqqA</i>	Contiene una región conservada de cinco aminoácidos (Glu-X-X-X-Tir)
<i>pqqB</i>	Pertenece a la familia de las metalo- β -lactamasas y consta de aproximadamente 300 aminoácidos.
<i>pqqC</i>	Cataliza el paso terminal de la biosíntesis de PQQ mediante la oxidación y ciclación de PQQ.

<i>pqqD</i>	Proteína chaperona que consta aproximadamente de 90 residuos de aminoácidos. Se une al precursor de PQQA y lo dirige hacia la enzima PQQE.
<i>pqqE</i>	Cataliza la formación de enlaces C-C entre una cadena lateral de glutamato y una de tirosina del sustrato peptídico de PQQA.

Se ha identificado la presencia del operón *pqq* en diversas bacterias asociadas al tracto gastrointestinal, como *Allokutzneria albata* DSM 44149 y *Enterobacter cloacae* AR_0065, entre otras (Varghese N., et al. 2016 y Conlan S., et al. 2017).

Gutiérrez (2019) diseñó un marcador molecular dirigido a regiones conservadas de los genes *pqqCDE* en α -, β -, γ - y δ -proteobacterias, con el fin de desarrollar oligonucleótidos para detectar este operón.

Posteriormente, Macías (2022) evaluó un protocolo de extracción de ADN bacteriano a partir de heces humanas y validó experimentalmente los oligonucleótidos diseñados por Gutiérrez (2019), empleando los oligonucleótidos diseñados en dicho estudio. Si bien las concentraciones de ADN obtenidas fueron menores que con kits comerciales, se lograron amplificar productos de tamaño esperado. Además se observaron bandas inespecíficas, lo que sugiere la posible amplificación de variantes genómicas de *pqq* no caracterizadas previamente.

JUSTIFICACIÓN

La pirroloquinolina quinona (PQQ) es un cofactor redox producido exclusivamente por bacterias, cuya biosíntesis depende de un conjunto específico de genes distribuidos en diversos grupos bacterianos. Aunque se ha reportado la presencia de PQQ en organismos eucariotas y se han descrito múltiples efectos biológicos asociados a este cofactor, el conocimiento sobre los microorganismos intestinales potencialmente productores de PQQ y la distribución de los genes involucrados en su síntesis es aún limitado.

Diversas bacterias han sido descritas como asociadas a la microbiota intestinal; sin embargo, en muchos casos dicha asociación se ha establecido a partir de inferencias taxonómicas o ecológicas, sin una verificación detallada de la presencia de los genes responsables de la biosíntesis de PQQ. Por lo tanto, la pertenencia de un microorganismo a un grupo bacteriano vinculado a la microbiota intestinal no garantiza la presencia de los genes funcionales necesarios para producir este cofactor. Esta brecha de conocimiento evidencia la necesidad de estudios que aborden esta relación desde una perspectiva genética.

En este contexto, el presente trabajo se justifica por la necesidad de generar herramientas bioinformáticas y moleculares para identificar y evaluar la presencia de genes asociados a la biosíntesis de PQQ en bacterias intestinales. El enfoque exploratorio combina el análisis de secuencias y el diseño de marcadores moleculares dirigidos a regiones conservadas de los clústeres *pqq*, con su evaluación experimental preliminar. Este trabajo busca sentar las bases metodológicas que faciliten el estudio de la diversidad y distribución de microorganismos productores de PQQ en el ecosistema intestinal humano.

OBJETIVOS

Objetivo general

Explorar e identificar la presencia de genes asociados a la biosíntesis de la pirroloquinolina quinona (PQQ) en bacterias de la microbiota intestinal humana, mediante un estudio bioinformático y molecular.

Objetivos específicos

1. Identificar bacterias asociadas a la microbiota intestinal humana que cuenten con reportes de genes implicados en la biosíntesis de PQQ, a partir de información genómica disponible en bases de datos públicas.
2. Diseñar oligonucleótidos dirigidos a regiones conservadas de los genes *pqq*, con base en secuencias génicas de bacterias asociadas a la microbiota intestinal.
3. Proponer marcadores moleculares de potencial metabólico asociados a la biosíntesis de PQQ, orientados al estudio exploratorio de bacterias vinculadas a la microbiota intestinal.
4. Evaluar de manera preliminar la amplificación de genes *pqq* a partir de ADN bacteriano extraído de muestras fecales, como aproximación experimental exploratoria.

METODOLOGIA

Metodología bioinformática

Búsqueda y selección de secuencias con genes *pqq*

Se emplearon las bases de datos InterPro, MiMeDB y NCBI para la identificación de microorganismos con reportes de presencia de genes asociados a la biosíntesis de PQQ en los filos Verrucomicrobiota, Bacillota y Pseudomonadota. En InterPro se seleccionó el modelo TIGR02111 debido a que describe específicamente secuencias asociadas con la biosíntesis de PQQ. A partir de este modelo se identificaron organismos pertenecientes a los principales filos asociados a la microbiota intestinal humana.

La base de datos MiMeDB se utilizó para corroborar la asociación de los organismos identificados con la microbiota intestinal humana. Posteriormente se empleó NCBI para la obtención de secuencias correspondientes a *pqqC*, *pqqCDE*. Se obtuvieron las secuencias *pqqBCDE* de Bacillota y Verrucomicrobiota. Para cada especie seleccionada se descargaron hasta tres secuencias provenientes de cepas distintas.

Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el software MUSCLE 5. El alineamiento múltiple se visualizó y editó mediante el software AliView, a partir del cual se seleccionaron regiones conservadas candidatas para el diseño de oligonucleótidos. La herramienta de "traducción de secuencias de nucleótidos a aminoácidos" se usó como apoyo para la identificación de regiones conservadas a nivel funcional.

El análisis de las regiones seleccionadas se realizó con el software OligoAnalyzer. El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo considerando una longitud de 18 a 27 nucleótidos, un contenido de GC de 40-60%, una diferencia máxima de 3 °C entre las temperaturas de fusión (T_m) de los oligonucleótidos forward y reverse, y la ausencia de horquillas, auto-dímeros y heterodímeros con valores de ΔG menores a -10.

La especificidad de los oligonucleótidos propuestos se evaluó mediante análisis BLAST y PCR *in silico* empleando las herramientas BLAST y Primer-BLAST del NCBI.

Construcción de árboles filogenéticos

Para la preparación de las secuencias, estas se recortaron al primer codón completo posterior a la región de alineamiento definida por el oligonucleótido forward correspondiente, con el fin de mantener la coherencia del marco de lectura en los análisis comparativos. A partir de estas secuencias se llevaron a cabo análisis filogenéticos considerando dos y tres marcos de lectura.

Los árboles filogenéticos se construyeron usando el software MEGA 12 mediante el método Maximum Likelihood. Como árbol inicial se utilizó el método Neighbor-Joining y la robustez de las ramas se evaluó mediante análisis bootstrap con 1000 réplicas. Para el enraizamiento se emplearon secuencias nucleotídicas de los genes ARNr 16S, *pqqC* y *pqqCDE* de *Streptomyces rochei* 7434AN4; así como *pqqBCDE* de *Streptomyces rapamycinicus* CQUS011. El árbol consenso obtenido se utilizó para la interpretación filogenética.

Adicionalmente se diseñaron árboles para regiones en común, delimitadas por los oligos forward y reverse de Verrucomicrobiota y Bacillota, así como para Pseudomonadota.

Metodología experimental exploratoria

Obtención de muestras fecales

Reclutamiento de participantes

Se entrevistó a todos los individuos interesados en participar en el proyecto, para ello se tomaron en cuenta como criterios de inclusión: ser mayor de 18 años, haber firmado el consentimiento informado (ver anexos) y no haber tomado antibióticos por lo menos 3 meses antes de la donación de muestra fecal. A cada participante se le explicó el manejo que se le daría a su información, así como el procedimiento adecuado para la donación de su muestra fecal.

Recolección de muestra fecal

A cada participante se le indicó que debía recolectar una muestra, del tamaño de una nuez, de la primera deposición del día, en un frasco de recolección estéril, procurando no contaminar la muestra con agua u orina. La muestra se entregó en un lapso no mayor a 2 horas desde su recolección, para ser trasladada a las instalaciones del laboratorio de

genética microbiana para su procesamiento inmediato y/o almacenamiento a -70°C .

Purificación de ADN de muestras fecales

Extracción de ADN de muestra fecal con Si Wash

En un tubo Falcon de 15 ml se depositaron 500 mg de muestra fecal y se añadieron 2.5 ml de PBS 1×; la mezcla se homogenizó mediante agitación durante 5 minutos, empleando vortex cuando fue necesario para garantizar una resuspensión completa. Se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos y se recuperaron 500 µl del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un microtubo de 1.5 ml. La muestra se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante cuidadosamente. El pellet resultante se resuspendió en 500 µl de Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) y se centrifugó nuevamente a velocidad máxima durante 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2 %. La mezcla se incubó a 60°C durante 60 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se homogeneizó la mezcla por inversión y se centrifugó a velocidad máxima durante 2 minutos; el sobrenadante se recuperó cuidadosamente evitando perturbar la interfase. A este sobrenadante se le agregaron 200 µl de alcohol isoamílico:cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó por 2 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 ml.

Para la purificación del ADN mediante sílica, se añadieron 500 µl de NaI 6 M y 20 µl de sílica previamente resuspendida; la mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto, descartándose el sobrenadante. El pellet se lavó añadiendo 500 µl de Si Wash 1×, se resuspendió completamente y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet a 37°C hasta lograr la evaporación del Si Wash 1×.

Finalmente, se añadieron 50 µl de agua PISA estéril y se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos. Se centrifugó durante 2 minutos a velocidad máxima y el sobrenadante, que contenía el ADN purificado, se recuperó

cuidadosamente y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml para su almacenamiento.

Extracción de ADN de muestra fecal con New Wash

En un microtubo de 2 ml se depositaron 100 mg de muestra fecal y se añadieron 1.5 ml de PBS 1×, la mezcla se resuspendió completamente mediante inversión. Se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos y se transfirieron 500 µl del sobrenadante a un microtubo de 2 ml nuevo. Se agregaron 15 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 15 µl de lisozima (10 mg/ml), se homogeneizó por inversión y se incubó en agitación (450 rpm) a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se añadieron a la mezcla 200 µl de SDS al 10 %, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por 15 minutos. Se agregaron 100 µl de NaCl 5 M, se homogeneizó por inversión y se incubó en baño maría a 65°C durante 10 minutos. Se añadieron a la mezcla 100 µl de buffer CTAB al 2% previamente atemperado a 65°C, se mezcló por inversión y se incubó en baño maría a 65°C durante 1 hora, mezclando gentilmente por inversión cada 15 minutos.

Se agregaron 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se homogeneizó por inversión y se centrifugó a velocidad máxima (13300 rpm) durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un microtubo de 2 ml nuevo evitando alterar la fase intermedia, se repitió el procedimiento anterior hasta que la fase intermedia desapareció por completo. Se agregaron 500 µl de NaI 6 M y se homogeneizó por inversión; posteriormente se añadieron 25 µl de sílica previamente resuspendida, se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima y se decantó cuidadosamente el sobrenadante.

Se agregaron 500 µl de New Wash 1×, se resuspendió el pellet mediante inversión o micropipeta según fuera necesario y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml nuevo. Se centrifugó a velocidad máxima por 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió 4 veces. El pellet se dejó secar en baño maría a 45°C hasta lograr la evaporación completa; posteriormente se añadieron 100 µl de TE 10:1 y se resuspendió el pellet con micropipeta, posteriormente se incubó en baño maría a 45°C durante 5 minutos. El sobrenadante, que contenía el ADN purificado, se recuperó en un microtubo de 1.5 ml nuevo cuidando de no arrastrar sílica y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Eliminación de RNA

A una alícuota de ADN se le añadieron 0.5 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se homogeneizó gentilmente con micropipeta. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Precipitación de ADN

A cada muestra de ADN se le agregó una décima parte de su volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se homogeneizó mediante inversión y posteriormente se añadió un volumen equivalente de isopropanol a temperatura ambiente. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos.

El sobrenadante se decantó cuidadosamente y el pellet se lavó con 400 µl de etanol al 70% frío, se homogeneizó suavemente y se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos; el sobrenadante se retiró con micropipeta procurando no perturbar el pellet. Este procedimiento de lavado con etanol al 70% se repitió una vez más.

El pellet se dejó secar a 37°C hasta evaporar completamente las gotas residuales de etanol y finalmente se resuspendió en un volumen correspondiente a la mitad del volumen inicial de la muestra y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Concentración y pureza del ADN

Se analizó la concentración y pureza de las muestras de ADN utilizando 1 µl de muestra en "NanoDrop™ 2000". Se consideraron las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

Amplificación por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR del gen ARNr 16S

A cada muestra de ADN purificado se le realizó una PCR amplificando el gen ARNr 16S, usando los oligonucleótidos universales UN27F (5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y UN1392R (5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3') para comprobar la viabilidad del ADN. Se utilizaron los siguientes reactivos para cada reacción de 20 µl de PCR: 13.5 µl de agua PISA, 2 µl de Buffer DreamTaq Polimerasa 10x, 1 µl de dNTP's 2 mM, 1 µl de oligonucleótido UN27F, 1 µl de oligonucleótido UN1392R, 1 µl de muestra de ADN purificado y 0.5 µl de DreamTaq Polimerasa. Se emplearon 57°C

como temperatura de alineamiento. Las condiciones de ciclado se ajustaron de acuerdo con el juego de oligos utilizado siguiendo la condiciones generales descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones generales de ciclado con DreamTaq Polimerasa.			
Paso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	3 minutos	95°C	1X
Desnaturalización	45 segundos	95°C	30X
Alineamiento	45 segundos	T _m – 5°C	
Elongación	1 minuto/kb	72°C	
Extensión final	10 minutos	72°C	1x
Mantenimiento	∞	4°C	1X

PCR de los genes *pqqC* y *pqqCDE*

Se emplearon las cantidades de reactivo descritas para la realización de la PCR para amplificar el gen ARNr 16S, sustituyendo el juego de oligonucleótidos según corresponda.

Las condiciones de alineamiento se ajustaron de acuerdo con el promedio del juego de oligonucleótidos empleado siguiendo las condiciones de ciclado descritas en la Tabla 3. Adicional a lo anterior, para el juego de oligonucleótidos PQQ_BAC se manejó un gradiente de temperatura de alineamiento de $\pm 10^{\circ}\text{C}$.

Electroforesis

Las muestras de ADN y los productos de PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa (0.7%) con buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) (0.5X), empleando 70V durante 35 minutos. Se utilizó "GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder" como marcador de peso molecular.

RESULTADOS

Bacterias presuntamente asociadas a la microbiota intestinal con genes para la síntesis de PQQ

Se incluyeron en el estudio un total de 110 especies repartidas en 49 géneros bacterianos presuntamente asociados con la microbiota intestinal humana y con reportes de genes implicados en la síntesis de PQQ (Tabla 4 y anexos).

Tabla 4. Cantidad de microorganismos clasificados por grupo taxonómico incluidos en el estudio.

Grupo taxonómico (filo o clase)	Cantidad de géneros	Cantidad de especies
Bacillota	6	20
Verrucomicrobiota	2	5
α -proteobacteria	9	13
β -proteobacteria	27	61
δ -proteobacteria	1	1
ϵ -proteobacteria	4	10
TOTAL	49	110

Entre los microorganismos identificados se aprecia una notable predominancia de las Proteobacterias, con más del 80% de los géneros identificados. Particularmente la clase β -proteobacteria sobresale con aproximadamente el 55% de los géneros identificados, entre los que se destacan los géneros *Burkholderia* e *Hydrogenophaga* representando entorno al 25% de las especies en dicha clase (Tabla 5). No obstante, Bacillota con 20 especies con genes *pqq* (Tabla 6) representa casi el 20% del total de especies incluidas en el estudio.

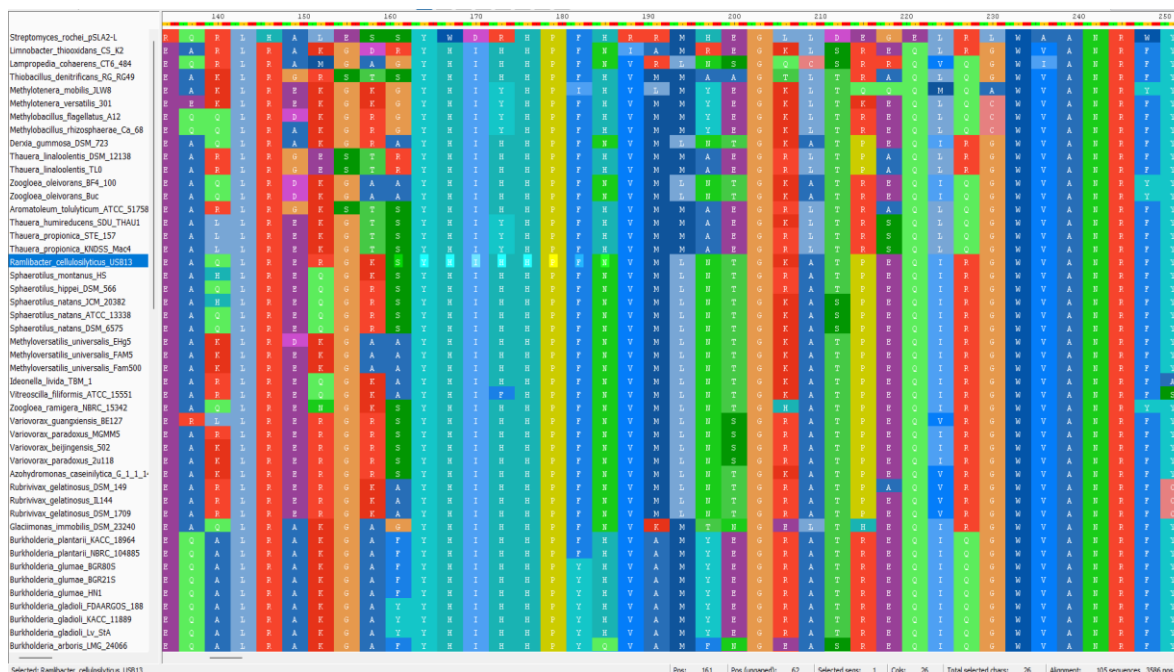
Tabla 5. β -proteobacterias presuntamente asociadas a la microbiota intestinal y con presencia de genes *pqq*.

Orden	Familia	Género	Especie	
Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Advenella</i>	<i>kashmirensis</i>	
		<i>Derxia</i>	<i>qummosa</i>	
	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>ambifaria</i>	
			<i>arboris</i>	
			<i>cepacia</i>	
			<i>gladioli</i>	
			<i>glumae</i>	
			<i>plantarii</i>	
			<i>pyrrocinia</i>	
			<i>reimsis</i>	
			<i>stabilis</i>	
			<i>territorii</i>	
			<i>ubonensis</i>	
		<i>Cupriavidus</i>	<i>necator</i>	
		<i>Limnobacter</i>	<i>thiooxidans</i>	
		<i>Pandoraea</i>	<i>terrae</i>	
			<i>thiooxydans</i>	
			<i>Pelomonas</i>	<i>aquatica</i>
		<i>Ralstonia</i>	<i>chuxiongensis</i>	
			<i>insidiosa</i>	
			<i>mannitolilytica</i>	
	<i>pickettii</i>			
	<i>wenshanensis</i>			
	<i>aromaticivorans</i>			
	<i>crassostreae</i>			
	Comamonadaceae	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>crocea</i>	
			<i>pseudoflava</i>	
			<i>taeniospiralis</i>	
			<i>Lampropedia</i>	<i>cohaerens</i>
			<i>Melaminivora</i>	<i>iejuensis</i>
		<i>Ramlibacter</i>	<i>suipulveris</i>	
			<i>cellulosilyticus</i>	
			<i>henchirensis</i>	
			<i>monticola</i>	
			<i>beiinaensis</i>	
			<i>boronicumulans</i>	
			<i>qossypii</i>	
			<i>quangxiensis</i>	
			<i>paradoxus</i>	
Oxalobacteraceae		<i>Glaciimonas</i>	<i>immobilis</i>	
		<i>Massilia</i>	<i>aurea</i>	
			<i>psychrophila</i>	
Sphaerotilaceae		<i>Azohydromonas</i>	<i>caseinilytica</i>	
		<i>Ideonella</i>	<i>dechloratans</i>	
	<i>Rubrivivax</i>	<i>gelatinosus</i>		
	<i>Sphaerotilus</i>	<i>hippei</i>		
		<i>montanus</i>		
Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Vitreoscilla</i>	<i>natans</i>	
Nitrosomonadales	Methylophilaceae	<i>Methylobacillus</i>	<i>filiformis</i>	
		<i>Methylotenera</i>	<i>flagellatus</i>	
	<i>rhizosphaerae</i>			
	Sterolibacteriaceae		<i>Methyloversatilis</i>	<i>mobilis</i>
	Thiobacillaceae	<i>Thiobacillus</i>	<i>versatilis</i>	
<i>denitrificans</i>				
Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Aromatoleum</i>	<i>tolulyticum</i>	
	Zoogloeaceae	<i>Thauera</i>	<i>humireducens</i>	
			<i>linaloolentis</i>	
			<i>propionica</i>	
		<i>Zoogloea</i>	<i>oleivorans</i>	
			<i>ramigera</i>	

Tabla 6. Bacterias del filo Bacillota presuntamente asociadas a la microbiota intestinal y con presencia de genes *pqq*.

Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>salipaludis</i>
				<i>timonensis</i>
			<i>Heyndrickxia</i>	<i>camelliae</i>
				<i>sporothermodurans</i>
				<i>vini</i>
			<i>Neobacillus</i>	<i>bataviensis</i>
			<i>Priestia</i>	<i>drentensis</i>
				<i>megaterium</i>
		Paenibacillaceae	<i>Cohnella</i>	<i>colombiensis</i>
				<i>endophytica</i>
				<i>herbarum</i>
				<i>lubricantis</i>
				<i>phaseoli</i>
				<i>pontilimi</i>
				<i>xylanilytica</i>
				<i>albilobatus</i>
			<i>Paenibacillus</i>	<i>elqii</i>
				<i>piri</i>
				<i>rhizovicius</i>
				<i>thalictri</i>

Figura 2. Alineamiento MUSCLE de β -proteobacterias visualizado en AliView utilizando la herramienta de “traducción de secuencias nucleotídicas a aminoácidos”.



Se diseñó un total de 15 juegos de oligonucleótidos dirigidos a regiones de los genes *pqqC* y *pqqCDE* en los filos de interés. Para facilitar su identificación, se adoptó un sistema de nomenclatura basado en el gen diana y el grupo taxonómico: las primeras letras antes del “_” indican que amplifican regiones de los genes *pqq*, si solo están las letras “PQQ” se refiere a regiones de los genes *pqqCDE*, en caso de tener otra letra después de PQQ se hace referencia explícita a los genes de cuyas regiones se amplifica; la segunda parte del nombre refiere al grupo taxonómico, siendo que para Proteobacterias la primera letra indica la clase a la que se hace referencia empleando letras equivalentes del alfabeto latino, seguido de las letras PB; para el filo Verrucomicrobiota se agrega la letra V y para Bacillota se emplean las letras FB o BAC, siendo diseñados los oligos BAC tomando como molde principal la cepa *Bacillus timonensis* MM10403188, una cepa aislada de la microbiota intestinal humana. Por ejemplo, PQQC_BPB designa cebadores para el gen *pqqC* en Beta-Proteobacterias, mientras que PQQ_V se refiere al gen *pqqCDE* en Verrucomicrobiota.

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de regiones de los genes <i>pqqCDE</i>.					
Nombre	Genes	Oligo	Secuencias (5' a 3')	Tm (°C)	Amplificación
PQQ_APB	<i>pqqCDE</i>	Forward	GCTSAACCGCTACTACTAYCAG	64.0	1500 pb
		Reverse	GCCCAGCCGTAATACTGC	64.1	
PQQC_APB	<i>pqqC</i>	Forward	GCTSAACCGCTACTACTAYCAG	64.0	510 pb
		Reverse	ACGTTGSWCTTGAAGRTCAGC	65.2	
PQQ_BPB	<i>pqqCDE</i>	Forward	GCTACCACATCCACCATCCGTTCAAC	69.0	1650 pb
		Reverse	AGTAGTCGGGCACGACGAAGAG	67.8	
PQQC_BPB	<i>pqqC</i>	Forward	TACCACATCCACCATCCGTTCAAC	66.9	580 pb
		Reverse	CTTGAAGTGCAGGATGTCCAGCG	66.7	
PQQ_DPB	<i>pqqCDE</i>	Forward	TCGCCTCGTCACTGACCGAGTTGTTC	72.2	920 pb
		Reverse	CGCCAGAGGTGATCAGGTTCTGTAG	70.6	
PQQC_DPB	<i>pqqC</i>	Forward	TCGCCTCGTCACTGACCGAGTTGTTC	72.2	239 pb
		Reverse	GGCCACAGCAGTCACACTTGAAG	72.2	
PQQ_EPB	<i>pqqCDE</i>	Forward	CCATGATAGTGTGGTGGTGAATTG	67.1	1520 pb
		Reverse	GCTGTATTACATGGAAGTGCAACACC	67.3	
PQQC_EPB	<i>pqqC</i>	Forward	CCATGATAGTGTGGTGGTGAATTG	67.1	312 pb
		Reverse	CCATGTTGAACATCTCGTCTTGCTTC	67.2	
PQQ_Vc	<i>pqqCDE</i>	Forward	CTATCACGACAAGCATCCCTTTCAC	66.6	973 pb
		Reverse	CAATGCAGCGGACAACGATAC	65.5	
PQQ_Vm	<i>pqqCDE</i>	Forward	CTTGGTCGATGCTCGATGC	65.5	1211 pb
		Reverse	CTTCAGAATTCACCAGATATTCTC	65.2	
PQQC_V	<i>pqqC</i>	Forward	CTATCACGACAAGCATCC	59.2	605 pb
		Reverse	CATCGAGCATCGACCAAAG	65.2	
PQQ_FB	<i>pqqCDE</i>	Forward	CGCTATCACGACAAGCATCCTTATC	65.4	994 pb
		Reverse	CGGATTKGAGCAGTAMGGACAATG	65.1	
PQQC_FB	<i>pqqC</i>	Forward	CGCTATCACGACAAGCATCCTTATC	65.4	444 pb
		Reverse	GCGAATCCAMGGATACAGCTGCTC	68.2	
PQQ_BAC	<i>pqqCDE</i>	Forward	TCTTCTTATCATGACAAACATCC	59.8	1694 pb
		Reverse	GATTCATAATAATCAGGAATAACCC	58.9	
PQQCD_BAC	<i>pqqCD</i>	Forward	TCTTCTTATCATGACAAACATCCC	61.8	979 pb
		Reverse	ATCACCACCCATCCCTGATC	64.4	

Análisis filogenético de genes *pqq*

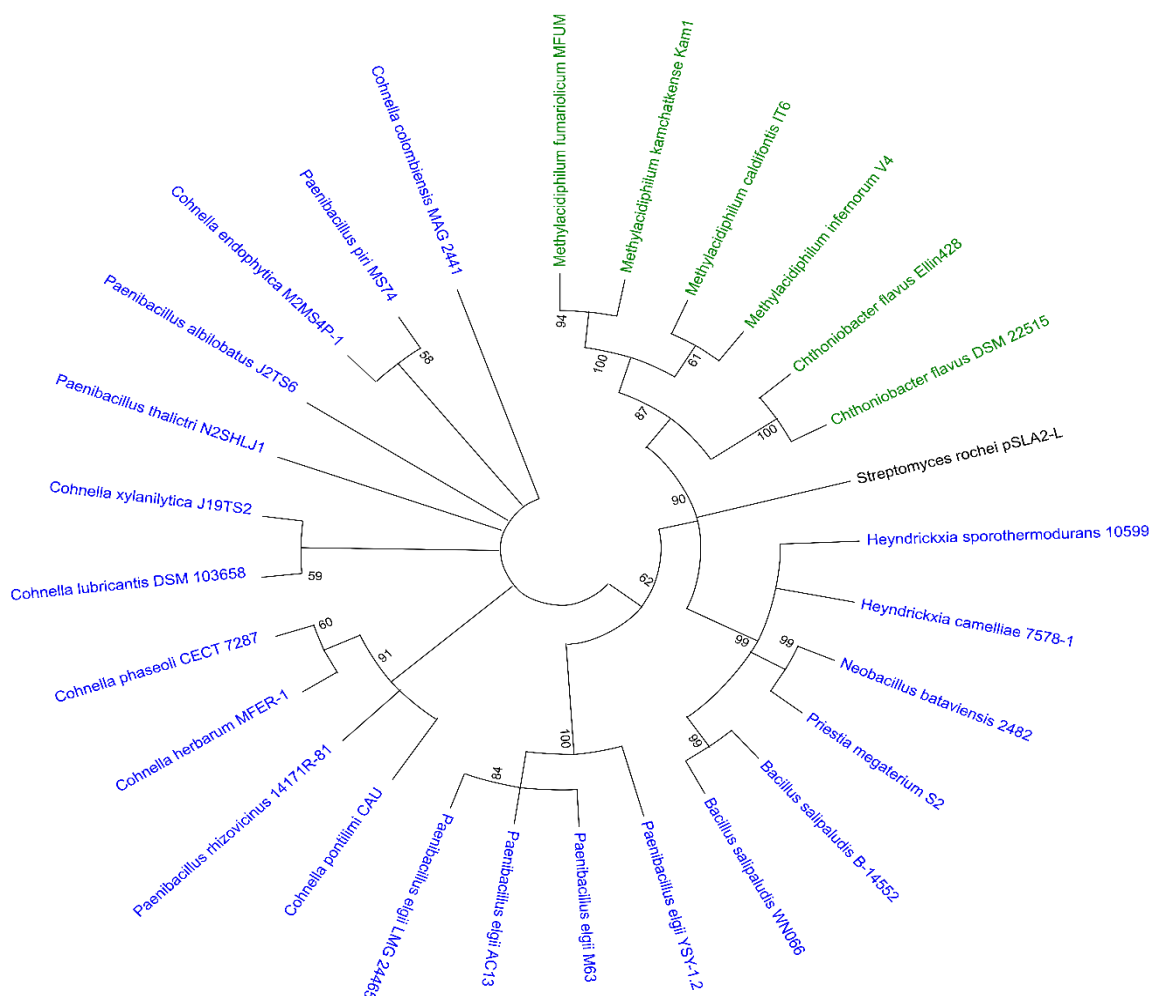
Con el fin de evaluar la relación filogenética de las secuencias seleccionadas y contextualizar el diseño de los oligonucleótidos propuestos, se construyeron árboles filogenéticos a partir de regiones de los genes *pqqC*, *pqqCD* y *pqqCDE*, según el grupo taxonómico analizado. Los análisis se realizaron considerando dos y tres marcos de lectura, obteniendo árboles independientes para cada condición. Para futuras menciones, se asumirá que los árboles presentados se construyeron con tres marcos de lectura, a menos que se especifique lo contrario.

Análisis filogenético en Bacillota y Verrucomicrobiota

Para el filo Bacillota se construyeron árboles filogenéticos empleando regiones de los genes *pqqC*, *pqqCD* y *pqqCDE*. Por su parte en Verrucomicrobiota se construyeron árboles filogenéticos utilizando regiones de los genes *pqqC*, *pqqCDE*. Adicionalmente se construyeron árboles para cada filo, utilizando la totalidad de la región comprendida por los genes *pqqBCDE*.

En la Figura 3 se muestra un árbol filogenético construido con regiones en común del gen *pqqCDE*, en especies de ambos filos. Como se puede apreciar, las especies se agrupan de acuerdo con su filo correspondiente, lo que sugiere el potencial de cribado de la región común empleada.

Figura 3. Árbol filogenético diseñado con regiones en común del *pqqCDE*, de Bacillota y Verrucomicrobiota. En verde, filo Verrucomicrobiota; en rojo especies filo Bacillota; en negro, enraizamiento del filo Actinomycetota.



Análisis filogenético en *Pseudomonadota*

Para las Proteobacterias se construyeron árboles filogenéticos empleando regiones de *pqqC* y *pqqCDE* para cada clase; así como árboles considerando regiones en común, delimitadas por los oligos diseñados, para el conjunto de las clases. En la Figura 4 se muestra un árbol diseñado con regiones del gen *pqqCDE* de Proteobacterias, en el cual se destacan los valores de soporte bootstrap, la mayoría de ellos con valores por encima de 80, lo que representa un buen soporte en el contexto de genes metabólicos como lo es el caso de los genes *pqq*.

Figura 4. Árbol filogenético diseñado con regiones en común del gen *pqqCDE* de Proteobacterias. En rojo, clase α -proteobacteria; en morado, clase β -proteobacteria; en verde, clase δ -proteobacteria; en amarillo, clase ε -proteobacteria; en negro enraizamiento del filo Actinomycetota.



Árboles filogenéticos de referencia basados en ARNr 16

Como referencia taxonómica, se construyeron árboles filogenéticos basados en secuencias del gen ARNr 16S para Bacillota, Verrucomicrobiota, el conjunto Bacillota-Verrucomicrobiota y Pseudomonadota. Los árboles obtenidos se presentan en las Figuras 5-6, entre los cuales resalta el agrupamiento de las Proteobacterias por clase con respecto a la Figura 4, congruente con la construcción de un árbol filogenético empleando genes de mantenimiento.

De manera similar los árboles filogenéticos contruidos, para genes *pqq*, por filo, tienden a resolverse de manera similar a su equivalente construido con genes ARNr 16S cuando se analiza a nivel de Orden (ver anexos).

Figura 5. Árbol filogenético del gen ARNr 16S de especies de los filos Bacillota y Verrucomicrobiota, incluidos en el estudio. En verde, filo Verrucomicrobiota; en rojo, filo Bacillota; en negro, enraizamiento del filo Actinomycetota.

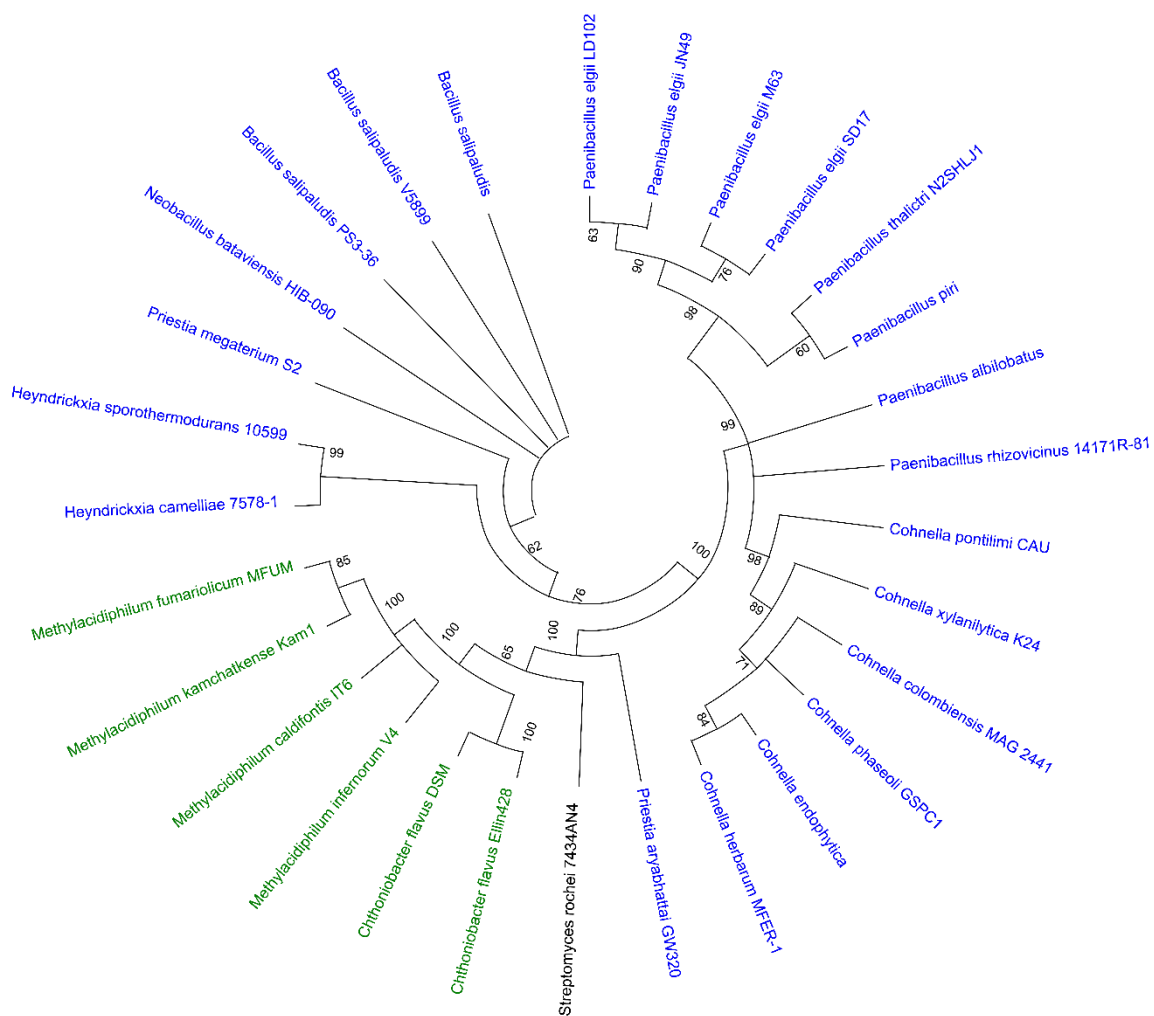
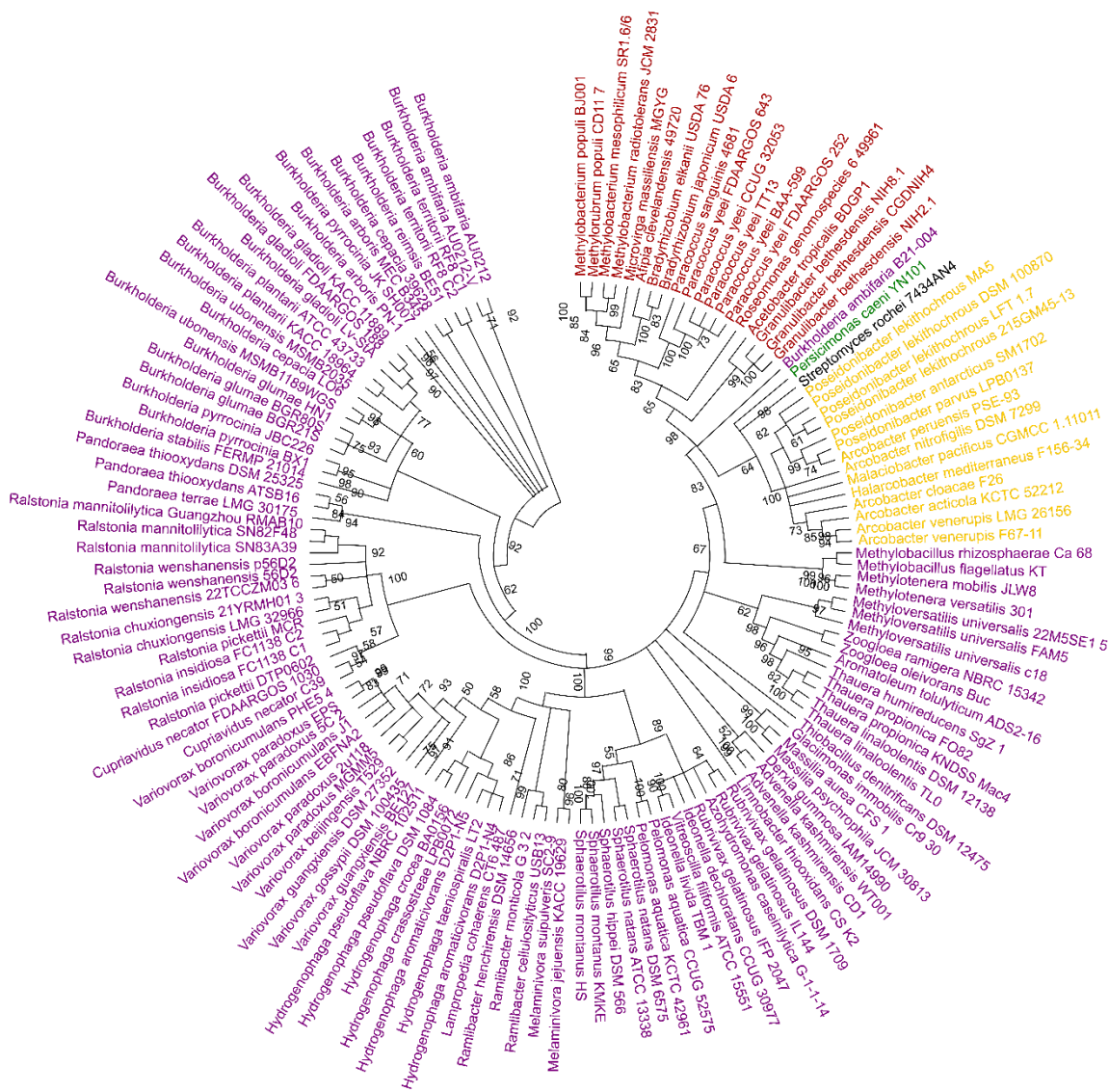


Figura 6. Árbol filogenético del gen ARNr 16S de especies de Proteobacterias, incluidas en el estudio. En rojo, clase α -proteobacteria; en morado, clase β -proteobacteria; en verde, clase δ -proteobacteria; en amarillo, clase ϵ -proteobacteria; en negro enraizamiento del filo Actinomycetota.



Evaluación experimental exploratoria

Se propuso un protocolo original de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras fecales humanas. Se realizaron ensayos de precipitación de ADN con uno y dos lavados de etanol al 70%, obteniendo mejores resultados tanto en pureza como en concentración bajo esta última condición (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de pureza y concentración de muestras de ADN extraídas con la metodología propuesta			
Muestra	260/280	260/230	Concentración
Px4	1.81	0.53	79.1
Px101	1.77	1.05	87.6
Px107	1.77	1.05	87.6
Px109	1.78	0.94	103.7
Px116	1.86	0.91	29.4
Px125	1.27	0.71	230.9
Px130	1.75	0.71	35.9
Promedio	1.72	0.84	93.5

Con el fin de evaluar de manera exploratoria la aplicabilidad experimental de los oligonucleótidos diseñados, se realizaron ensayos de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras fecales humanas, seguidos de reacciones de amplificación por PCR dirigidas al gen ARNr 16S y a genes asociados a la biosíntesis de PQQ. Como control del proceso de extracción y amplificación del gen ARNr 16S, se emplearon cultivos de *Stutzerimonas stutzeri* y *Klebsiella pneumoniae*.

En la Figura 7 se muestra un gel de electroforesis en agarosa correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S a partir de ADN recuperado mediante la metodología de extracción de ADN de muestras fecales con New Wash. En los carriles correspondientes a las muestras fecales se observa la presencia de productos de amplificación, así como bandas amplificadas en los controles bacterianos empleados.

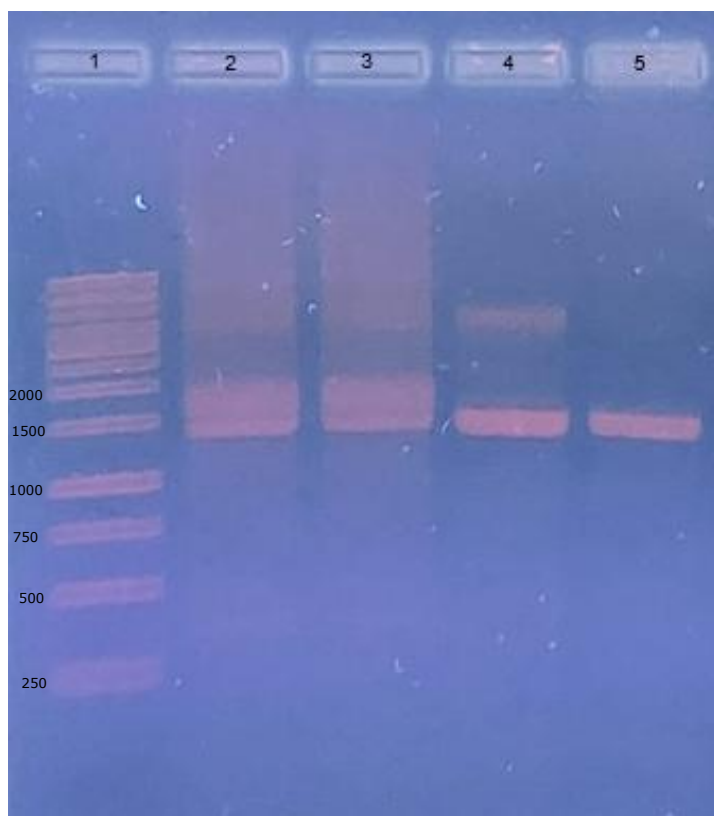


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de PCR del gen ARNr 16S. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2-3, ADN de muestra fecal; carril 4, *Stutzerimonas stutzeri*; carril 5, *Klebsiella pneumoniae*.

Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR utilizando algunos de los oligonucleótidos diseñados. En la Figura 8 se presenta un gel de electroforesis correspondiente a una PCR en gradiente empleando el juego de oligonucleótidos PQQBAC, utilizando ADN recuperado de muestras fecales como molde. Se observó una banda de amplificación tenue en los carriles 6 y 7, cuya movilidad electroforética coincide con el tamaño esperado de ~1700 pb. La baja intensidad de la banda podría atribuirse a una baja abundancia del ADN diana en la muestra compleja o a condiciones de amplificación subóptimas.

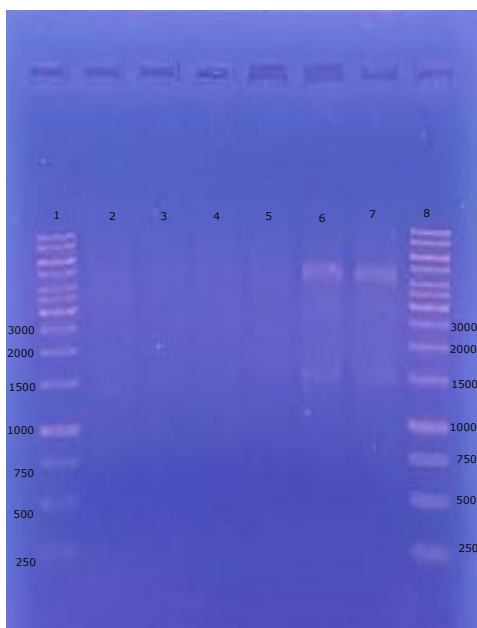


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de PCR de regiones del gen *pqqCDE* empleando oligonucleótidos PQQBAC y ADN de muestra fecal. Carriles 1 y 8, marcador de peso molecular; carriles 2-3, Tm 43.0 °C con 3 % y 4 % de DMSO; carriles 4-5, Tm 44.1 °C con 3 % y 4 % de DMSO; carriles 6-7, Tm 45.0 °C con 3 % y 4 % de DMSO.

DISCUSIÓN

Este estudio exploró, mediante un enfoque bioinformático complementado con una validación experimental exploratoria, la presencia y diversidad de genes implicados en la biosíntesis de la PQQ en bacterias de la microbiota intestinal humana, así como su potencial utilidad como marcadores de capacidad metabólica.

A partir del análisis de bases de datos especializadas se identificaron 49 géneros bacterianos pertenecientes principalmente a los filos Bacillota, Verrucomicrobiota y Pseudomonadota, destacando la alta representación de las clases β -proteobacterias. Diversos estudios de metagenómica y microbiota comparativa han demostrado que estos grupos bacterianos concentran una proporción relevante de las funciones metabólicas asociadas al hospedero, incluyendo la síntesis de metabolitos bioactivos con potencial impacto fisiológico (Turnbaugh *et al.*, 2007; Ursell *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2022; Martínez-Martínez *et al.*, 2024; Ma *et al.*, 2024).

Cabe resaltar que pese a que en el filo Bacillota sólo se identificaron 6 géneros presuntamente asociados a la microbiota intestinal humana con presencia de genes *pqq*, a nivel de especie cuenta con casi 20% del total de especies incluidas en el estudio, entre las que se encuentra *Bacillus timonensis* MM10403188, una cepa aislada de la microbiota intestinal de una persona en Senegal (Million *et al.*, 2013). En el contexto del filo Bacillota, el cual es uno de los más abundantes en la microbiota intestinal humana, esto puede sugerir la presencia de múltiples cepas con genes para la síntesis de *pqq* en la microbiota intestinal de individuos.

No obstante, la detección de genes *pqq* en organismos presuntamente asociados a la microbiota intestinal no implica necesariamente la presencia homogénea de dichos genes en todos los miembros de una especie, ni su expresión activa o la producción efectiva de PQQ *in vivo*. Sin embargo, sí establece una base genética que respalda un potencial biosintético. Esta distinción entre presencia génica y función metabólica efectiva ha sido ampliamente discutida en estudios de microbioma, donde la inferencia funcional a partir de genomas de referencia o secuencias aisladas debe interpretarse con cautela (Ursell *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2022).

El análisis filogenético reveló, en general, una congruencia entre la clasificación basada en los genes *pqq* y la obtenida con el gen del ARNr 16S, especialmente en Bacillota y Verrucomicrobiota (Figuras 3 y 5). Esto sugiere que los genes *pqq* conservan señales evolutivas relevantes dentro de estos linajes, respaldando su uso como marcadores funcionales complementarios. No obstante, se observaron variaciones topológicas, particularmente en Pseudomonadota (Figuras 4 y 6), lo cual refleja la presión selectiva diferencial que actúa sobre los genes metabólicos en comparación con los genes constitutivos como el ARNr 16S (Joshi et al., 2022).

En el caso de los filos Bacillota y Verrucomicrobiota, los resultados obtenidos permiten discutir de manera específica la viabilidad de proponer genes asociados a la biosíntesis de PQQ como marcadores de potencial metabólico. En ambos grupos se identificaron regiones conservadas de los genes *pqqC* y *pqqCDE* que mostraron patrones filogenéticos consistentes dentro de cada filo, lo que facilitó el diseño de oligonucleótidos dirigidos a regiones compartidas. Este enfoque resulta particularmente relevante para la exploración de funciones metabólicas específicas en filos con representación limitada, pero con relevancia funcional dentro del ecosistema intestinal.

De manera complementaria, en el filo Pseudomonadota, la necesidad de subdividir el análisis a nivel de clase respondió a la alta diversidad genética observada y a la dificultad de diseñar oligonucleótidos universales funcionales para todo el filo. La estrategia de diseño de oligonucleótidos por clase permitió delimitar regiones conservadas con mayor precisión, reduciendo el riesgo de amplificación inespecífica y reforzando la pertinencia de un enfoque taxonómicamente estratificado especialmente cuando estos se utilizan como base para el diseño de oligonucleótidos o la propuesta de marcadores funcionales. Este resultado es consistente con estudios previos que describen a Pseudomonadota como uno de los grupos bacterianos más diversos y metabólicamente versátiles del microbioma humano (Nguyen et al., 2019; Hou et al., 2022).

La ubicación de genes *pqq* en plásmidos naturales, como el plásmido pSLA2-L de *Streptomyces rochei* 7434AN4 utilizado como grupo externo en nuestros análisis, sugiere la ocurrencia de transferencia horizontal de genes (THG) entre filos. Este fenómeno adquiere especial relevancia en

el ecosistema intestinal, donde la THG puede ser un mecanismo clave en la diseminación de capacidades metabólicas entre miembros de la comunidad microbiana.

Desde una perspectiva funcional, la relevancia de la PQQ como cofactor redox ha sido ampliamente documentada en bacterias, particularmente en el contexto del metabolismo energético y la actividad de enzimas deshidrogenasas. En organismos eucariotas, diversos estudios han reportado efectos antioxidantes, neuro-protectores y metabólicos asociados a la suplementación con PQQ, tanto en modelos animales como en humanos (Ohwada et al., 2008; Gao et al., 2022; Tamakoshi et al., 2023). Sin embargo, el origen microbiano de la PQQ detectada en el hospedero humano continúa siendo un aspecto poco explorado, lo que resalta la pertinencia de estudios centrados en la caracterización del potencial biosintético del microbioma intestinal.

Los ensayos experimentales exploratorios realizados en este estudio permitieron comprobar la viabilidad de una propuesta original de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras fecales humanas y la amplificación exitosa del gen ARNr 16S, lo que confirma la calidad del ADN obtenido. La elección del método de extracción de muestras fecales ha demostrado tener efectos en la diversidad microbiana identificada al momento de realizar secuenciaciones metagenómicas (Fernández *et al.*, 2024), lo que pone de relieve la necesidad de realizar más ensayos con la metodología propuesta con el objetivo de evaluar su potencial aplicación en estudios de metagenómica de la microbiota intestinal humana.

Por otra parte, la amplificación de regiones asociadas a genes *pqq* mediante algunos de los oligonucleótidos diseñados sugiere que las regiones objetivo son accesibles experimentalmente. La baja nitidez de las bandas en la figura 8 puede deberse a la baja cantidad del ADN diana en la muestra; además de interferencias debidas a contaminación por sales, evidenciada por la relación 260/230 de las muestras analizadas (Tabla 7). No obstante, la ausencia de secuenciación de los amplicones limita la confirmación definitiva de su identidad, por lo que estos resultados deben interpretarse como evidencia preliminar.

El uso de genes asociados a rutas metabólicas específicas, como los implicados en la biosíntesis de la pirroloquinolina quinona, presenta

ventajas y limitaciones desde una perspectiva filogenética. A diferencia de los marcadores taxonómicos clásicos, los genes metabólicos están sujetos a presiones selectivas relacionadas con la función, el nicho ecológico y la historia evolutiva particular de cada linaje, lo que puede generar patrones filogenéticos parcialmente congruentes, pero no idénticos, a los observados con genes constitutivos (Abascal et al., 2014).

Finalmente, la comparación entre árboles filogenéticos construidos considerando dos y tres marcos de lectura (ver anexos) evidenció que, si bien el recorte de las secuencias al primer codón completo posterior a la región de alineamiento contribuyó a mantener la coherencia del marco de lectura, la inclusión de distintos marcos puede influir en la resolución filogenética obtenida. Este resultado subraya la importancia de una preparación cuidadosa de las secuencias y de criterios explícitos de traducción al interpretar análisis filogenéticos basados en genes codificantes,

En conjunto, nuestros resultados respaldan la utilidad de los genes *pqq*, particularmente *pqqC* y *pqqCDE*, como marcadores de capacidad metabólica en bacterias intestinales. Este enfoque no sustituye, sino que complementa los análisis taxonómicos tradicionales, integrando información funcional, para una comprensión más profunda del microbioma en salud y enfermedad, en línea con las propuestas recientes (Keswani et al., 2019; Martínez-Martínez et al., 2024; Ma et al., 2024).

CONCLUSIONES

Se logró identificar un conjunto diverso de 110 especies (49 géneros) bacterianas con genes *pqq*, principalmente de los filos Bacillota, Verrucomicrobiota y Pseudomonadota. Esto demuestra que la capacidad biosintética de PQQ está ampliamente distribuida en linajes bacterianos relevantes del ecosistema intestinal.

Resalta el filo Bacillota debido a la proporción de especies identificadas con genes *pqq* (~20% del total), lo que sugiere que esta capacidad metabólica podría estar presente en cepas de bacterias dominantes de la microbiota. La presencia de genes *pqq* en plásmidos naturales, como el plásmido pSLA2-L empleado como referencia de enraizamiento, sugiere que la transferencia horizontal de estos genes entre distintos filos bacterianos es un fenómeno plausible. Estos hallazgos resultan particularmente relevantes considerando la alta abundancia relativa del filo Bacillota, así como la gran diversidad de Proteobacterias con genes *pqq* en la microbiota intestinal humana, lo que adquiere especial relevancia en el contexto de la microbiota intestinal, donde la dinámica genética y funcional puede influir en la distribución del potencial metabólico entre distintos miembros de la comunidad.

Por parte del enfoque experimental, el desarrollo y evaluación de una metodología original de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras fecales humanas permitió obtener ADN de calidad suficiente para la amplificación del gen ARNr 16S, confirmando su viabilidad para estudios exploratorios de microbiota intestinal. Asimismo, la amplificación preliminar de regiones asociadas a genes *pqq* mediante algunos de los oligonucleótidos diseñados sugiere que las regiones objetivo son accesibles experimentalmente; sin embargo, la ausencia de secuenciación de los amplicones limita la confirmación definitiva de su identidad.

En conjunto, los resultados de este trabajo respaldan la utilidad de los genes *pqq*, particularmente *pqqC* y *pqqCDE*, como marcadores de potencial metabólico en bacterias presuntamente asociadas a la microbiota intestinal humana.

ANEXOS

Consentimiento informado

Fecha: a ____ de _____ 20__

Estimado(a) Señor/Señora:

Se le invita a participar en el protocolo de investigación titulado “ Evaluación de la relación entre el bacterioma productor de PQQ, con el estado de salud y nutrición en población mexicana”; Si usted acepta participar en el estudio, se llevará el llenado correspondiente a su historia clínica, se pedirán sus datos personales, antecedentes heredofamiliares, antecedentes personales patológicos. Posteriormente se le aplicará una evaluación dietética que consistirá en obtener datos provenientes de frecuencia de consumo de alimentos, así como del recordatorio de 24 horas.

Toda la información que usted nos proporcione para este estudio será de carácter estrictamente confidencial; será utilizada únicamente por el equipo de investigación con fines de investigación de los proyectos mencionados u otros que deriven de los resultados en la misma línea de investigación y no estarán disponibles para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con una clave y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

Los riesgos potenciales que implica su participación en este estudio son mínimos de acuerdo con la categoría II del artículo 17 en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. Si alguna de las preguntas le hicieran sentir un poco incomodo(a), tiene el derecho de no responderla; la participación en el estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación de este en cualquier momento. Su decisión de participar o no participar no afectara de ninguna marea la forma en como le son otorgados los servicios por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Si usted tiene preguntas generales relacionadas con sus derechos como participante de un estudio de investigación, puede comunicarse con la presidente del Comité de Ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a la siguiente dirección de correo electrónico comite.etica@correo.buap.mx Acepto participar en el presente estudio:

Nombre completo y firma

α -proteobacteria

Tabla suplementaria 1. Clasificación taxonómica de las especies pertenecientes a la clase α -proteobacteria, incluidas en el estudio. En rojo, Acetobacterales; en azul, Hyphomicrobiales; en verde, Rhodobacterales.

Orden	Familia	Género	Especie
Acetobacterales	Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i>	<i>tropicalis</i>
		<i>Granulibacter</i>	<i>bethesdensis</i>
	Roseomonadaceae	<i>Roseomonas</i>	<i>genomospecies</i>
Hyphomicrobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>mesophilicum</i>
			<i>populi</i>
			<i>radiotolerans</i>
		<i>Methylobacterium</i>	<i>populi</i>
	Nitrobacteraceae	<i>Microvirga</i>	<i>massiliensis</i>
		<i>Afipia</i>	<i>clevelandensis</i>
		<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>
			<i>japonicum</i>
Rhodobacterales	Paracoccaceae	<i>Paracoccus</i>	<i>sanguinis</i>
			<i>yeei</i>

Figura suplementaria 1. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase α -proteobacteria, incluidas en el estudio. En rojo, Acetobacterales; en azul, Hyphomicrobiales; en verde, Rhodobacterales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

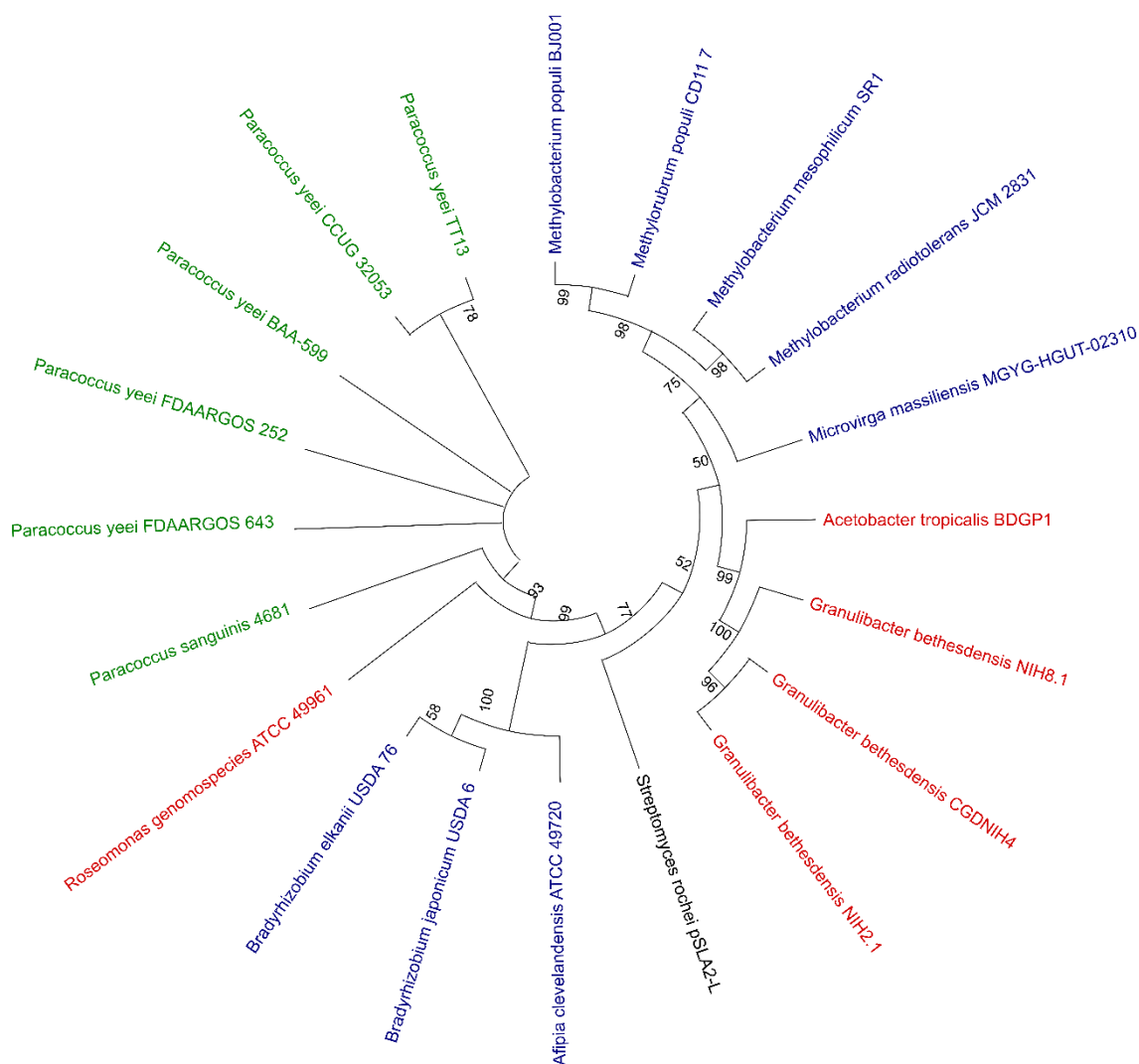


Figura suplementaria 2. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase α -proteobacteria, incluidas en el estudio. En rojo, Acetobacterales; en azul, Hyphomicrobiales; en verde, Rhodobacterales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

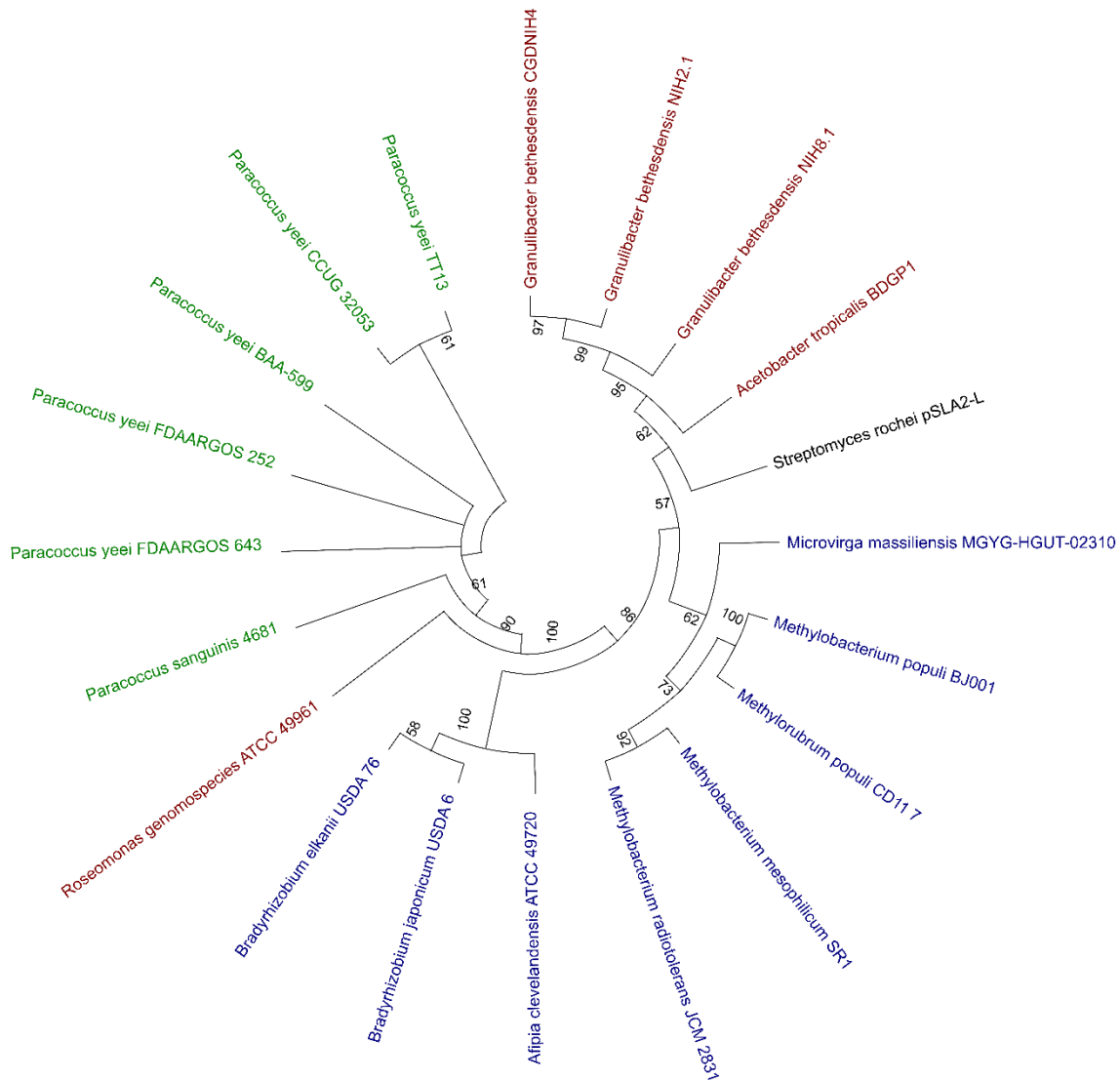


Figura suplementaria 3. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase α -proteobacteria, incluidas en el estudio. En rojo, Acetobacterales; en azul, Hyphomicrobiales; en verde, Rhodobacterales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

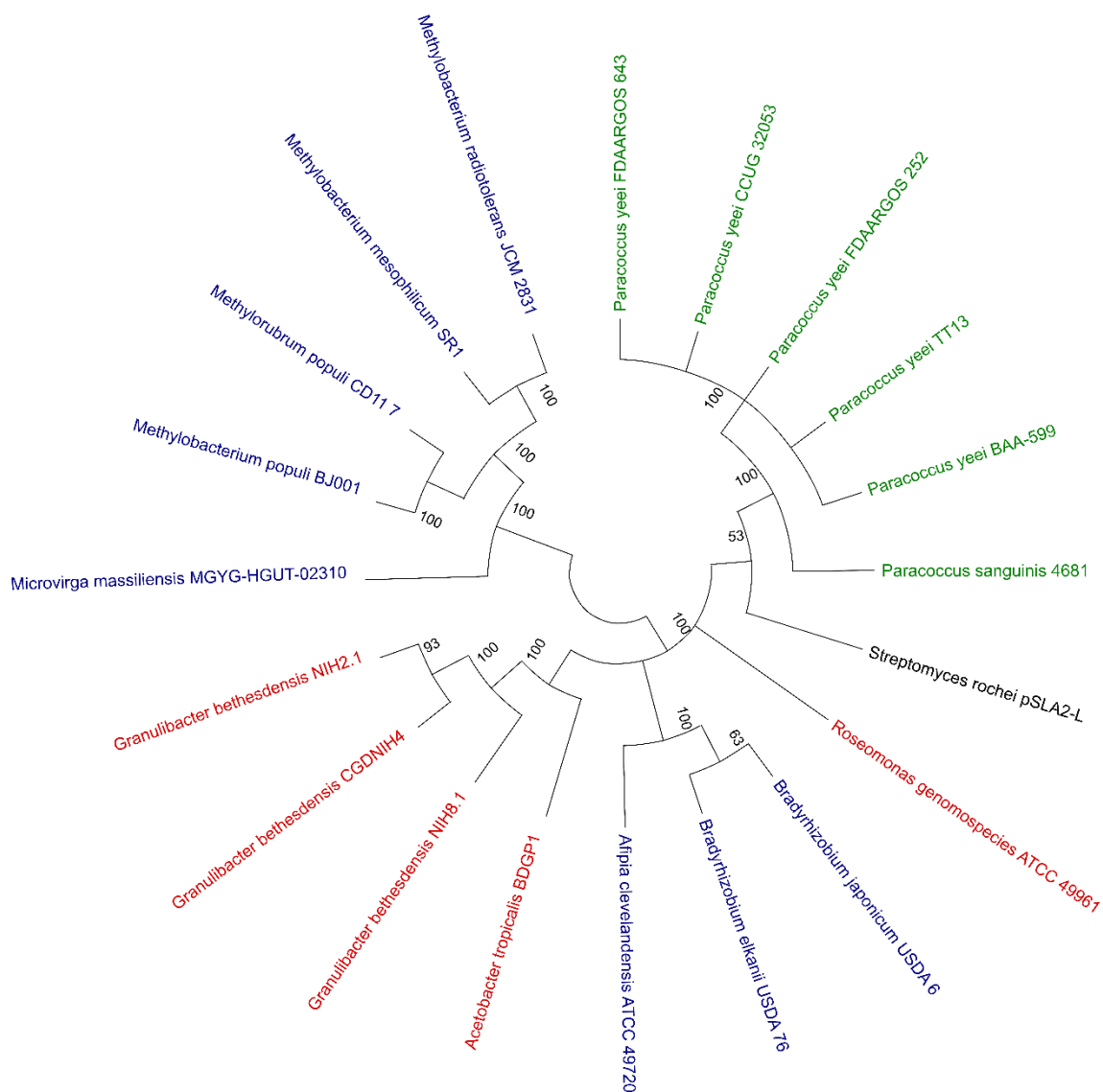


Figura suplementaria 4. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase α -proteobacteria, incluidas en el estudio. En rojo, Acetobacterales; en azul, Hyphomicrobiales; en verde, Rhodobacterales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

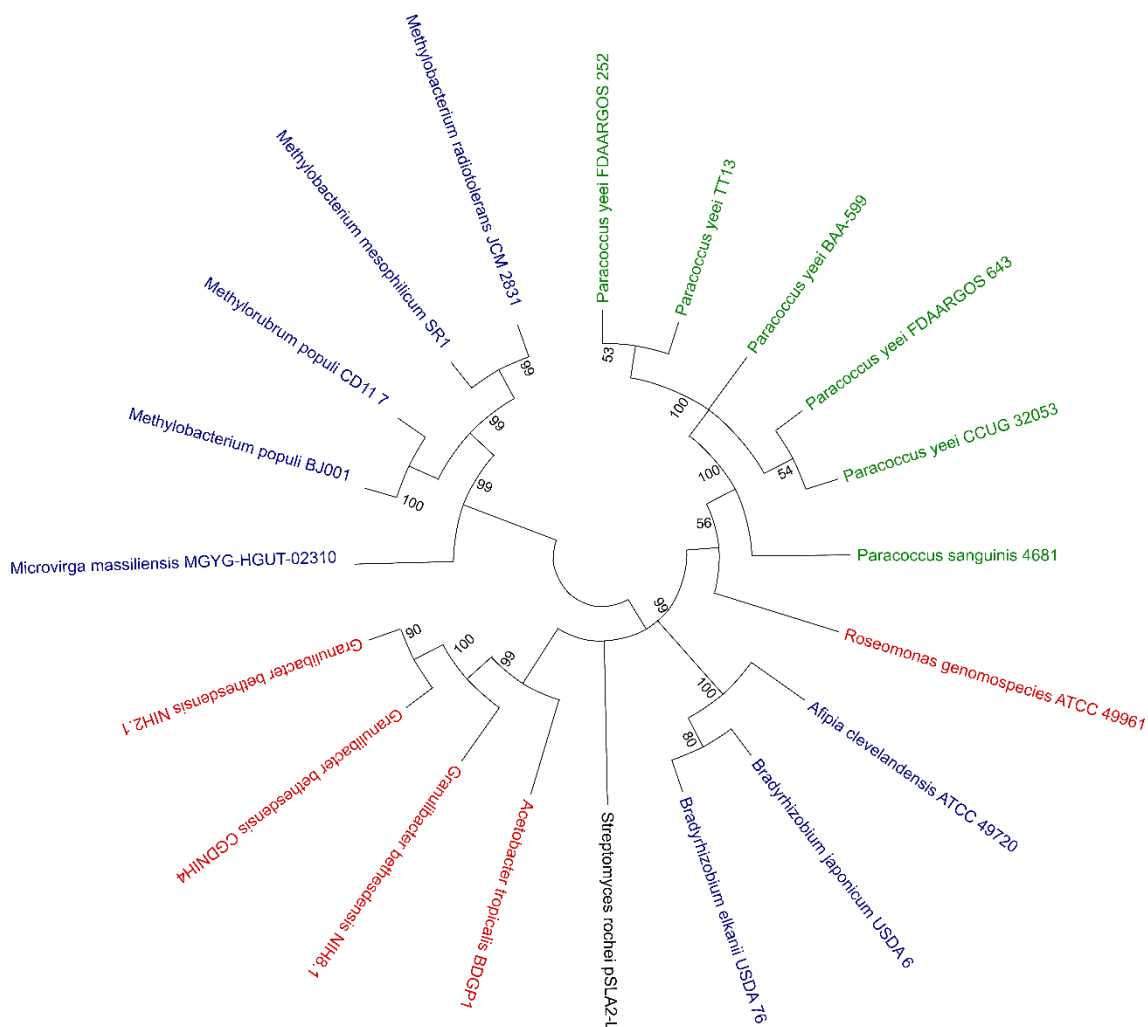
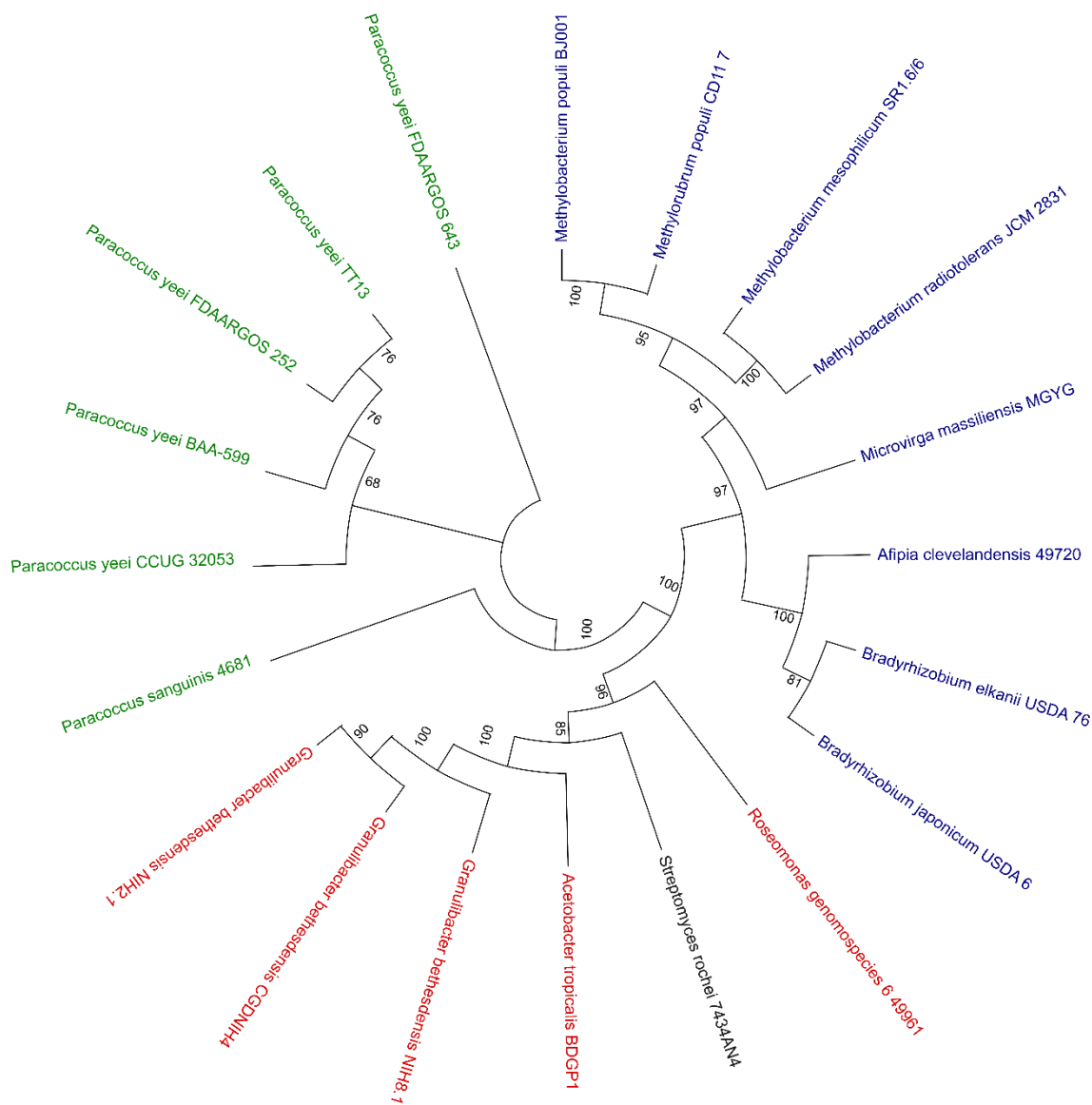


Figura suplementaria 5. Árbol filogenético del gen ARNr 16S, en especies pertenecientes a la clase α -proteobacteria, incluidas en el estudio. En rojo, Acetobacterales; en azul, Hyphomicrobiales; en verde, Rhodobacterales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.



β-proteobacteria

Tabla suplementaria 2. Clasificación taxonómica de las especies pertenecientes a la clase β-proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, Burkholderiales; en verde, Neisseriales; en rojo, Nitrosomonadales; en azul, Rhodocyclales.

Orden	Familia	Género	Especie
Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Advenella</i>	<i>kashmirensis</i>
		<i>Derxia</i>	<i>gummosa</i>
	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>ambifaria</i>
			<i>arboris</i>
			<i>cepacia</i>
			<i>gladioli</i>
			<i>glumae</i>
			<i>plantarii</i>
			<i>pyrocinia</i>
			<i>reimsis</i>
			<i>stabilis</i>
			<i>territorii</i>
			<i>ubonensis</i>
		<i>Cupriavidus</i>	<i>necator</i>
		<i>Limnobacter</i>	<i>thiooxidans</i>
		<i>Pandoraea</i>	<i>terrae</i>
		<i>Pelomonas</i>	<i>thiooxydans</i>
			<i>aquatica</i>
			<i>chuxiongensis</i>
			<i>insidiosa</i>
			<i>mannitolilytica</i>
			<i>pickettii</i>
		<i>Ralstonia</i>	<i>wenshanensis</i>
	Comamonadaceae	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>aromaticivorans</i>
			<i>crassostreae</i>
			<i>crocea</i>
			<i>pseudoflava</i>
			<i>taeniospiralis</i>
		<i>Lampropedia</i>	<i>cohaerens</i>
		<i>Melaminivora</i>	<i>jejuensis</i>
			<i>suipulveris</i>
			<i>cellulosilyticus</i>
		<i>Ramlibacter</i>	<i>henchirensis</i>
			<i>monticola</i>
			<i>beijingensis</i>
		<i>Variovorax</i>	<i>boronicumulans</i>
			<i>gossypii</i>
			<i>guangxiensis</i>
			<i>paradoxus</i>
	Oxalobacteraceae	<i>Glaciimonas</i>	<i>immobilis</i>
		<i>Massilia</i>	<i>aurea</i>
			<i>psychrophila</i>
	Sphaerotilaceae	<i>Azohydromonas</i>	<i>caseinilytica</i>
		<i>Ideonella</i>	<i>dechloratans</i>
		<i>Rubrivivax</i>	<i>gelatinosus</i>

		<i>Sphaerotilus</i>	<i>hippei</i>
			<i>montanus</i>
			<i>natans</i>
Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Vitreoscilla</i>	<i>filiformis</i>
Nitrosomonadales	Methylophilaceae	<i>Methylobacillus</i>	<i>flagellatus</i>
			<i>rhizosphaerae</i>
	Sterolibacteriaceae	<i>Methylotenera</i>	<i>mobilis</i>
			<i>versatilis</i>
		<i>Methyloversatilis</i>	<i>universalis</i>
Rhodocyclales	Thiobacillaceae	<i>Thiobacillus</i>	<i>denitrificans</i>
	Rhodocyclaceae	<i>Aromatoleum</i>	<i>tolulyticum</i>
	Zoogloeaceae	<i>Thauera</i>	<i>humireducens</i>
			<i>linaloolentis</i>
			<i>propionica</i>
		<i>Zoogloea</i>	<i>oleivorans</i>
			<i>ramigera</i>

Figura suplementaria 6. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase β -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, Burkholderiales; en verde, Neisseriales; en rojo, Nitrosomonadales; en azul, Rhodocyclales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

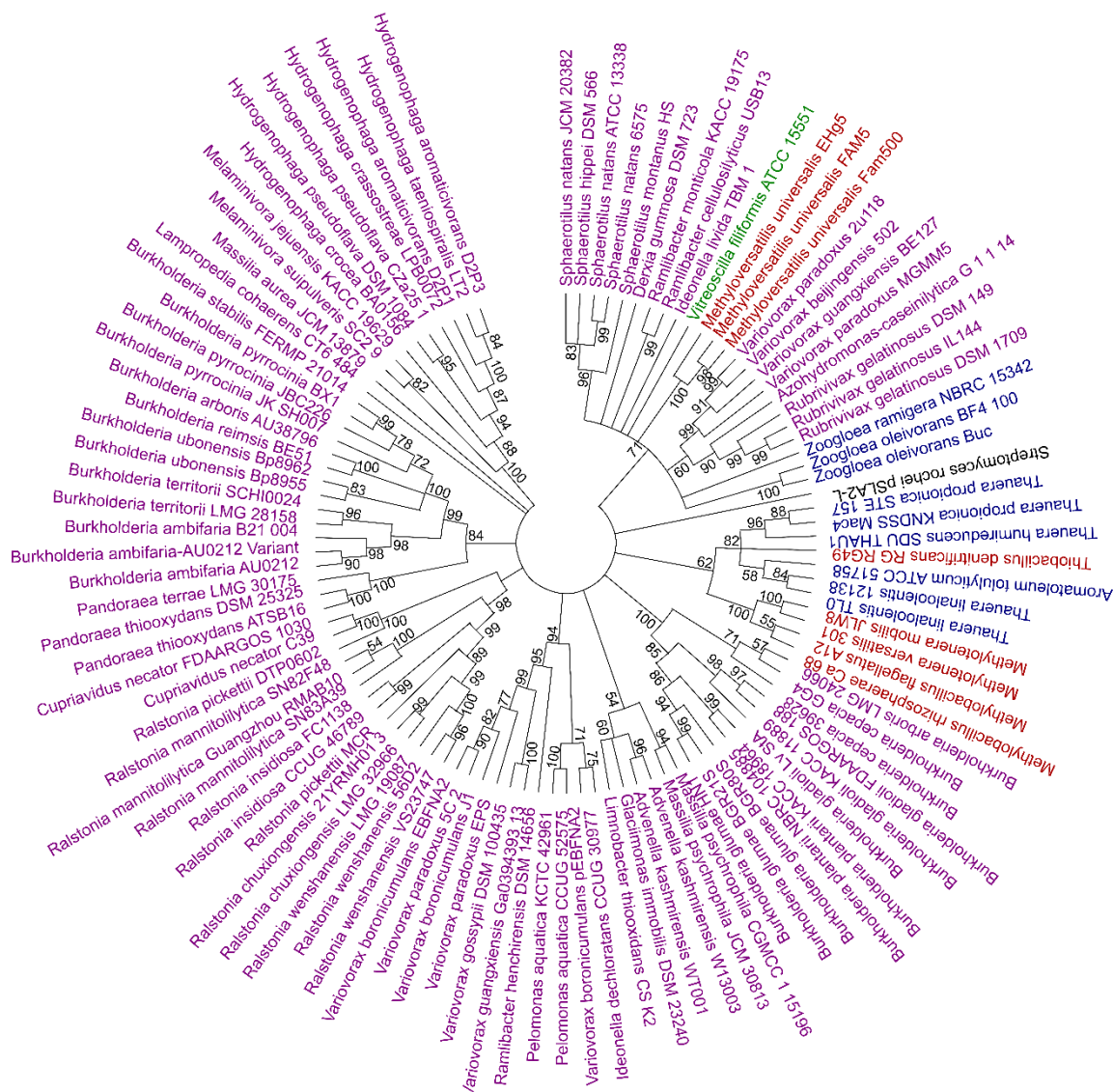


Figura suplementaria 7. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase β -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, Burkholderiales; en verde, Neisseriales; en rojo, Nitrosomonadales; en azul, Rhodocyclales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

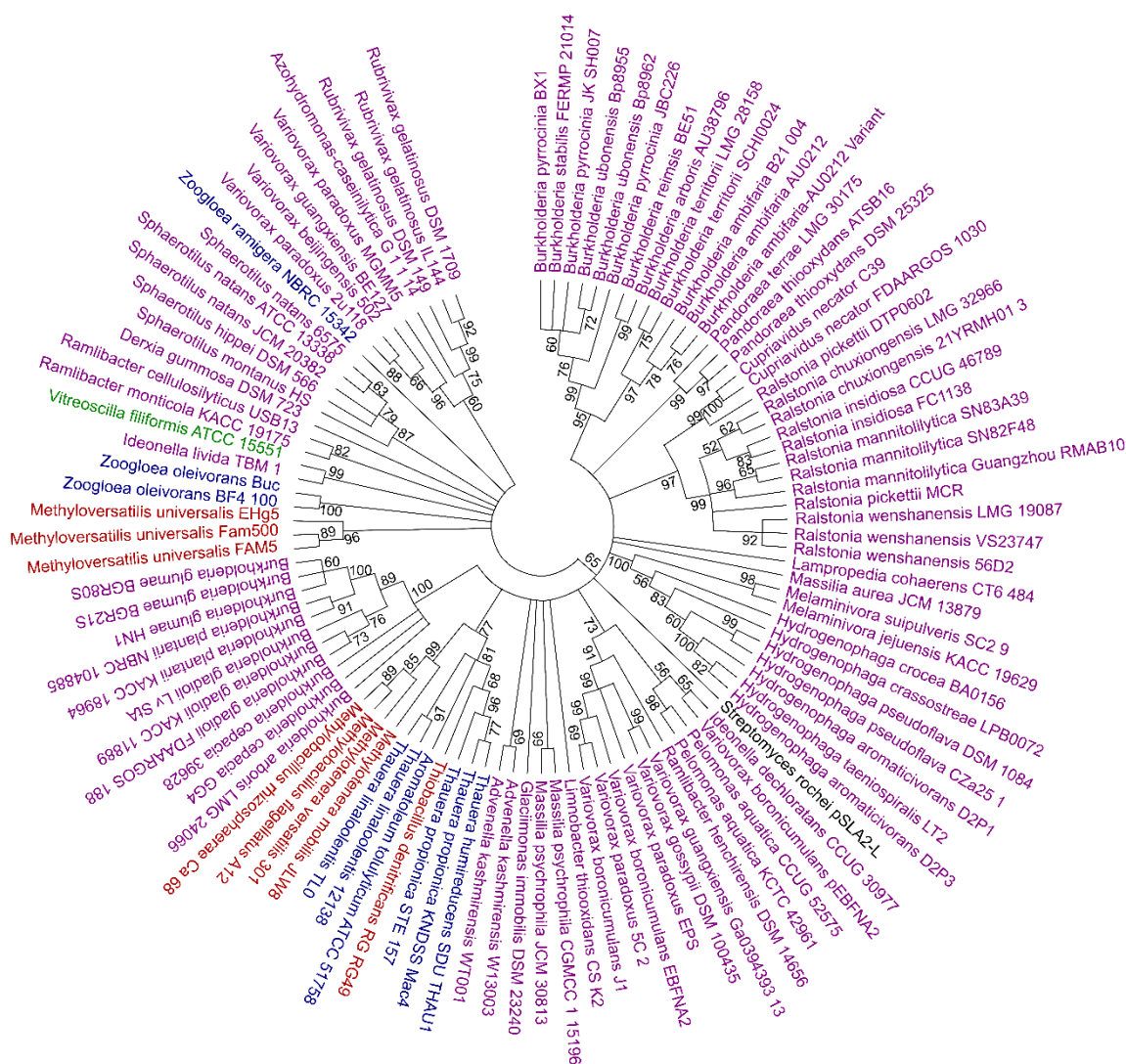


Figura suplementaria 8. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase β -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, Burkholderiales; en verde, Neisseriales; en rojo, Nitrosomonadales; en azul, Rhodocyclales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

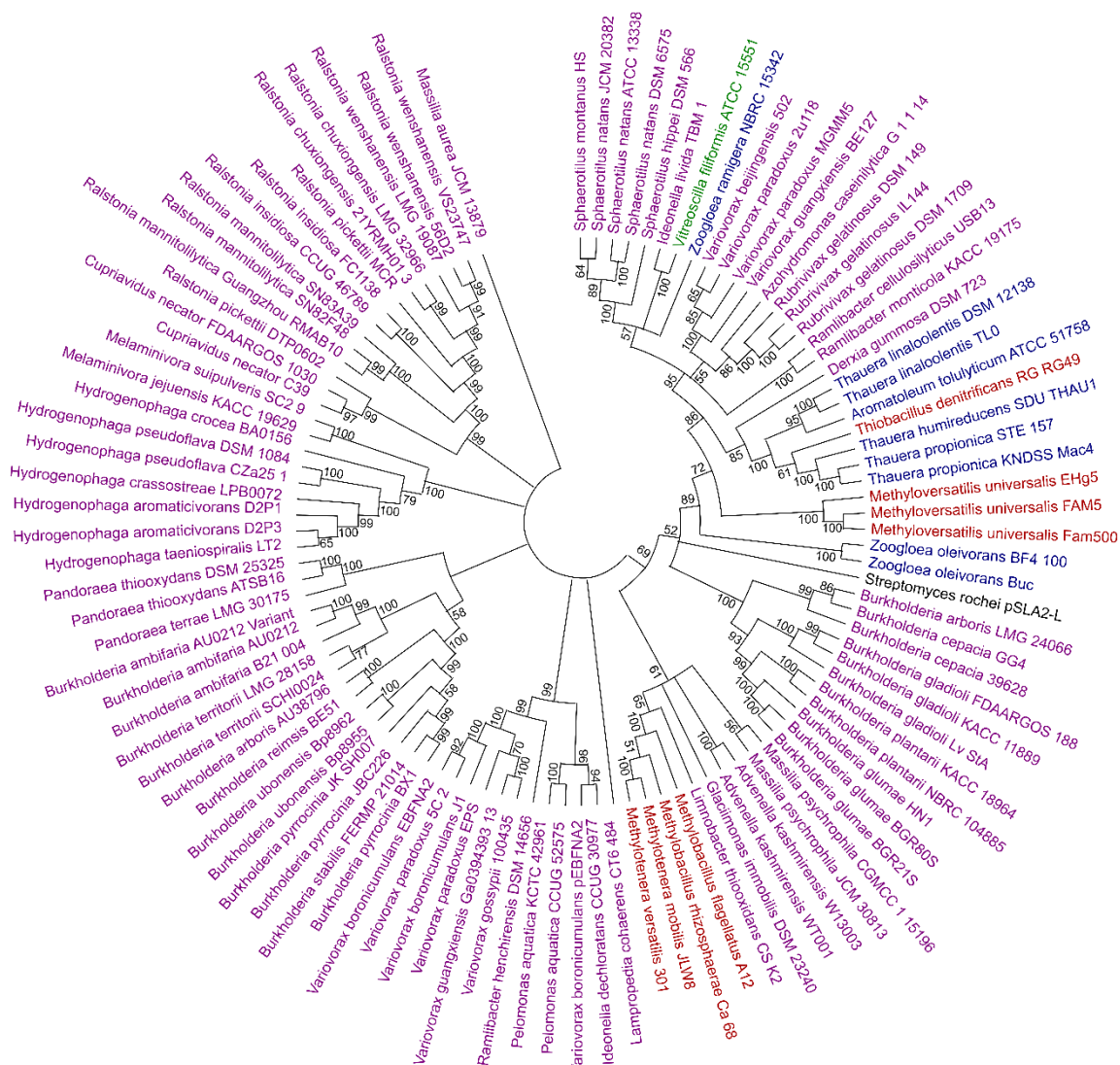


Figura suplementaria 9. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase β -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, Burkholderiales; en verde, Neisseriales; en rojo, Nitrosomonadales; en azul, Rhodocyclales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

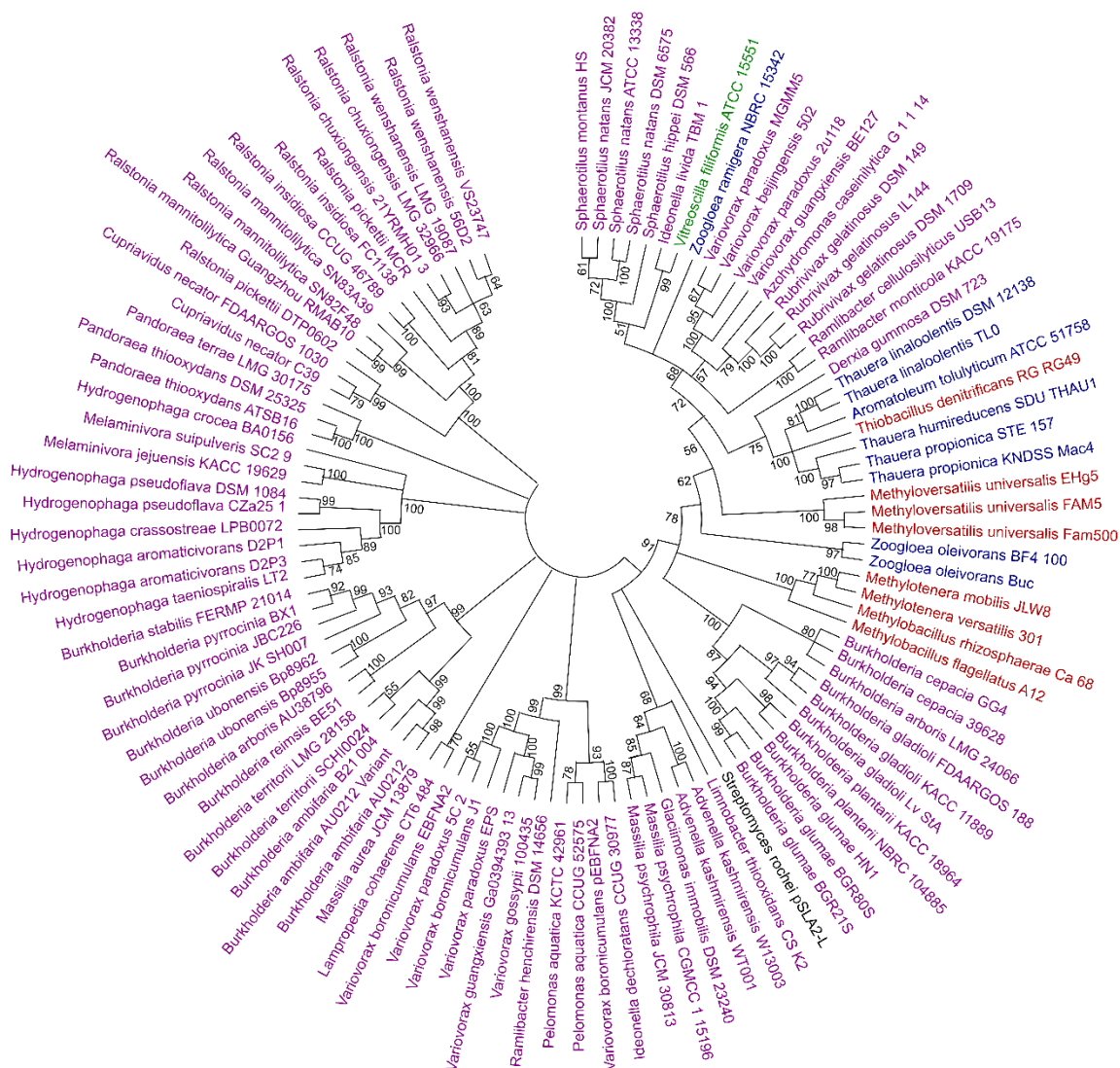
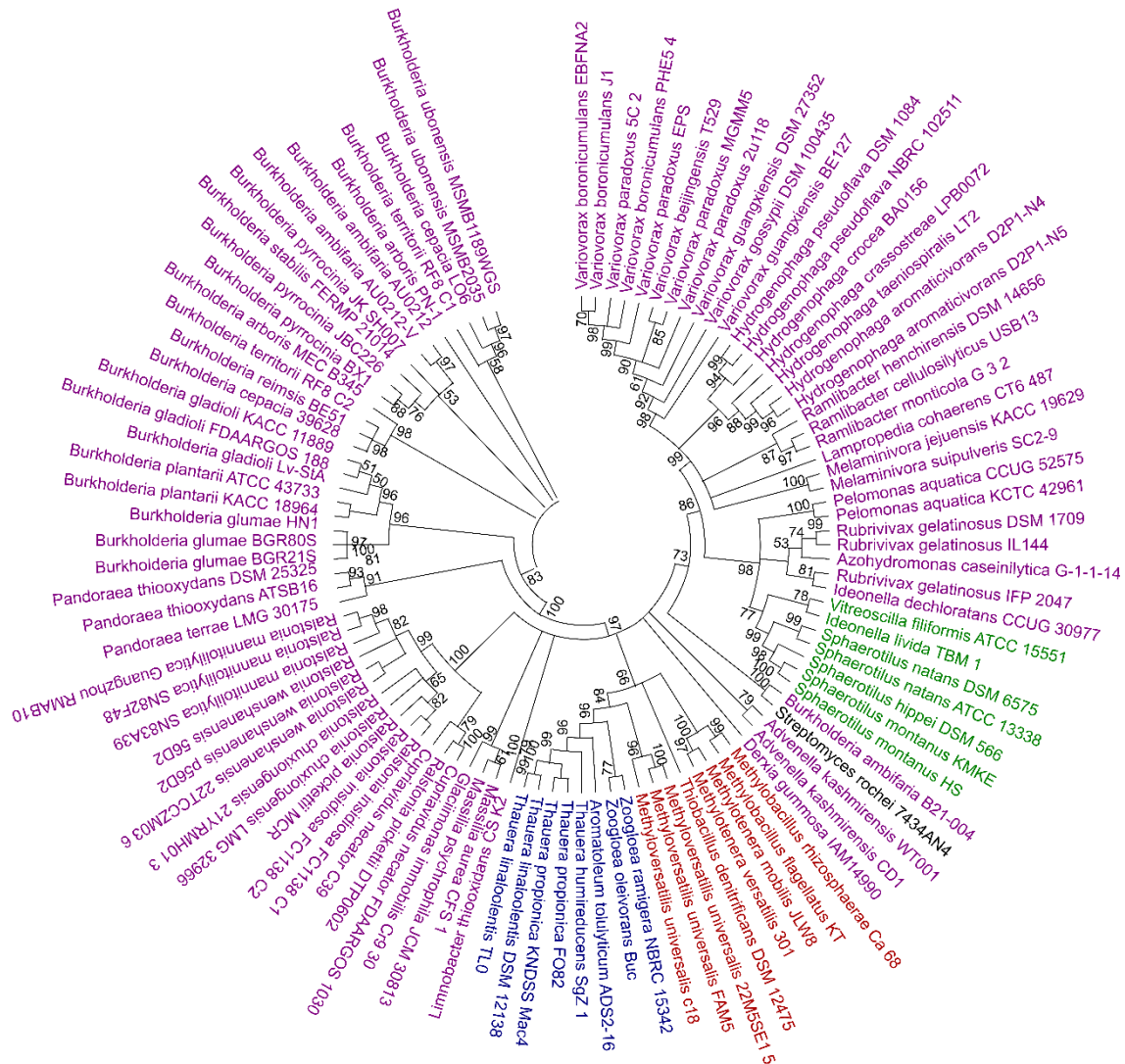


Figura suplementaria 10. Árbol filogenético del gen ARNr 16S en β -proteobacterias. En morado, Burkholderiales; en verde, Neisseriales; en rojo, Nitrosomonadales; en azul, Rhodocyclales; en negro, enraizamiento.

Árbol filogenético del gen ARNr 16S, en especies pertenecientes a la clase β -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, Burkholderiales; en verde, Neisseriales; en rojo, Nitrosomonadales; en azul, Rhodocyclales; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.



δ-proteobacteria

Tabla suplementaria 3. Clasificación taxonómica de las especies pertenecientes a la clase δ-proteobacteria, incluidas en el estudio.

Orden	Familia	Género	Especie
Bradymonadales	Bradymonadaceae	<i>Persicimonas</i>	<i>caeni</i>

ε-proteobacteria

Tabla suplementaria 4. ε-proteobacterias incluidas en el estudio. En morado, *Arcobacter*; en verde, *Halarcobacter*; en rojo, *Malaciobacter*; en azul, *Poseidonibacter*.

Orden	Familia	Género	Especie
Campylobacterales	Arcobacteraceae	<i>Arcobacter</i>	<i>acticola</i>
			<i>cloacae</i>
			<i>nitrofigilis</i>
			<i>peruensis</i>
			<i>venerupis</i>
		<i>Halarcobacter</i>	<i>mediterraneus</i>
		<i>Malaciobacter</i>	<i>pacificus</i>
		<i>Poseidonibacter</i>	<i>antarcticus</i>
			<i>lekithochrous</i>
			<i>parvus</i>

Figura suplementaria 11. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase ϵ -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, *Arcobacter*; en verde, *Halarcobacter*; en rojo, *Malaciobacter*; en azul, *Poseidonibacter*; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

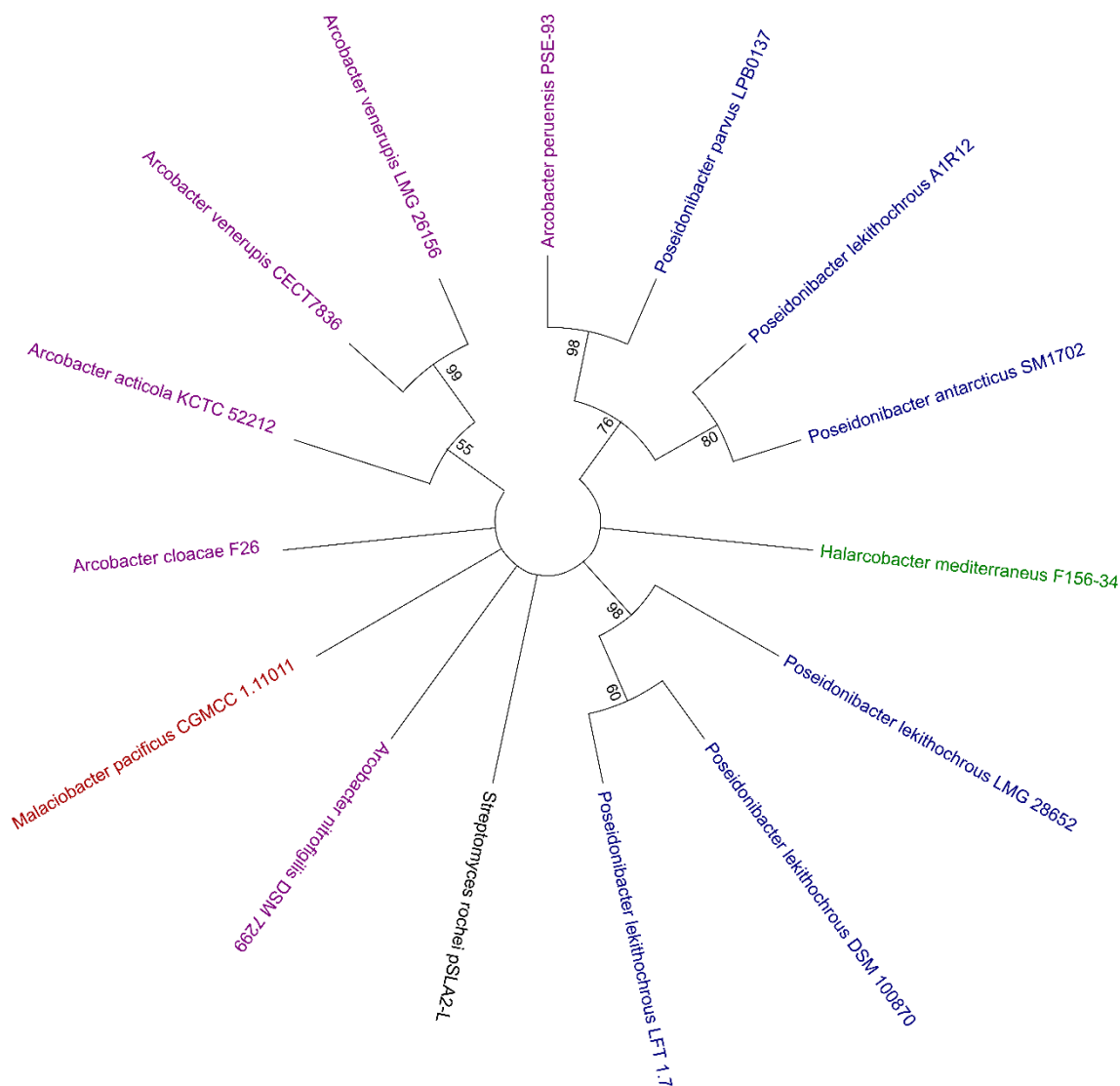


Figura suplementaria 12. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase ϵ -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, *Arcobacter*; en verde, *Halarcobacter*; en rojo, *Malaciobacter*; en azul, *Poseidonibacter*; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

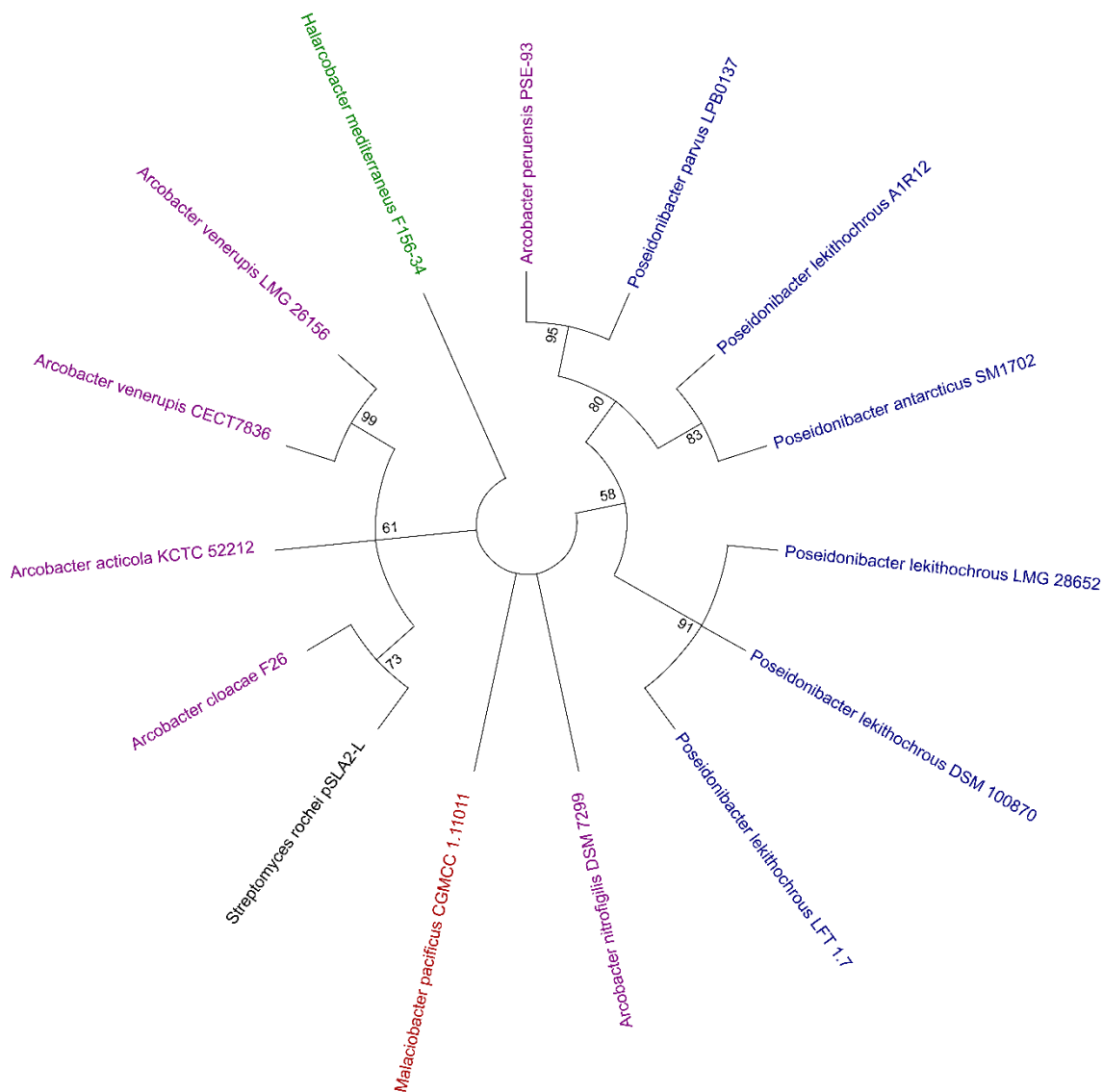


Figura suplementaria 13. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase ϵ -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, *Arcobacter*; en verde, *Halarcobacter*; en rojo, *Malaciobacter*; en azul, *Poseidonibacter*; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

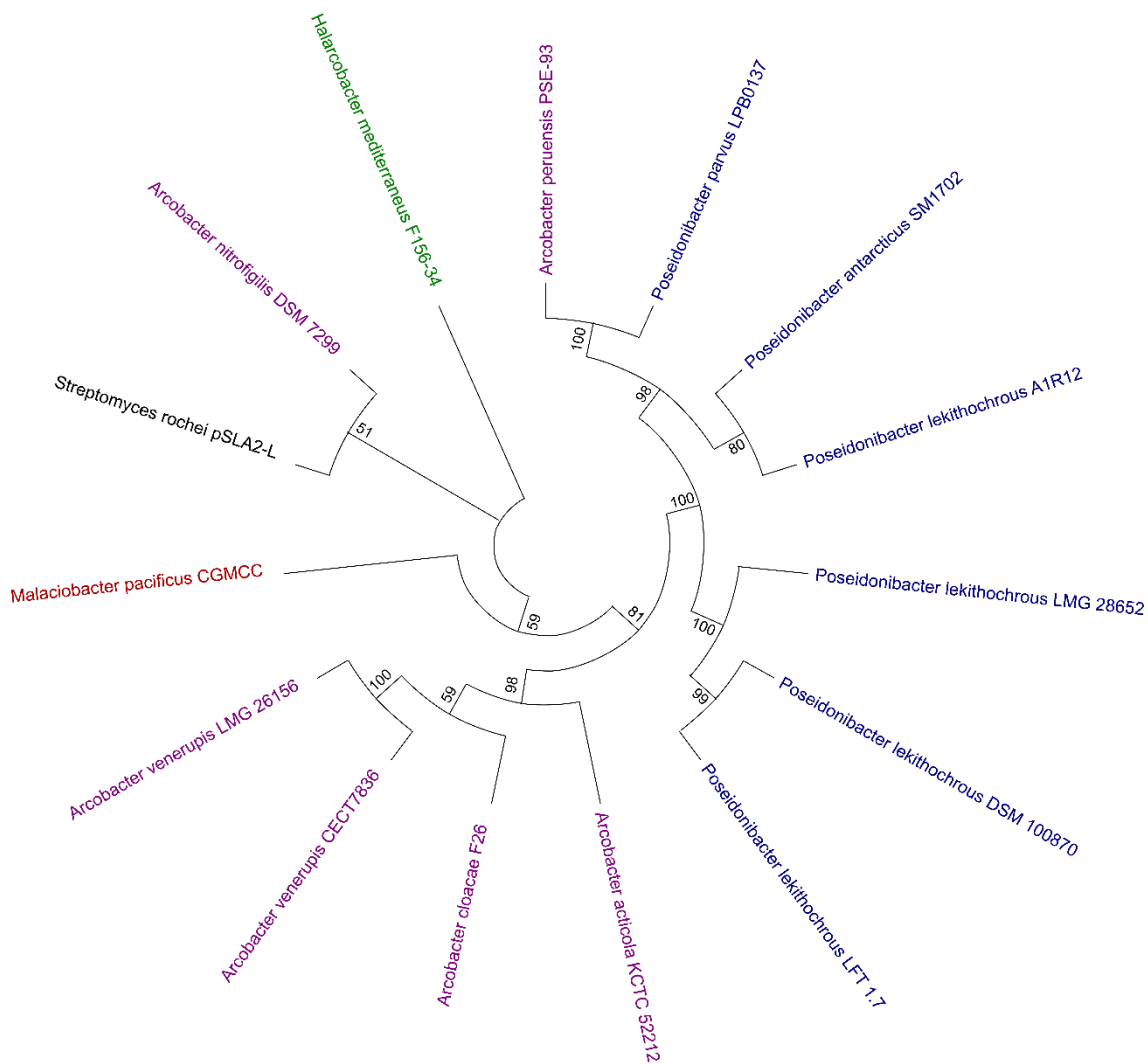


Figura suplementaria 14. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes a la clase ϵ -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, *Arcobacter*; en verde, *Halarcobacter*; en rojo, *Malaciobacter*; en azul, *Poseidonibacter*; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

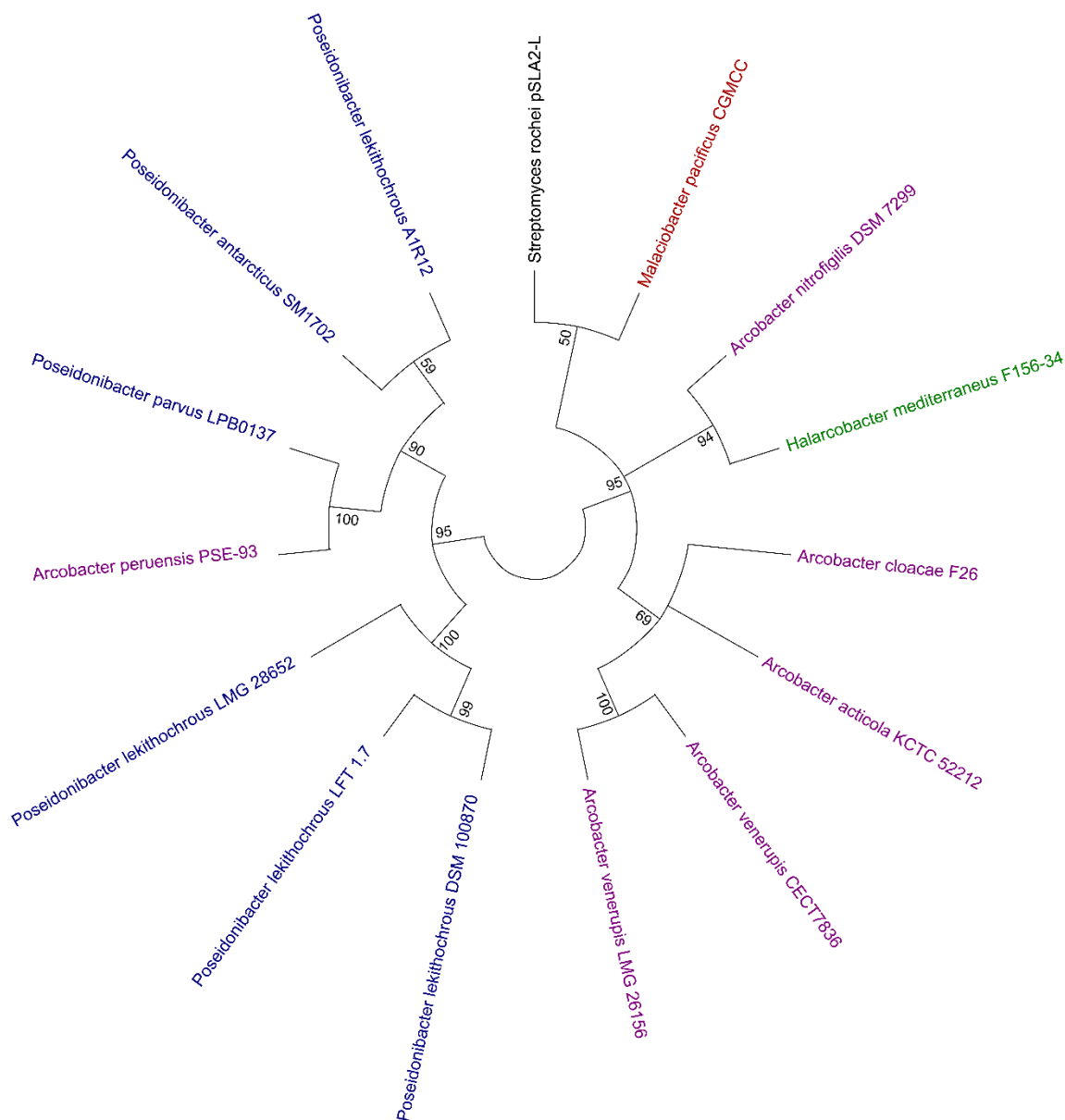
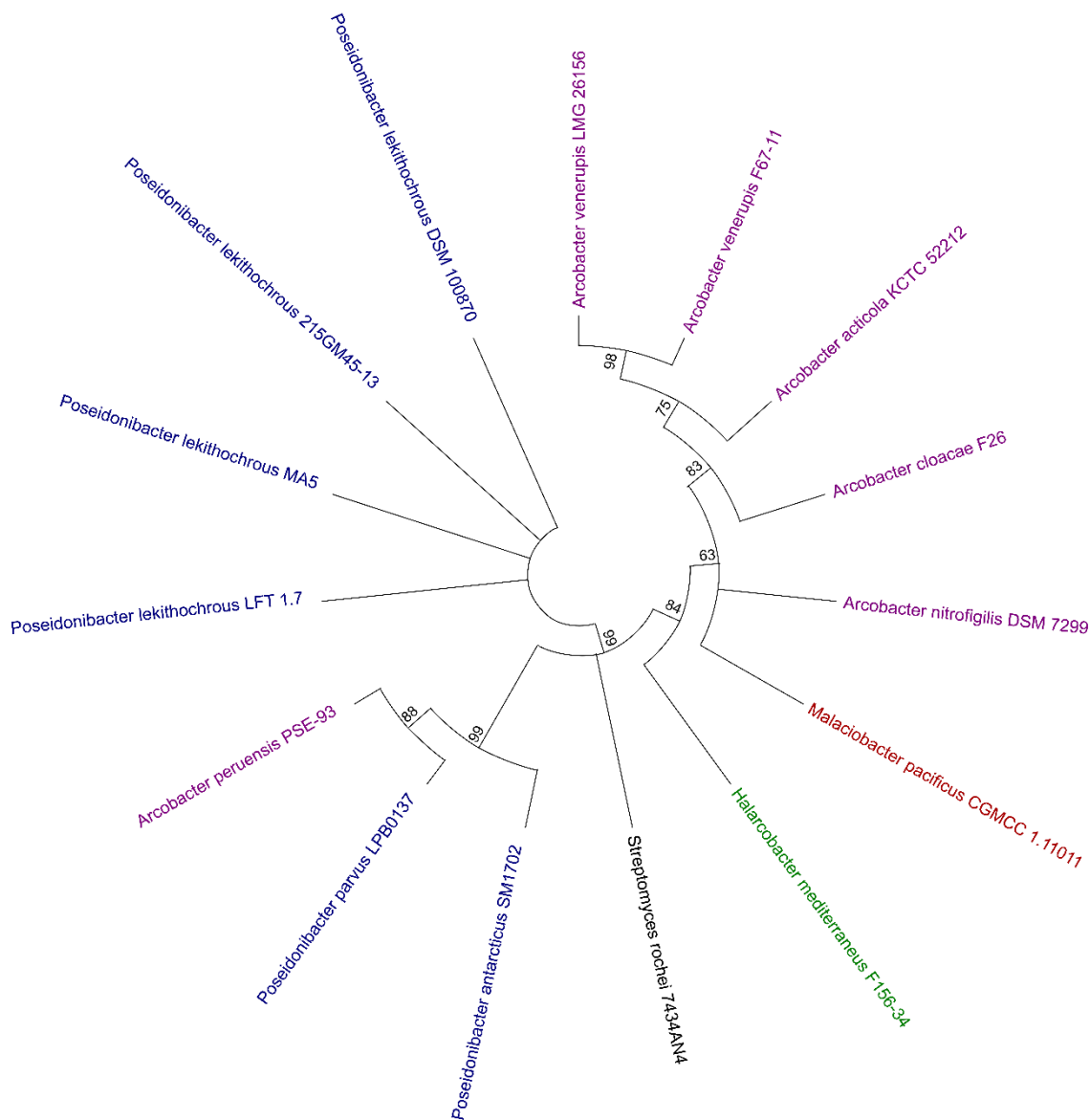


Figura suplementaria 15. Árbol filogenético del gen ARNr 16S, en especies pertenecientes a la clase ϵ -proteobacteria, incluidas en el estudio. En morado, *Arcobacter*; en verde, *Halarcobacter*; en rojo, *Malaciobacter*; en azul, *Poseidonibacter*; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.



Bacillota

Tabla suplementaria 5. Clasificación taxonómica de las especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae.

Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>salipaludis</i>
				<i>timonensis</i>
			<i>Heyndrickxia</i>	<i>camelliae</i>
				<i>sporothermodurans</i>
				<i>vini</i>
			<i>Neobacillus</i>	<i>bataviensis</i>
				<i>drentensis</i>
			<i>Priestia</i>	<i>megaterium</i>
		Paenibacillaceae	<i>Cohnella</i>	<i>colombiensis</i>
				<i>endophytica</i>
				<i>herbarum</i>
				<i>lubricantis</i>
				<i>phaseoli</i>
				<i>pontilimi</i>
				<i>xylanilytica</i>
			<i>Paenibacillus</i>	<i>albilobatus</i>
				<i>elgii</i>
				<i>piri</i>
				<i>rhizovicinus</i>
				<i>thalictri</i>

Figura suplementaria 16. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

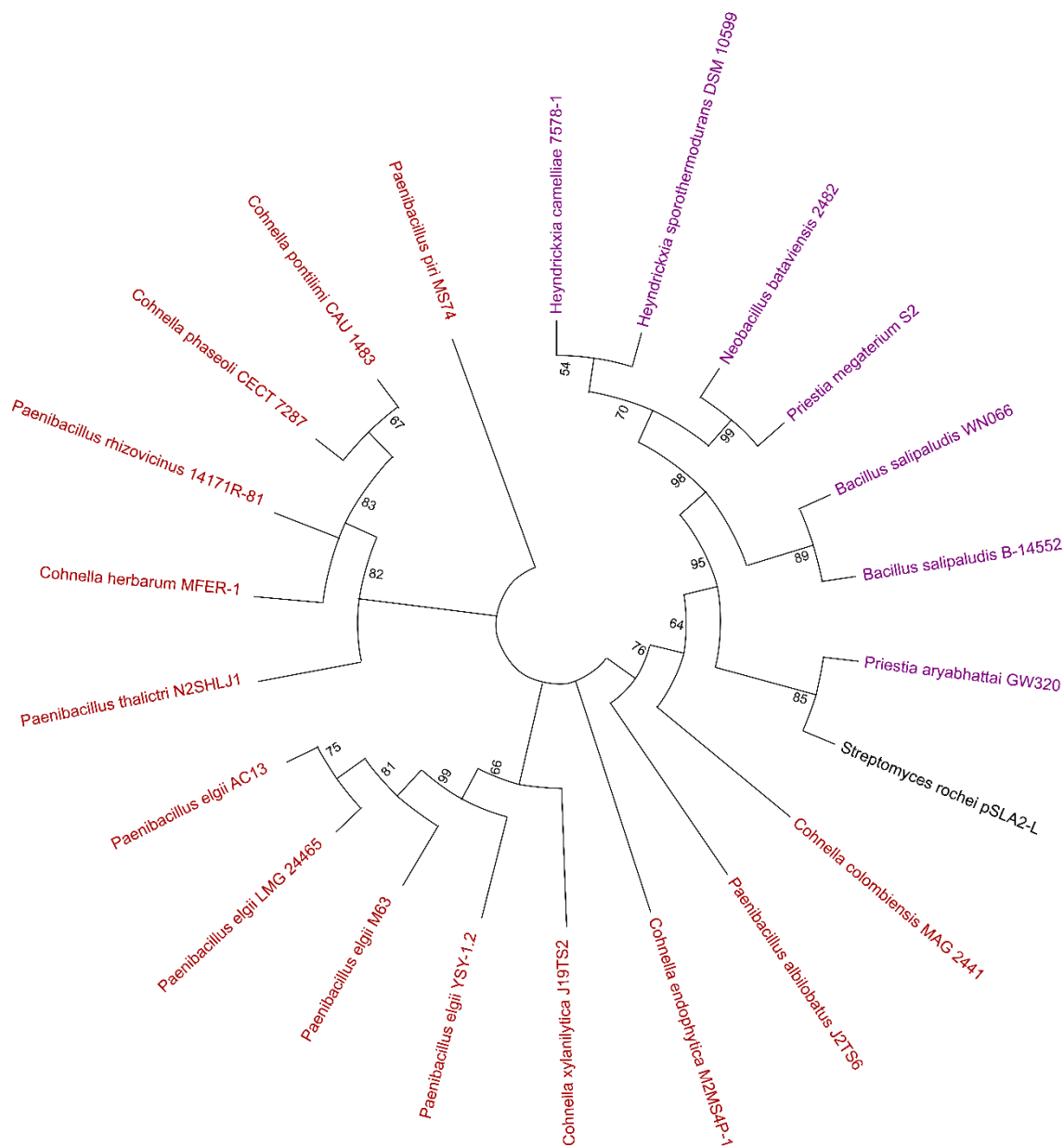


Figura suplementaria 17. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

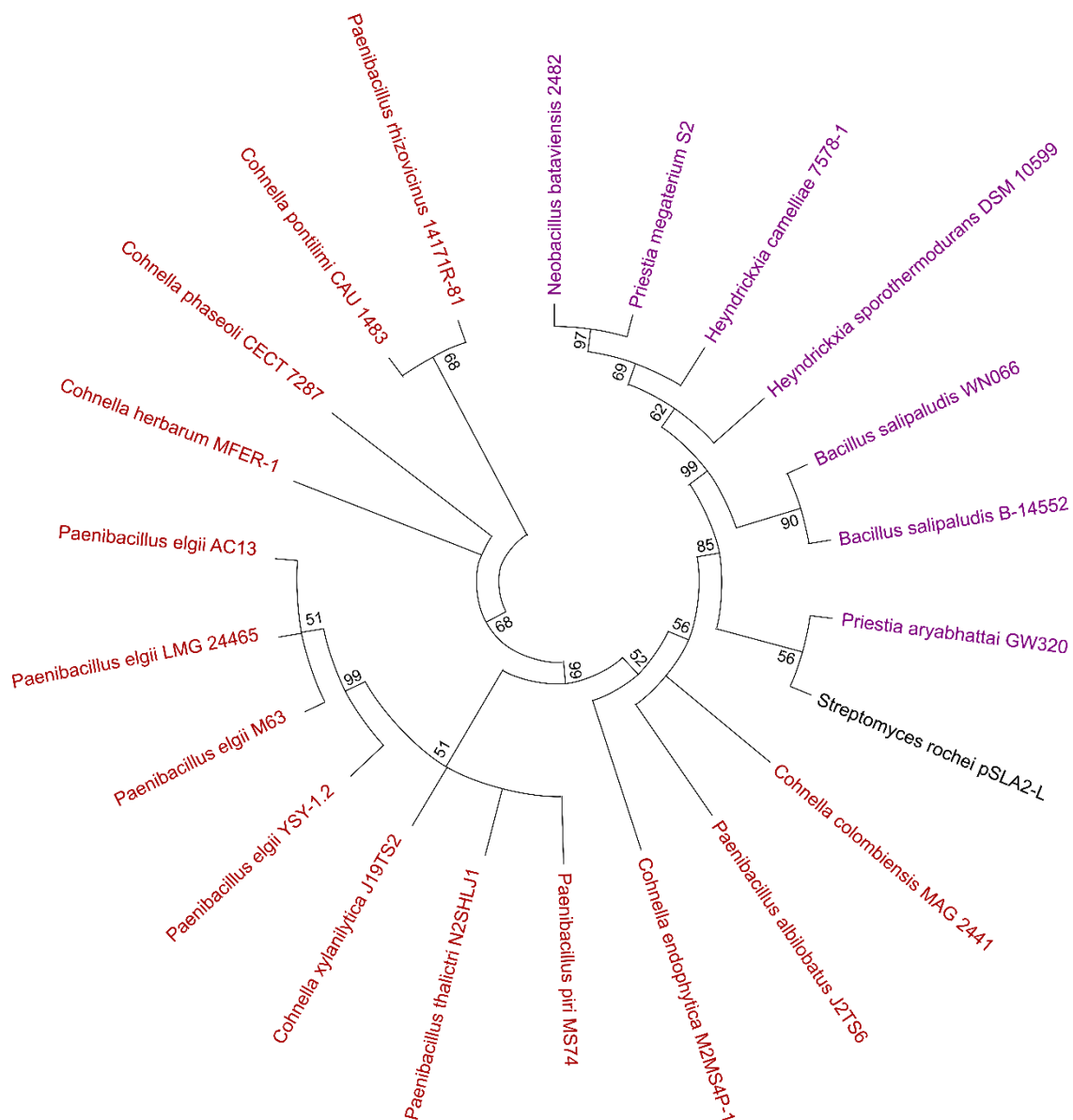


Figura suplementaria 18. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

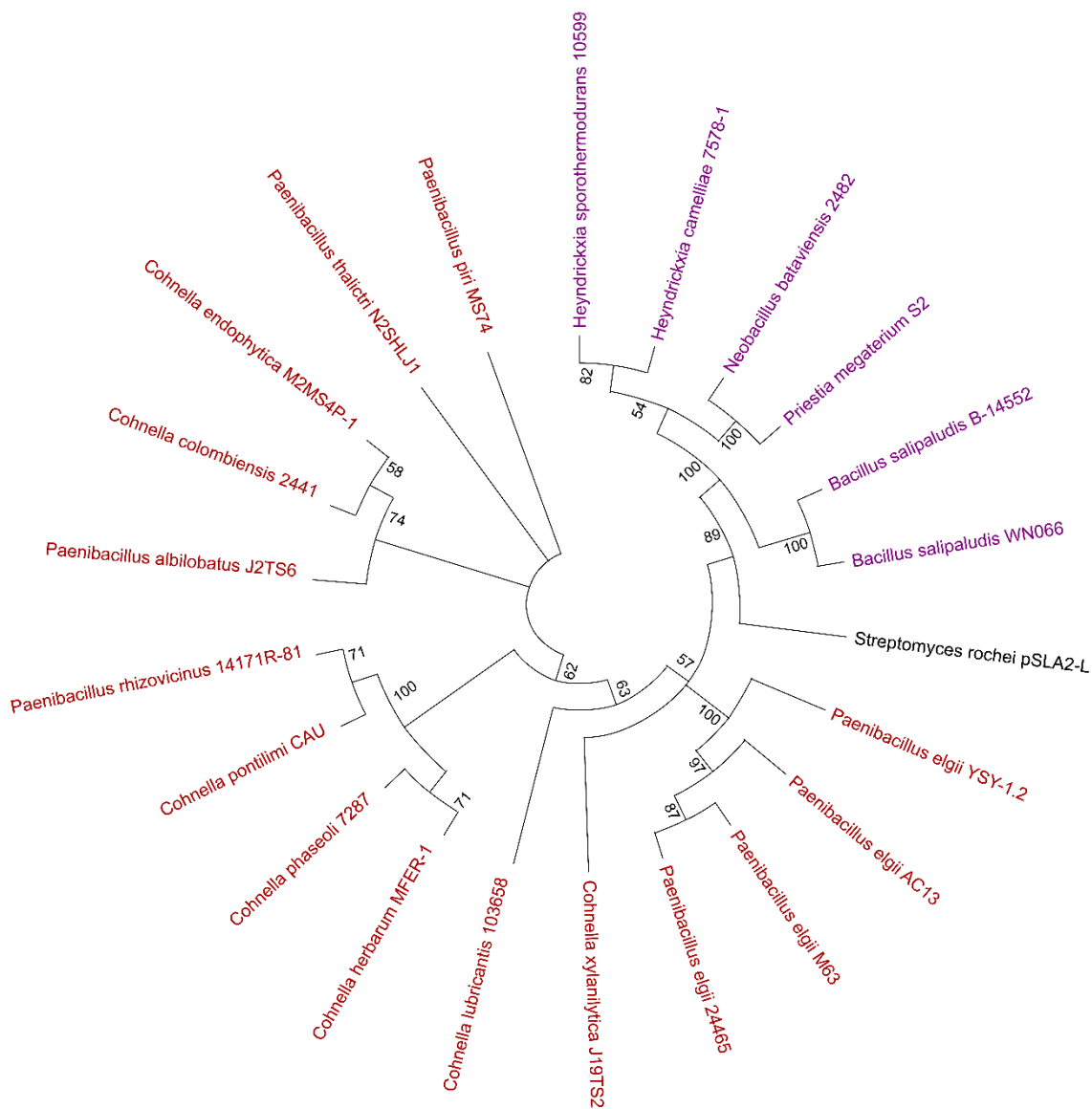


Figura suplementaria 19. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

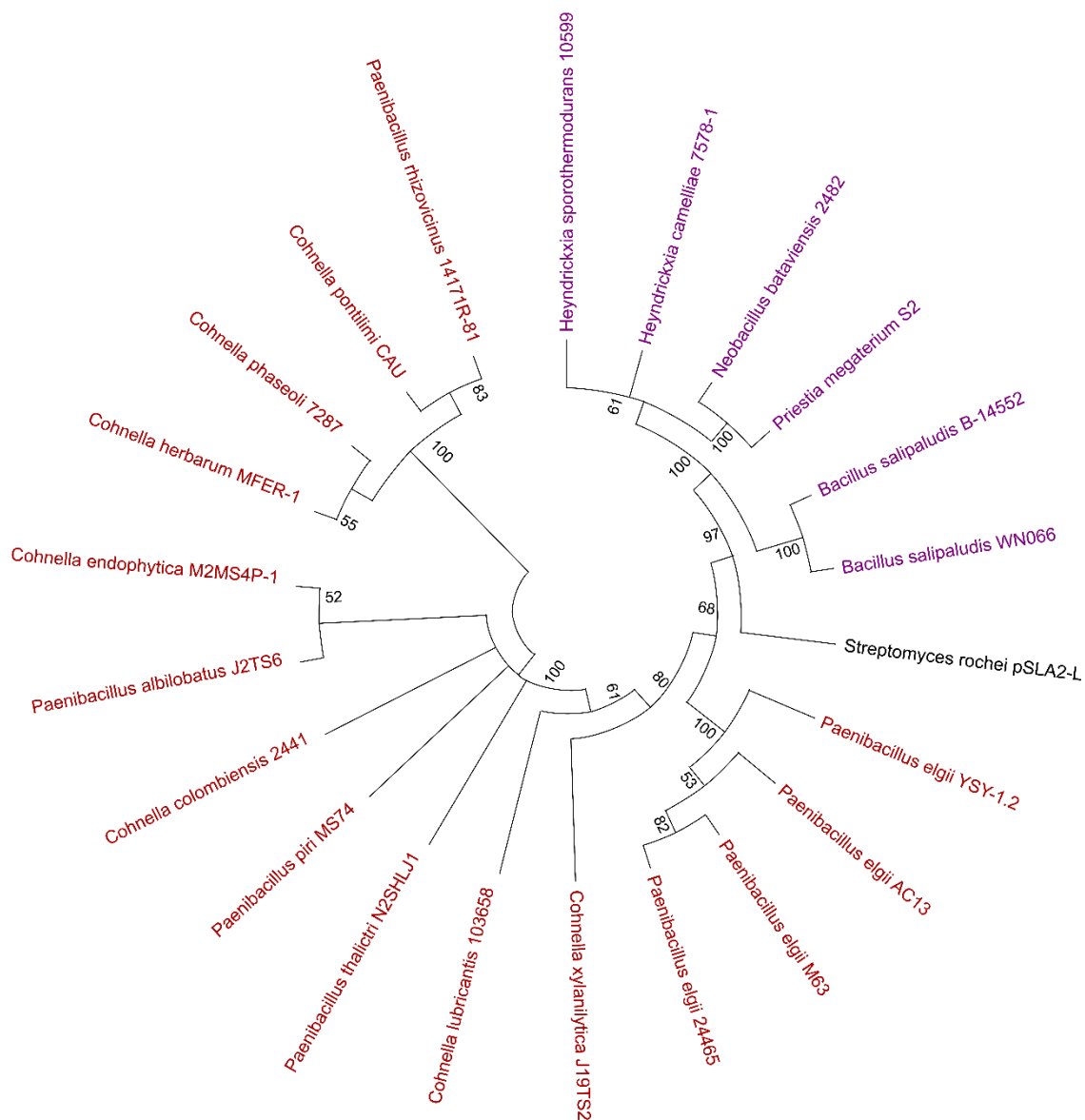


Figura suplementaria 20. Árbol filogenético del gen *pqqBCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

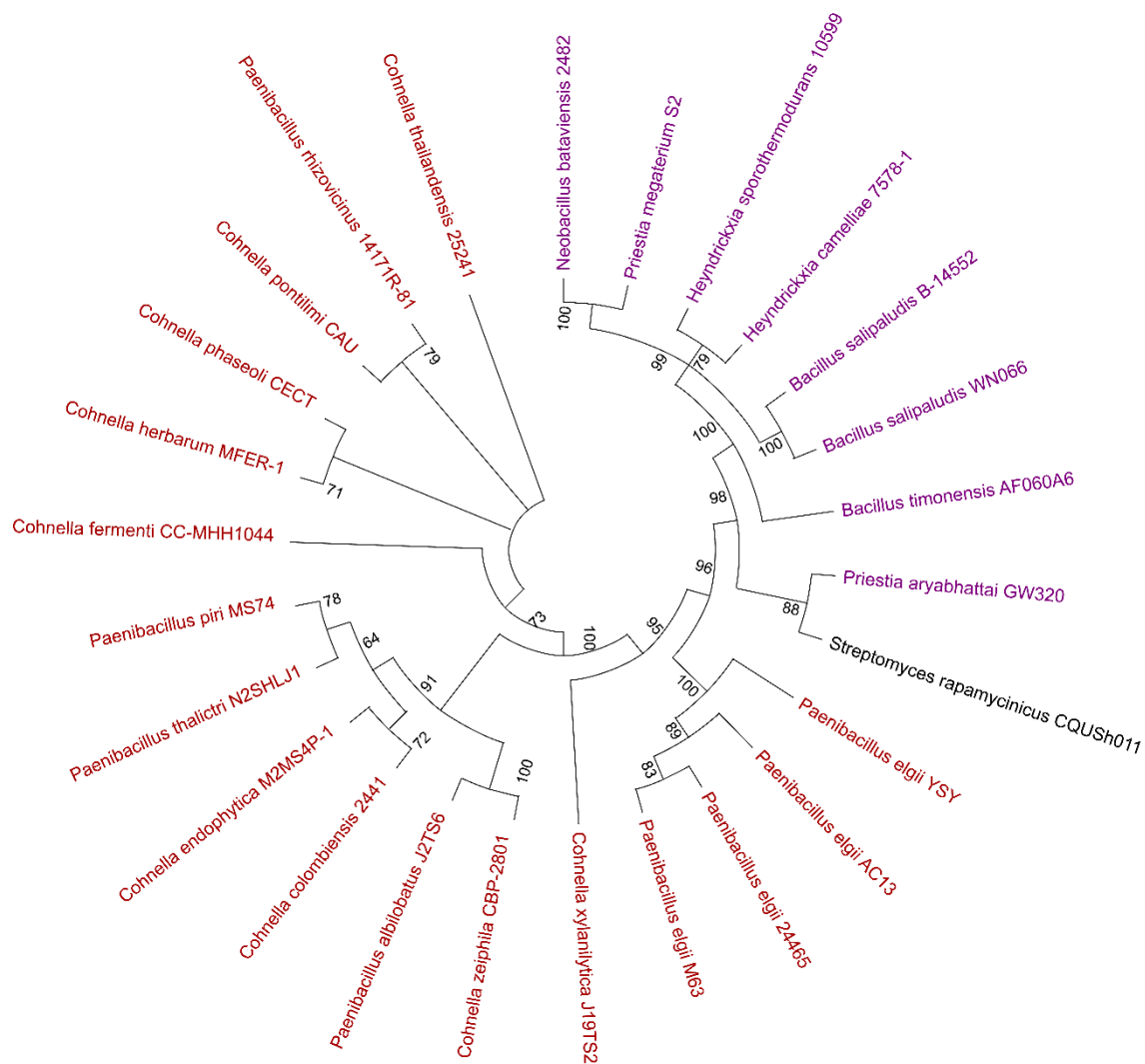


Figura suplementaria 21. Árbol filogenético del gen *pqqBCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

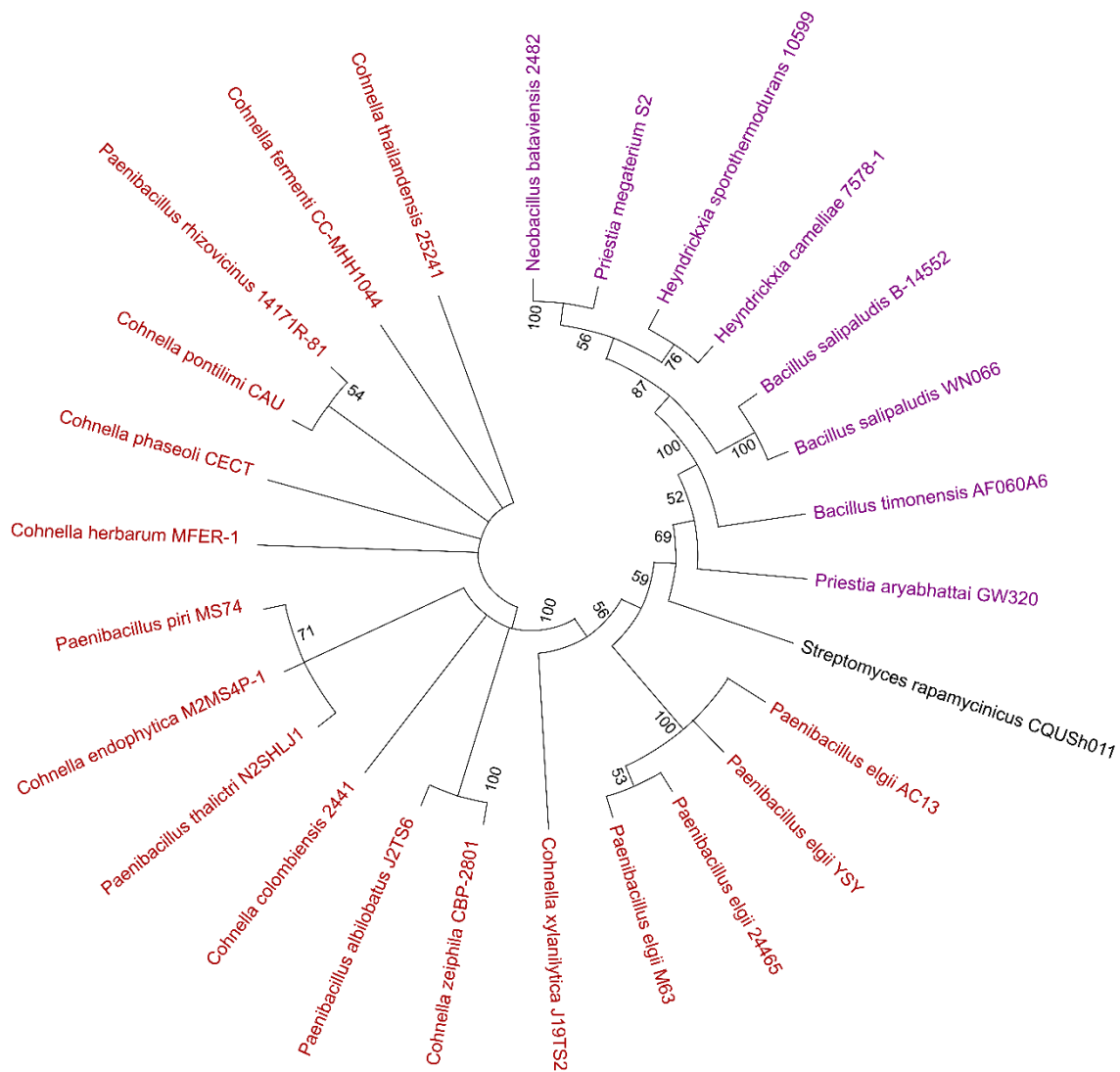


Figura suplementaria 22. Árbol filogenético del gen *pqqCD*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el análisis de *Bacillus timonensis* MM10403188. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

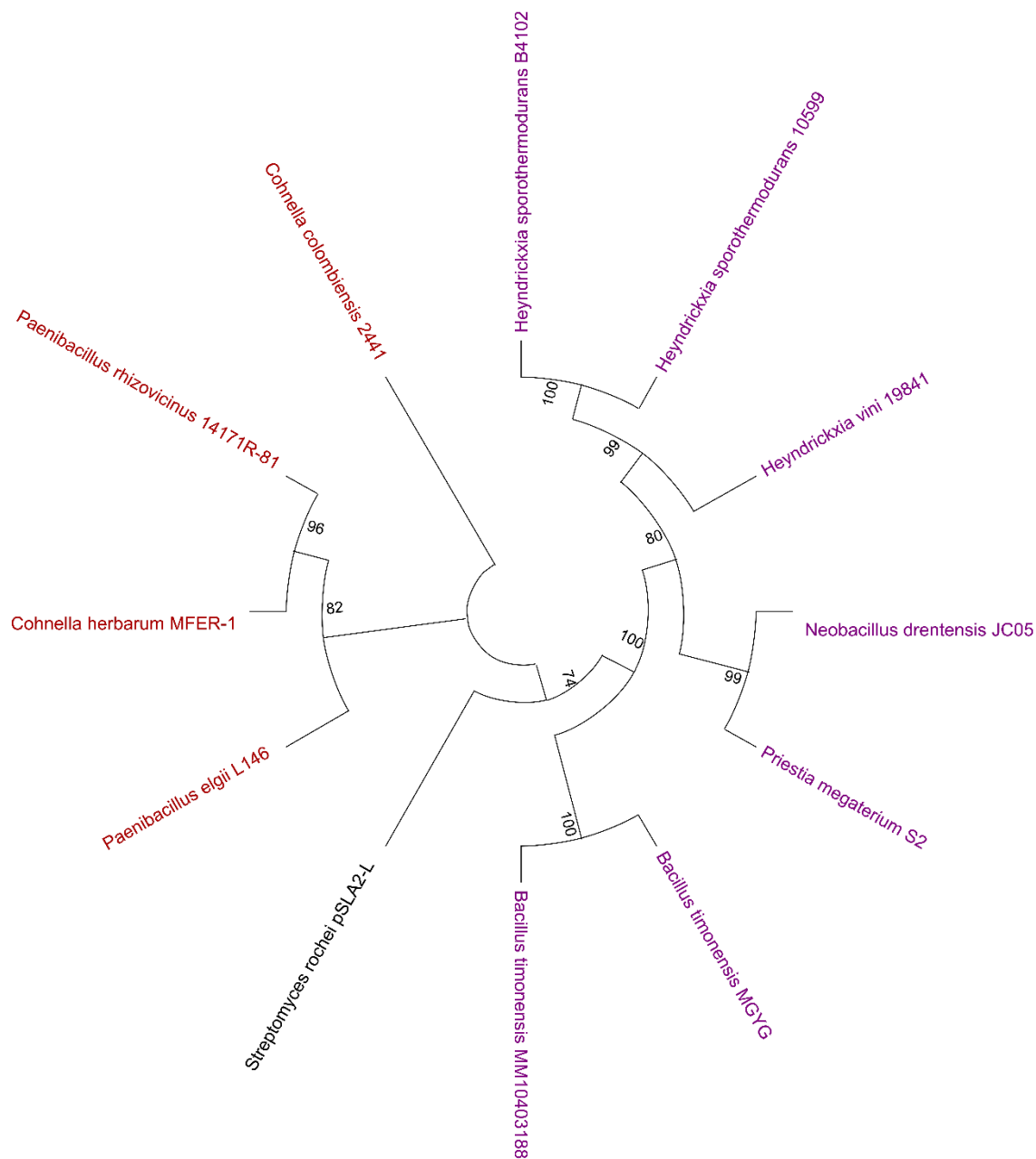


Figura suplementaria 23. Árbol filogenético del gen *pqqCD*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el análisis de *Bacillus timonensis* MM10403188. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

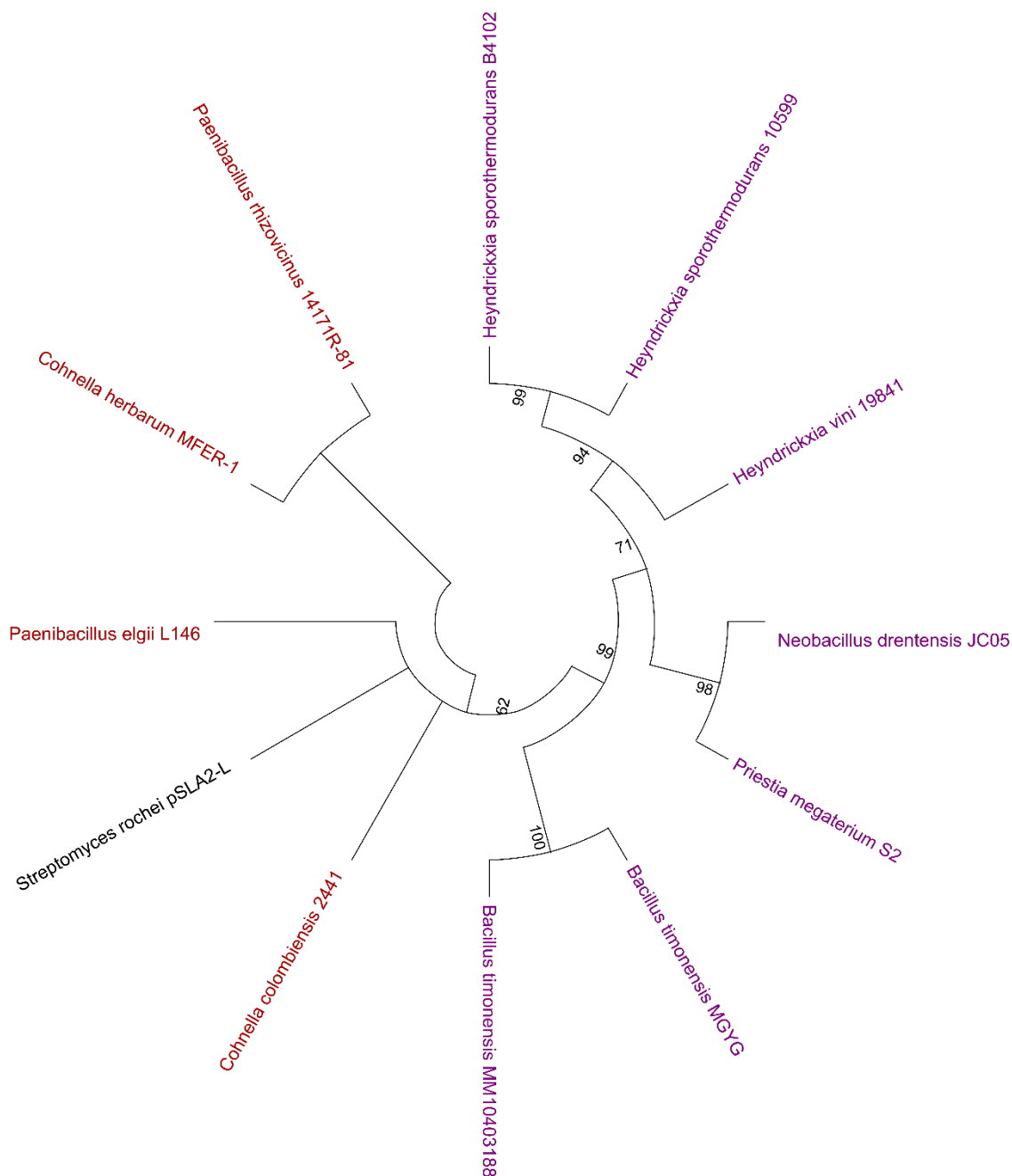


Figura suplementaria 24. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el análisis de *Bacillus timonensis* MM10403188. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

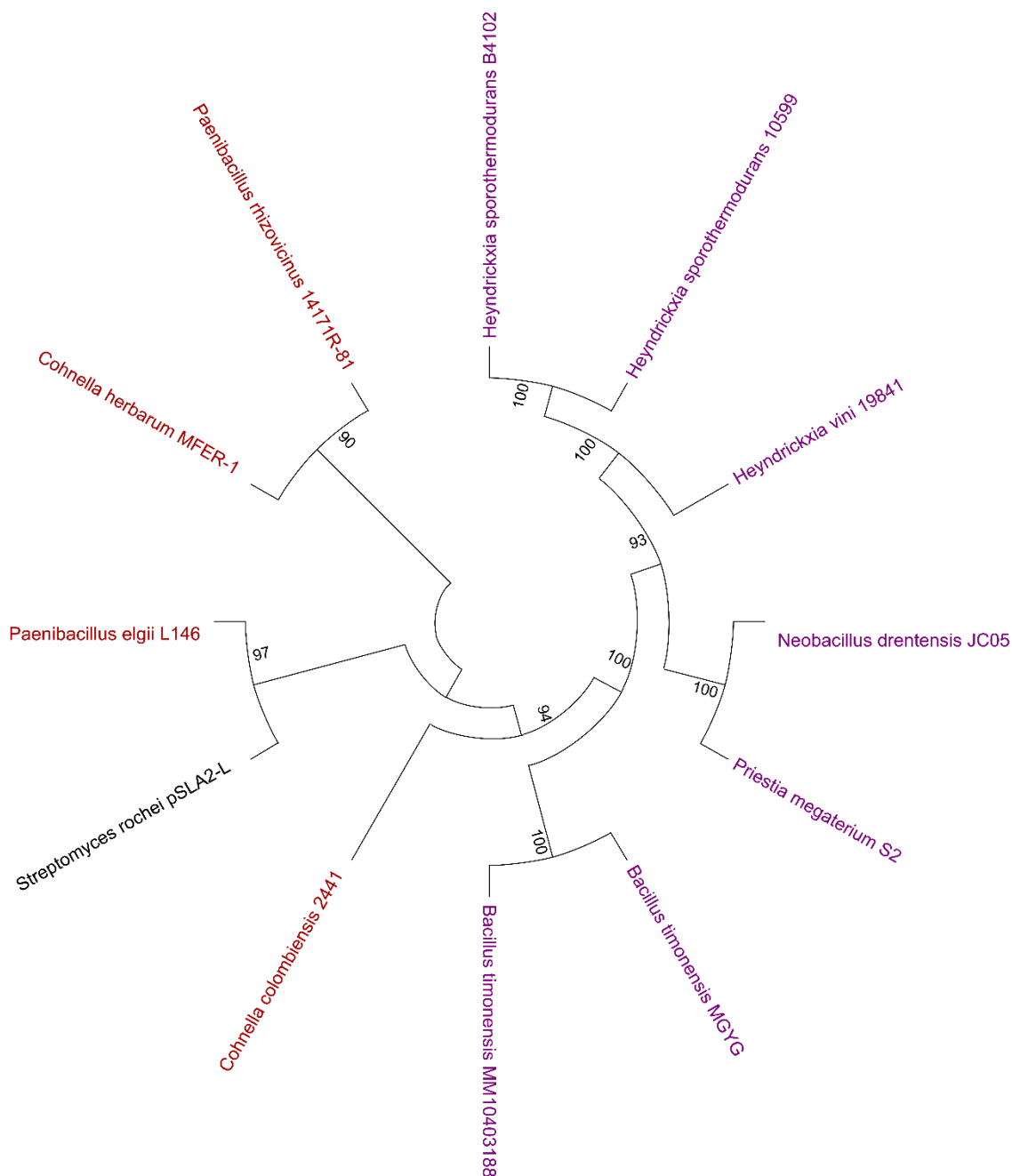


Figura suplementaria 25. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el análisis de *Bacillus timonensis* MM10403188. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

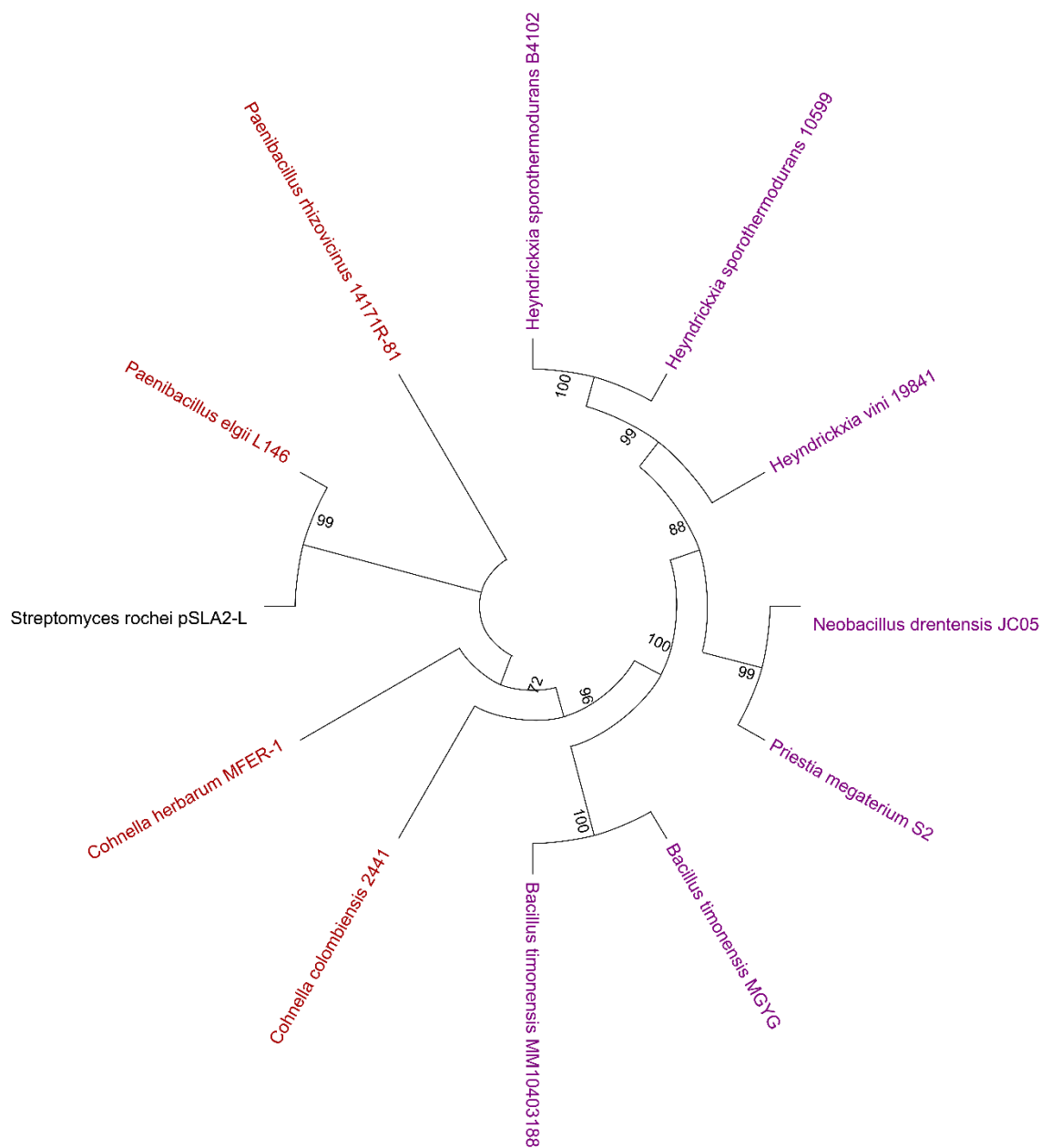
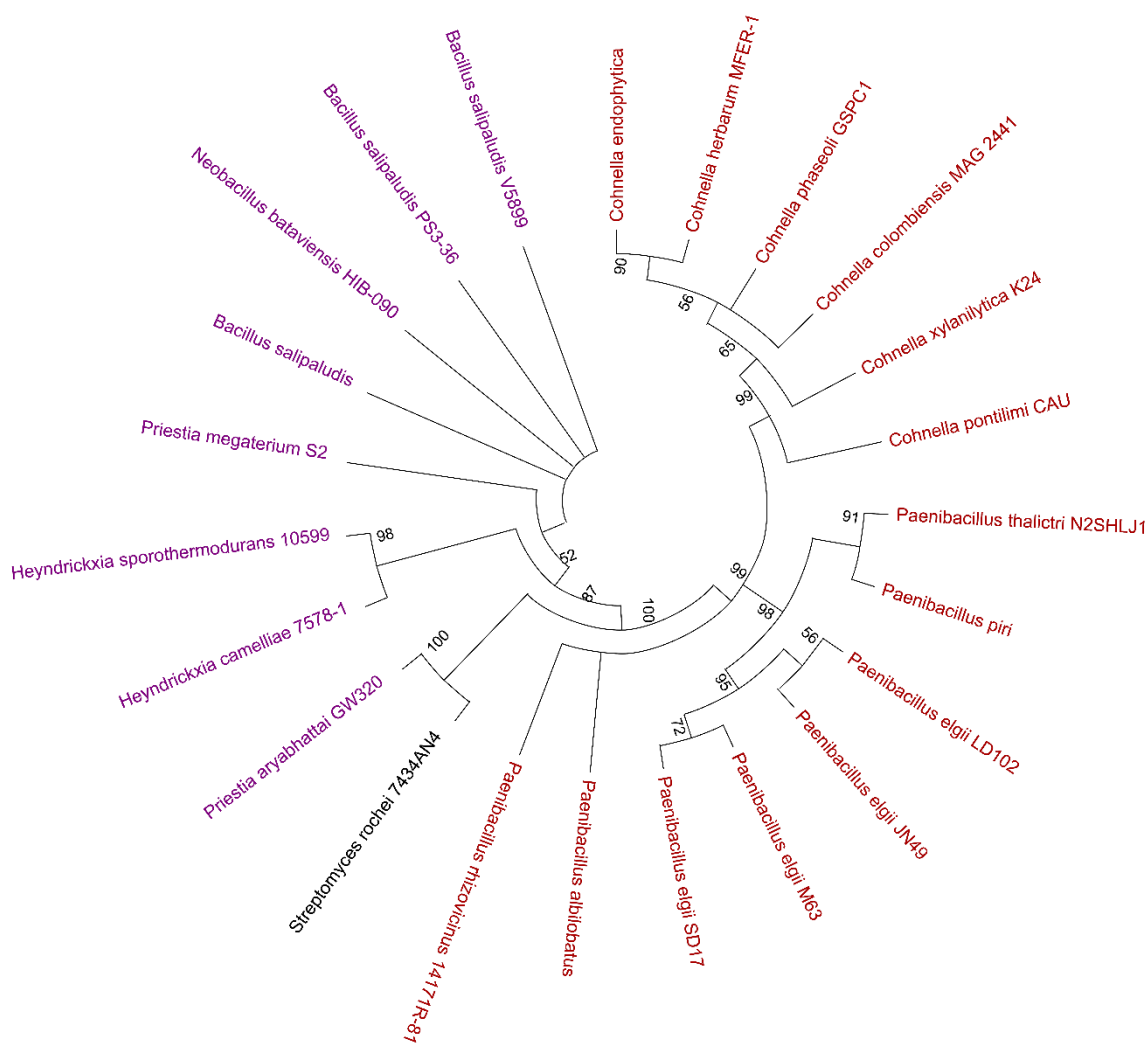


Figura suplementaria 26. Árbol filogenético del gen ARNr 16S, en especies pertenecientes al filo Bacillota, incluidas en el estudio. En morado, Bacillaceae; en rojo, Paenibacillaceae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.



Verrucomicrobiota

Tabla suplementaria 6. Clasificación taxonómica de las especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En morado, Spartobacteria; en rojo, Methylocidiphilae.

Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Spartobacteria	Chthoniobacterales	Chthoniobacteraceae	<i>Chthoniobacter</i>	<i>flavus</i>
Methylocidiphilae	Methylocidiphilales	Methylocidiphilaceae	<i>Methylocidiphilum</i>	<i>fumariolicum</i>
				<i>kamchatkense</i>
				<i>caldifontis</i>
				<i>infernorum</i>

Figura suplementaria 27. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En verde, Spartobacteria; en rojo, Methyacidiphilae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

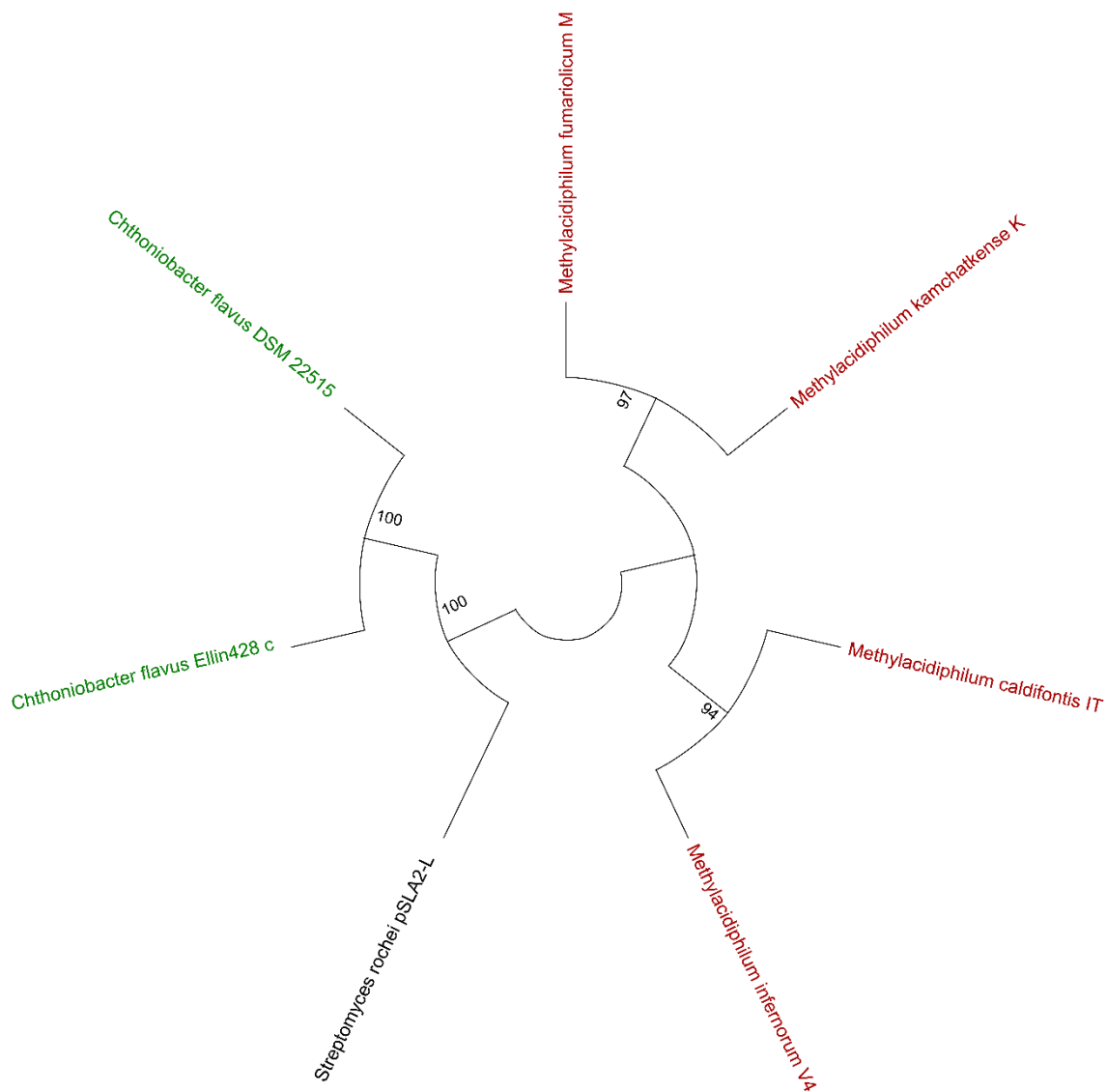


Figura suplementaria 28. Árbol filogenético del gen *pqqC*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En verde, Spartobacteria; en rojo, Methyacidiphilae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

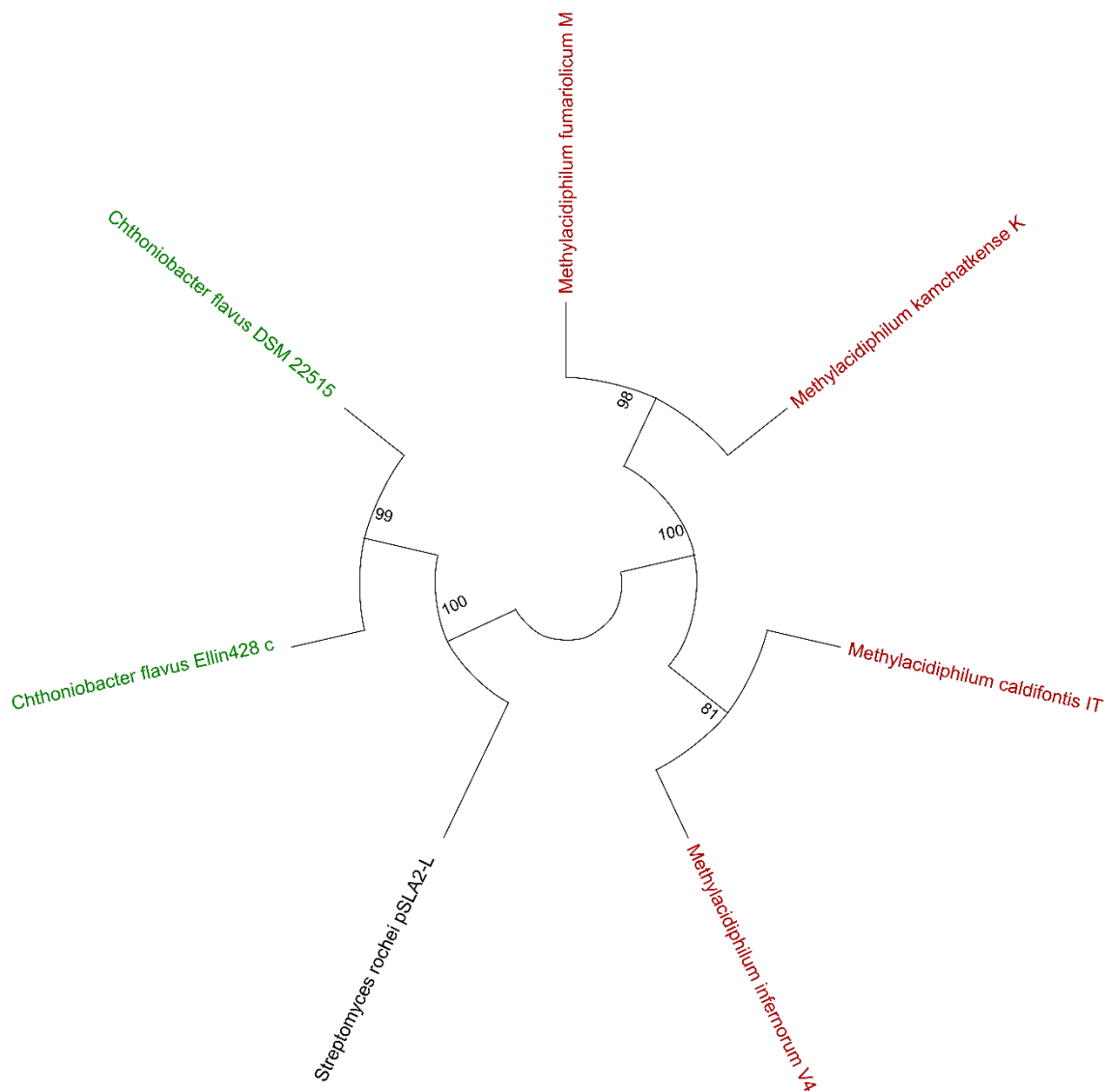


Figura suplementaria 29. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En verde, Spartobacteria; en rojo, Methylocidiphilae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

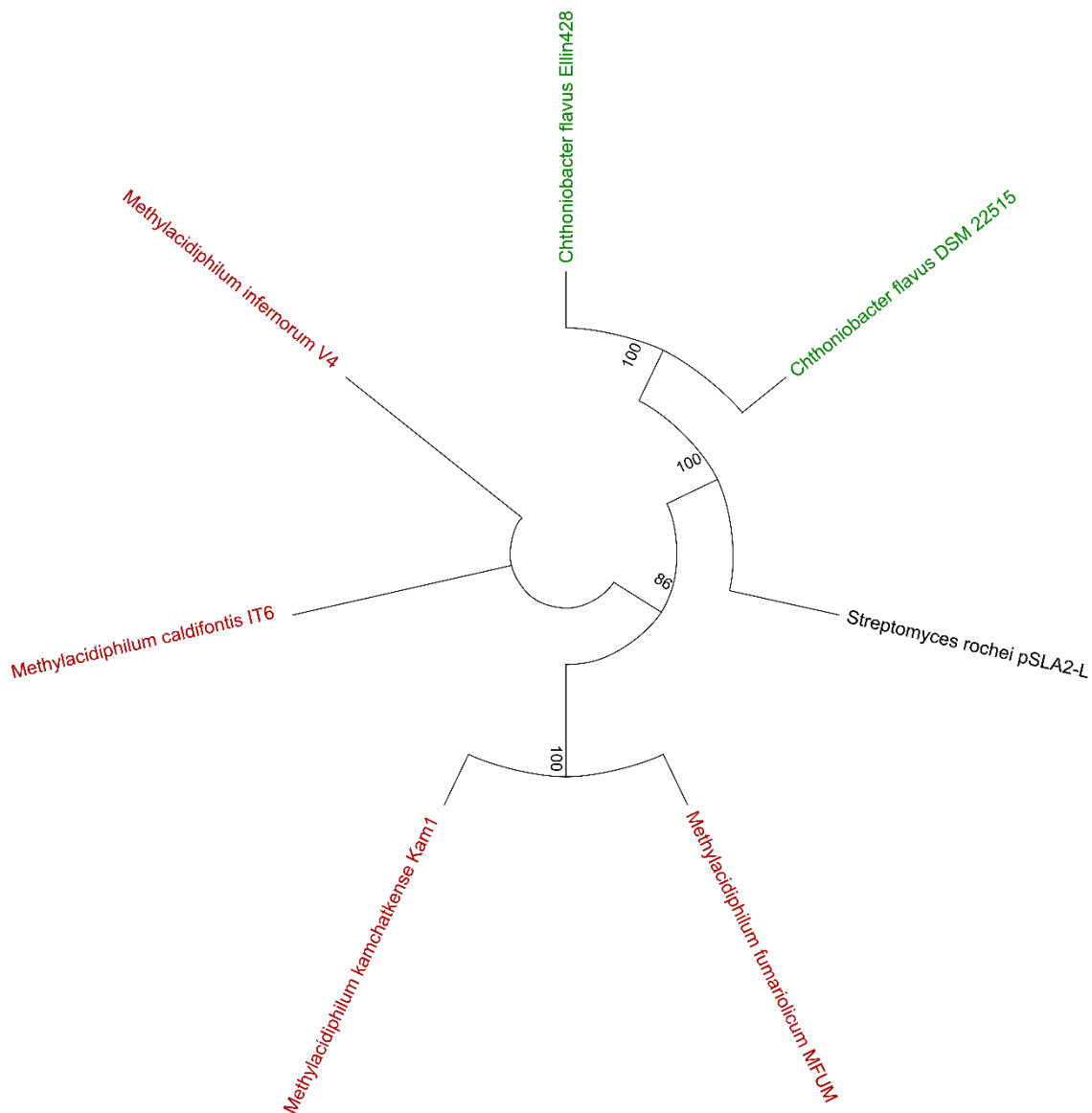


Figura suplementaria 30. Árbol filogenético del gen *pqqCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En verde, Spartobacteria; en rojo, Methylocidiphilae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

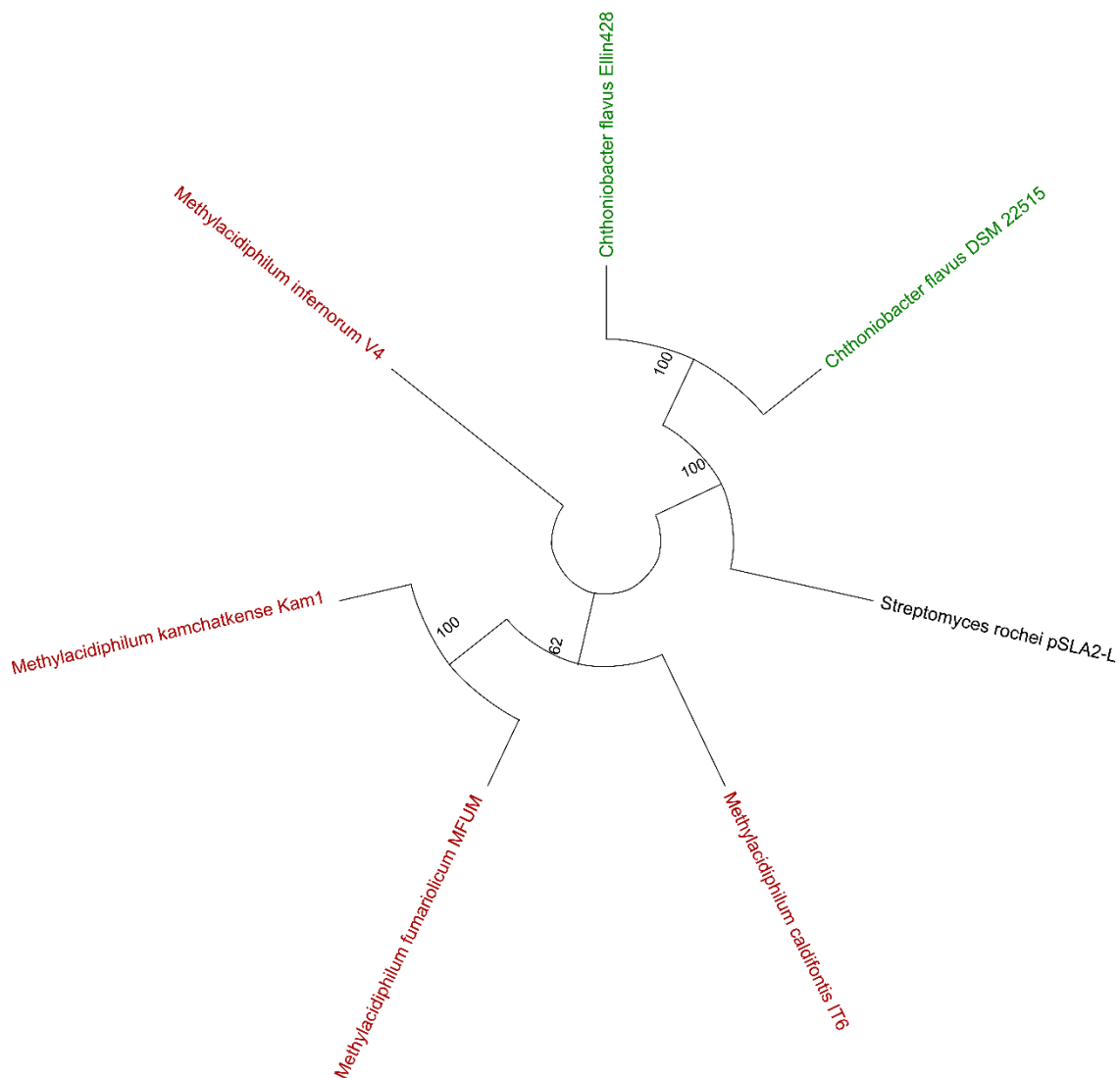


Figura suplementaria 31. Árbol filogenético del gen *pqqBCDE*, elaborado con 3 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En rojo, Methyacidiphilae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

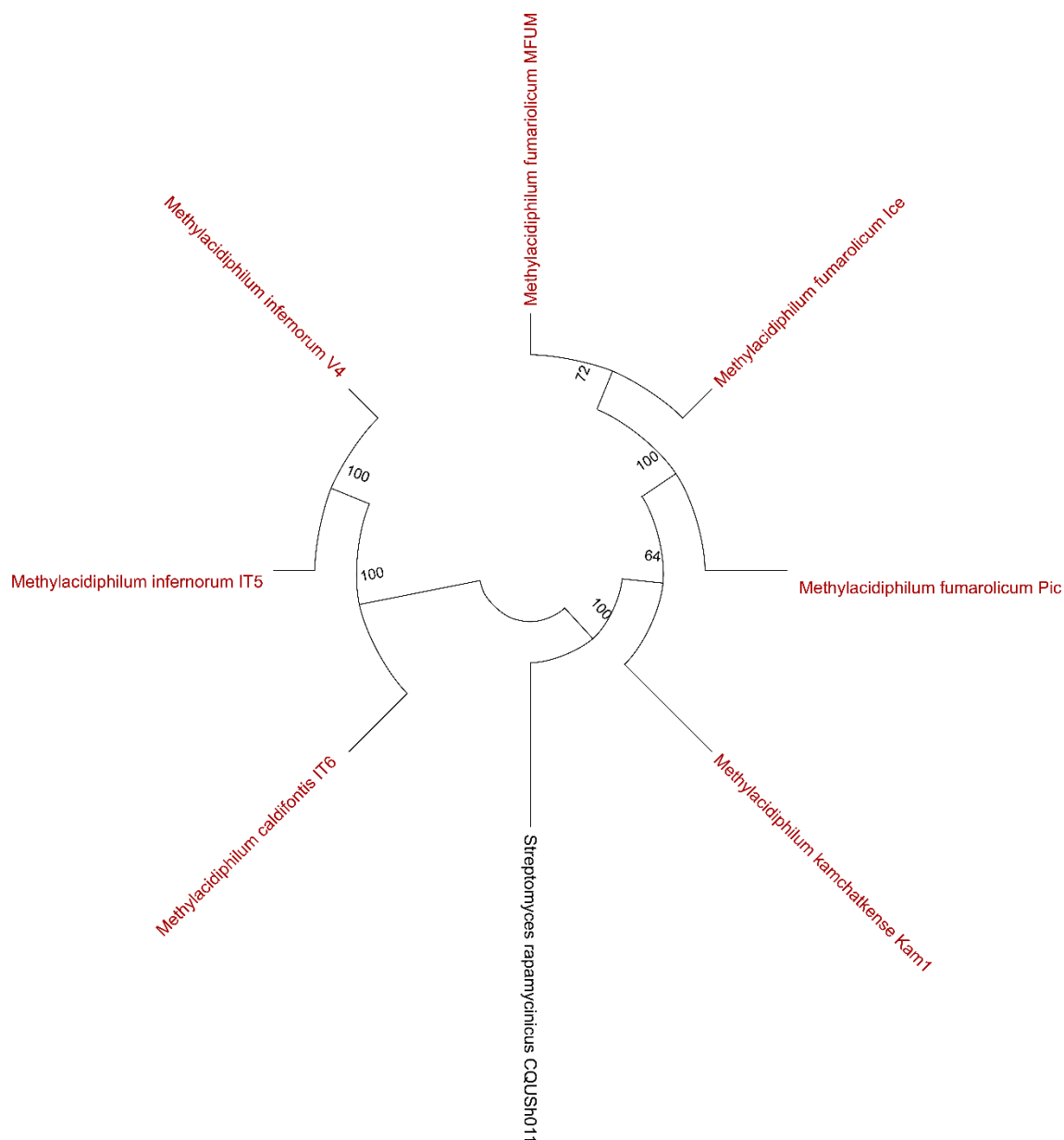


Figura suplementaria 32. Árbol filogenético del gen *pqqBCDE*, elaborado con 2 marcos de lectura, en especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En rojo, Methyacidiphilae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.

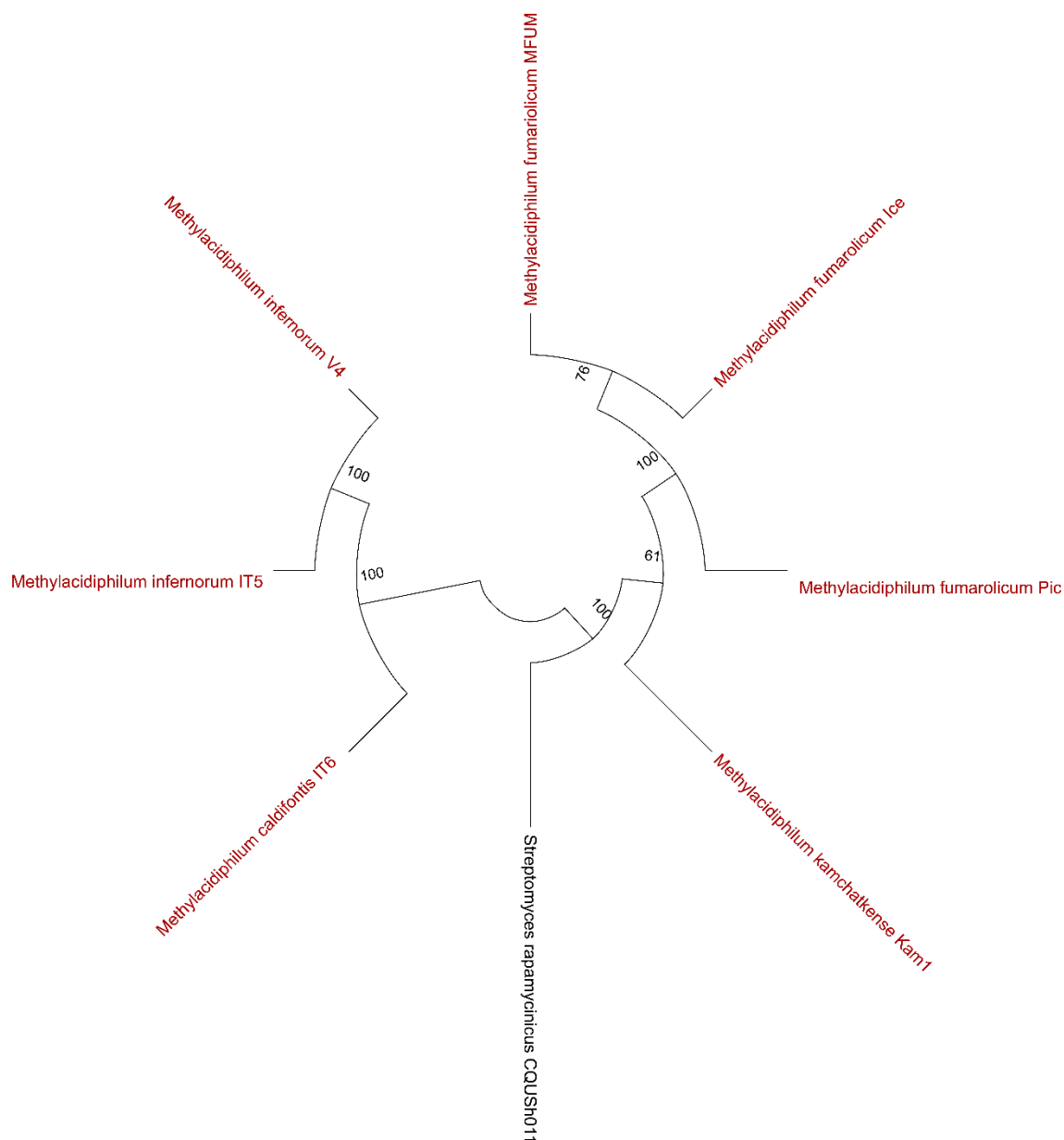
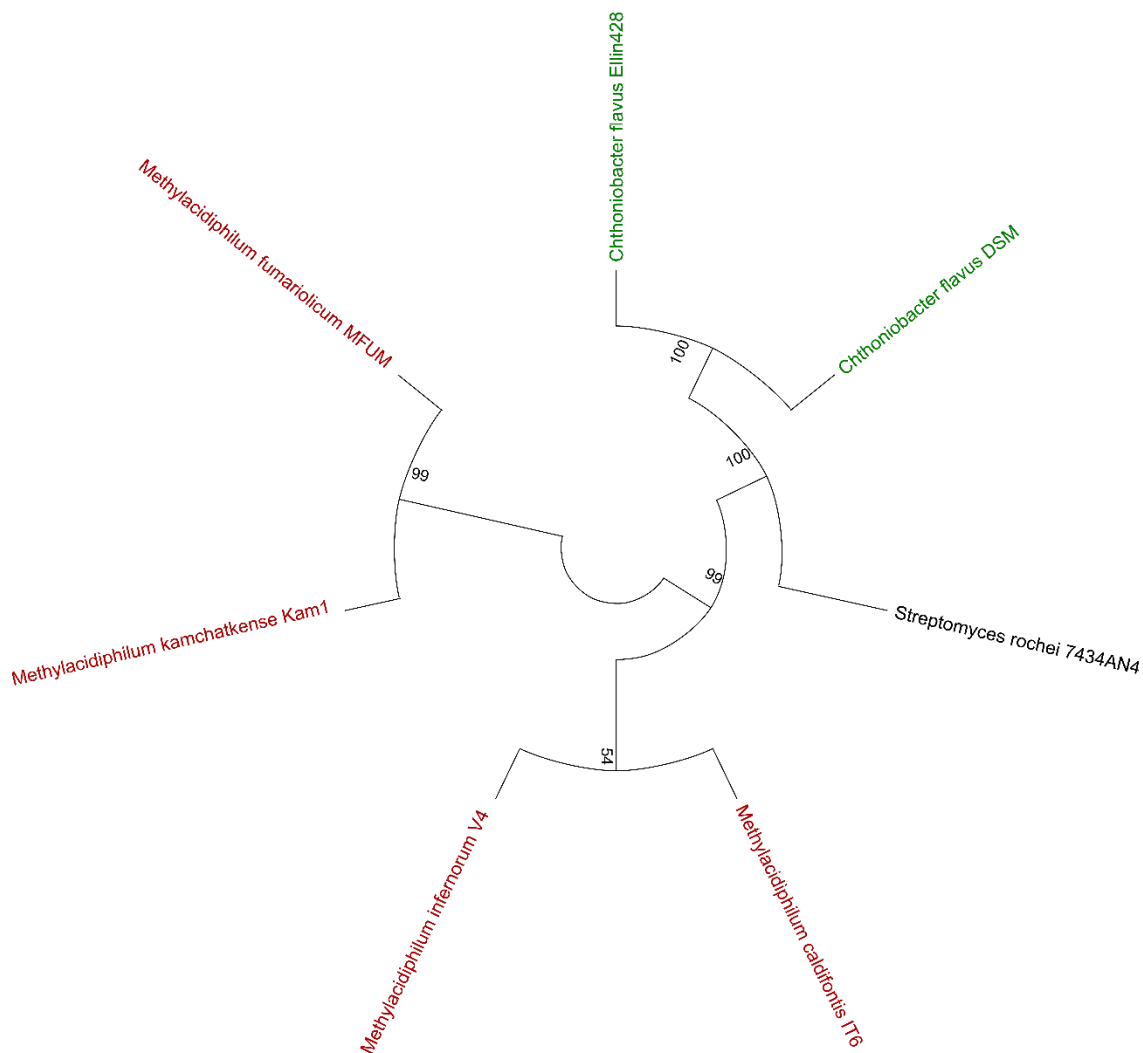


Figura suplementaria 33. Árbol filogenético del gen ARNr 16S, en especies pertenecientes al filo Verrucomicrobiota, incluidas en el estudio. En verde, Spartobacteria; en rojo, Methyacidiphilae; en negro, enraizamiento proveniente del filo Actinomycetota.



Preparación de soluciones

PBS (150 ml)

NaCl 137 mM 1.2 g

KCl 2.7 mM 0.3 g

Na₂HPO₄ 10 mM 0.21 g

KH₂PO₄ 1.8 mM 0.037 g

Agua tridestilada la necesaria para aforar a 1 litro

pH final = 7.4 (ajustar con HCl de ser necesario)

SDS 10% (100 ml)

SDS 10 g

Agua tridestilada la necesaria para aforar a 100 ml

NaCl 5M (40 ml)

NaCl 11.75 g

Agua tridestilada la necesaria para aforar a 40 ml

Buffer CTAB 2% (200 ml)

CTAB 4 g

NaCl 16.4 g

Tris 0.48 g

EDTA 0.29 g

Agua tridestilada la necesaria para aforar a 200 ml

Esterilizar 15 minutos a 115 lb.

Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (50 ml)

Cloroformo 48 ml

Alcohol isoamílico 24:1 2 ml

Almacenar en refrigeración a 4°C

NaI 6M (100 ml)

NaI 90 g

Tiosulfato de sodio 0.05 g

Agua tridestilada la necesaria para aforar a 100 ml

Suspensión de sílica

En un tubo de 50 ml se agregan 2.4 g de sílica y 40 ml de agua tridestilada, agitar la mezcla vigorosamente por 5 minutos y dejar reposar 24 horas en oscuridad. Eliminar 37.6 ml de sobrenadante y aforar a 40 ml con agua tridestilada pH 2.0, agitar y dejar decantar en refrigeración (4°C) por 5 horas. Eliminar 35 ml de sobrenadante y reservar en microtubos de 1.5 ml.

New Wash 10X (1 litro)

Tris 200 mM 24.23 g

NaCl 1M 5.84 g

Agua tridestilada la necesaria para aforar a 1 litro

pH final = 8.0 (ajustar con HCl de ser necesario)

Esterilizar 15 minutos a 115 lb

New Wash 1X (50 ml)

New Wash 10X	5 ml
Etanol 96%	25 ml
Agua PISA	20 ml

Acetato de sodio 3M (200 ml)

Acetato de sodio anhidro	49.2 ml
Agua tridestilada	la necesaria para aforar a 200 ml
pH final = 5.2 (ajustar con ácido acético glacial)	

TBE 10X (1 litro)

Tris	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0.5M (pH 8.0)	40 ml
Agua tridestilada	la necesaria para aforar a 1 litro

pH final = 8.0 - 8.3

TAE 50X (1 litro)

Tris	242.28 g
EDTA	18.61 g
Ácido acético glacial	51.1 ml
Agua tridestilada	la necesaria para aforar a 1 litro
pH final = 8.6	

BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, F., Irisarri, I. y Zardoya, R. (2014). Capítulo 9. Filogenia y evolución molecular. En A. Sebastián y A. Pascual-García (Eds./Coords.), Bioinformática con Ñ. Volumen I: Principios de Bioinformática. (pp. 231-259). Autoeditado e impreso por CreateSpace (<http://www.create-space.com>).
- Alexis Macias Villafuerte. (2022). Evaluación del marcador molecular pqqCDE en muestras fecales de individuos con Síndrome Metabólico. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Ana Maria R. Moise. (2017). The Gut Microbiome: Exploring the Connection Between Microbes, Diet, and Health. Greenwood.
- Carreño-López R., Alatorre-Cruz J.M., Marín-Cevada V. (2019). Pyrroloquinoline quinone (PQQ): Role in Plant-Microbe Interactions. En Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms Discovery and Applications (pp. 169-184).
- Conlan, S., Thomas, P.J., Mullikin, J., Frank, K.M. Segre, J.A., Segre, J.A. y Mullikin, J. (2017) Enterobacter cloacae complex sp. strain AR_0065 chromosome, complete genome. National library of medicine (NCBI). [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP020053.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=12&RID=F09X6XJE01R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP020053.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=12&RID=F09X6XJE01R)
- Fernández-Pato, A., Sinha, T., Gacesa, R. et al. Choice of DNA extraction method affects stool microbiome recovery and subsequent phenotypic association analyses. Sci Rep 14, 3911 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54353-w>
- Francisco Gutiérrez Hernández. (2019). Estudio del clúster de PQQ como marcador molecular para bacterias productoras de PQQ. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Gao, Y., Kamogashira, T., Fujimoto, C., Iwasaki, S., & Yamasoba, T. (2022). Effects of pyrroloquinoline quinone on noise-induced and age-related hearing loss in mice. Scientific reports, 12(1), 15911. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19842-w>

- Hou, K., Wu, ZX., Chen, XY. et al. Microbiota in health and diseases. (2022). *Sig Transduct Target Ther* 7, 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>

- Jonscher, K. R., Stewart, M. S., Alfonso-Garcia, A., DeFelice, B. C., Wang, X. X., Luo, Y., Levi, M., Heerwagen, M. J., Janssen, R. C., de la Houssaye, B. A., Wiitala, E., Florey, G., Jonscher, R. L., Potma, E. O., Fiehn, O., & Friedman, J. E. (2017). Early PQQ supplementation has persistent long-term protective effects on developmental programming of hepatic lipotoxicity and inflammation in obese mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(4), 1434–1448. <https://doi.org/10.1096/fj.201600906R>

- Joshi CJ, Ke W, Drangowska-Way A, O'Rourke EJ, Lewis NE (2022) What are housekeeping genes? *PLoS Comput Biol* 18(7): e1010295. <https://doi.org/10.1371/journal.Pcbi.1010295>

- Keswani, Chetan & Singh, Harikesh & Reddy, Munagala & Sansinenea, Estibaliz & García- Estrada, Carlos. (2019). Secondary Metabolites of Plant Growth-Promoting Rhizo- microorganisms: Discovery and Applications. 10.1007/978-981-13-5862-3.

- Ma, Ziqi & Zuo, Tao & Frey, Norbert & Rangrez, Ashraf. (2024). A systematic framework for understanding the microbiome in human health and disease: from basic principles to clinical translation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 9. 237. 10.1038/s41392-024-01946-6.

- Martínez-Martínez, A. B., Lamban-Per, B. M., Lezaun, M., Rezusta, A., & Arbones-Mainar, J. M. (2024). Exploring Functional Products and Early-Life Dynamics of Gut Microbiota. *Nutrients*, 16(12), 1823. <https://doi.org/10.3390/nu16121823>

- Million, M.M., Armougom,F.A., Lagier,J.C., Pagnier,I.P., Robert,C.R., Bittar,F.B., Henry,M.H., Leroy,Q.L., Fournous,G.F., Gimenez,G.G., Dridi,B.D., Trape,J.F.T., La Scola,B.L., Drancourt,M.D. and Raoult,D.R. (2013). *Bacillus timonensis* strain MM10403188, whole genome shotgun

- Nakano, M., Kawasaki, Y., Suzuki, N., & Takara, T. (2015). Effects of Pyrroloquinoline Quinone Disodium Salt Intake on the Serum Cholesterol Levels of Healthy Japanese Adults. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 61(3), 233–240. <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.233>
- Nguyen, T. T., Kosciolk, T., Maldonado, Y., Daly, R. E., Martin, A. S., McDonald, D., Knight, R., & Jeste, D. V. (2019). Differences in gut microbiome composition between persons with chronic schizophrenia and healthy comparison subjects. *Schizophrenia research*, 204, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.09.014>
- Ohwada, K., Takeda, H., Yamazaki, M., Isogai, H., Nakano, M., Shimomura, M., Fukui, K., & Urano, S. (2008). Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Prevents Cognitive Deficit Caused by Oxidative Stress in Rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 42(1), 29–34. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008005>
- Oren A, Garrity GM (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021;71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>.
- Paul S. Hwang, Steven B. Machek, Thomas D. Cardaci, Dylan T. Wilburn, Caelin, S. Kim, Emiliya S. Suezaki & Darryn S. Willoughby (2020) Effects of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Supplementation on Aerobic Exercise Performance and Indices of Mitochondrial Biogenesis in Untrained Men, *Journal of the American College of Nutrition*, 39:6, 547-556, DOI: 10.1080/07315724.2019.1705203
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Tamakoshi, M., Suzuki, T., Nishihara, E., Nakamura, S., & Ikemoto, K. (2023). Pyrroloquinoline quinone disodium salt improves brain function in

both younger and older adults. *Food & Function*, 14(5), 2496-2501.
<https://doi.org/10.1039/d2fo01515c>

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition reviews*, 70 Suppl 1(Suppl 1), S38–S44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- Varghese, N. and Submissions, S (2016). *Allokutzneria albata* strain DSM 44149 genome assembly, chromosome: I. National library of medicine (NCBI).[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT629701.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=3&RID=EJJ90GYZ013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT629701.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=EJJ90GYZ013)