



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASOCIACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL  
(FIRMICUTES/BACTEROIDETES) CON LA OBESIDAD Y SUS  
COMPLICACIONES METABOLICAS EN POBLACIÓN INFANTIL  
MEXICANA**

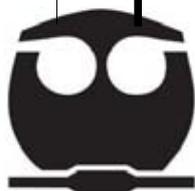
**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA  
Alejandro Ramírez Mirafuentes**

**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: RUTH EDITH MARTIN FUENTES**

**VOCAL:**               **Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**

**SECRETARIO:**       **Profesor: OSCAR ARMANDO PEREZ MENDEZ**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: NANCY MONROY JARAMILLO**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE GENÉTICA DE POBLACIONES APLICADA A LA SALUD DE LA FACULTAD DE QUÍMICA-UNAM DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Samuel Canizales Quinteros**

### **ASESOR TÉCNICO:**

**M. en C. Blanca Estela López Contreras**

### **SUSTENTANTE:**

**Alejandro Ramírez Mirafuentes**



**"La vida es una unión simbiótica y cooperativa  
que permite triunfar a los que se asocian."**

**Lynn Margulis**

**(1938-2011)**

**"Para la primera mitad del tiempo geológico nuestros  
antepasados eran bacterias. La mayoría de las criaturas todavía son  
bacterias, y cada uno de nuestros billones de células  
es una colonia de bacterias."**

**Richard Dawkins**



## Glosario de términos

- ◇ **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ◇ **AG:** Ácidos Grasos
- ◇ **AGL:** Ácidos Grasos Libres
- ◇ **AGCC:** Ácidos grasos de cadena corta
- ◇ **ARN:** Ácido ribonucleico
- ◇ **ARNr:** Ácido ribonucleico ribosomal
- ◇ **ChBREP:** Proteína de unión a elemento en respuesta a carbohidratos.
- ◇ **Disbiosis:** Desequilibrio o alteración en la composición bacteriana de un nicho ecológico.
- ◇ **DT1:** Diabetes tipo 1
- ◇ **DT2:** Diabetes tipo 2
- ◇ **ECV:** Enfermedades Cardiovasculares
- ◇ **Enterotipo:** Clasificación de la comunidad de la microbiota intestinal humana en tres grupos, en función de la obtención de energía de los componentes de la dieta.
- ◇ **HA:** Hipertensión Arterial
- ◇ **HDL:** Lipoproteína de alta densidad
- ◇ **LDL:** Lipoproteína de baja densidad
- ◇ **LPL:** Lipoproteína lipasa
- ◇ **LPS:** Lipopolisacárido
- ◇ **Metabolómica:** Estudio de los perfiles metabólicos de la microbiota intestinal
- ◇ **Metagenoma:** Genoma colectivo del conjunto de microorganismos que constituyen una comunidad ecológica
- ◇ **Metagenómica:** Estudio del material genético de las muestras recuperadas directamente de un determinado entorno biológico para conocer su composición microbiana, evitando la necesidad de aislamiento y cultivo individual de sus componentes
- ◇ **Metaproteómica:** Estudio de las proteínas de la microbiota intestinal

- ◇ **Metatranscriptómica:** Estudio del ARN total transcrito producto de la microbiota intestinal
- ◇ **Microbioma:** Genoma colectivo del conjunto de simbioses que colonizan un animal anfitrión o un nicho biológico
- ◇ **MAPK:** Proteína cinasa, activada por mitógenos
- ◇ **NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- ◇ **pb:** Pares de bases
- ◇ **PPAR:** Receptor activador de los peroxisomas.
- ◇ **PPR`s:** Receptores de reconocimiento de patrones
- ◇ **Prebiótico:** Sustancias no digeribles (fibra) que ejercen un efecto benéfico para el consumidor por la estimulación del crecimiento selectivo de un grupo de bacterias
- ◇ **Probiótico:** Preparación de o un producto con contenido viable de microorganismos en un número suficiente para ejercer un efecto saludable en el huésped
- ◇ **RI:** Resistencia a la insulina
- ◇ **SI:** Sistema inmune
- ◇ **SM:** Síndrome metabólico
- ◇ **SREBP:** Proteína de unión a elemento en respuesta a azúcares.
- ◇ **TG:** Triglicéridos
- ◇ **TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alpha



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>I. ANTECEDENTES</b>	
<b>1. OBESIDAD</b> .....	8
1.1 Prevalencia de obesidad.....	8
1.1.1 Obesidad infantil.....	9
1.2 Causas de la obesidad.....	9
1.2.1 Factores genéticos.....	9
1.2.1.1 Obesidad poligénica.....	10
1.2.2 Factores ambientales.....	10
1.3 Fisiología de la obesidad.....	10
1.3.1 Tejido adiposo.....	11
1.3.2 Función endocrina.....	11
1.3.3 Regulación de la ingesta de alimentos.....	11
1.3.3.1 Hormonas intestinales.....	12
1.4 Complicaciones metabólicas de la obesidad.....	12
1.4.1 Síndrome metabólico.....	12
1.4.1.1 Resistencia a la Insulina y Diabetes tipo 2.....	13
<b>2. MICROBIOTA INTESTINAL</b> .....	13
2.1 Composición de la microbiota intestinal.....	15
2.1.1 Heces.....	15
2.2 Factores que modifican la microbiota intestinal.....	16
2.2.1 Evolución de la microbiota intestinal con la edad.....	16
2.2.2 Tipo de nacimiento.....	17
2.2.3 Tipo de lactancia.....	18
2.2.4 Dieta.....	18
2.2.5 Antibióticos.....	18
<b>3. MICROBIOTA INTESTINAL Y OBESIDAD</b> .....	19
3.1 Funciones metabólicas.....	20
3.1.1 Extracción de energía de la dieta.....	21
3.1.2 Enterotipos.....	21
3.1.3 ACCG.....	22
3.2 Microbiota, obesidad y enfermedades metabólicas.....	23
3.2.1 Microbiota e inflamación.....	24
<b>4. TÉCNICAS MOLECULARES BASADAS EN EL ESTUDIO DEL GEN ARNr 16S</b> .....	25
4.1 ARNr 16S.....	25
4.2 Secuenciación.....	26
4.2.1 Pirosecuenciación.....	27

<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	28
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
5.1 Diseño del estudio.....	30
5.2 Población de estudio.....	30
5.3 Mediciones y recolección de muestras.....	31
5.4 Extracción de ADN bacteriano.....	32
5.5 Calidad e integridad del ADN.....	32
5.6 Amplificación del ARNr 16S por PCR cualitativa.....	34
5.7 Pirosecuenciación.....	34
5.8 Análisis bioinformático.....	35
5.9 Análisis estadístico.....	35
5.10 Diferencias en la composición de la microbiota intestinal.....	35
<b>V. RESULTADOS</b> .....	36
6.1 Descripción de parámetros bioquímicos y antropométricos.....	36
6.2 Amplificación de productos de PCR.....	38
6.3 Análisis bioinformático.....	38
6.4 Enterotipos.....	45
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	53
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b> .....	54
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b> .....	55

## INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS

---

Tabla 1. Estudios que evalúan la influencia de la dieta sobre la microbiota intestinal y la salud del huésped.....	19
Tabla 2. Criterios de Ferranti para definir el Síndrome metabólico para población infantil.....	31
Tabla 3. Características antropométricas y bioquímicas de la población infantil.....	36
Tabla 4. Familias de bacterias identificadas por pirosecuenciación.....	39
Tabla 5. Correlación entre proporción de Bifidobacterias, parámetros bioquímicos y antropométricos.....	43
Tabla 6. Comparación de la ingesta dietaria entre los grupos de estudio.....	45
<hr/>	
Figura 1. Abundancia relativa a nivel de filo y género de la microbiota intestinal.....	14
Figura 2. Evolución de la composición microbiana intestinal con la edad a nivel de filo.....	17
Figura 3. Funciones de los AGCC en el huésped.....	22
Figura 4. Estructura secundaria del ARN ribosomal 16S bacteriano.....	26
Figura 5. Diseño experimental del estudio de la microbiota intestinal.....	29
Figura 6. Procedimiento general de la pirosecuenciación.....	33
Figura 7. Esquema de la metodología utilizada para del estudio de la microbiota intestinal.....	35
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos obtenidos por PCR.....	37
Figura 9. Análisis de Componentes principales de las muestras secuenciadas.....	45
<hr/>	
Gráfica 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en escolares de 5-11 años.....	9
Gráfica 2. Comparación de los niveles de clasificación taxonómica de las dos corridas.....	38
Gráfica 3. Comparación entre la diversidad filogenética entre los grupos de estudio.....	39
Gráfica 4. Abundancia relativa a nivel de filo de la microbiota intestinal.....	40
Gráfica 5. Proporción de los filos Bacteroidetes y Firmicutes entre grupos.....	41
Gráfica 6. Proporción de los filos Actinobacterias y Proteobacterias entre grupos.....	41
Gráfica 7. Abundancia relativa a nivel de género de la microbiana intestinal entre grupos.....	42
Gráfica 8. Diferencias en la proporción de Bifidobacterias entre los grupos de estudio.....	43
Gráfica 9. Abundancia relativa de enterotipos entre los grupos estudiados .....	44



## RESUMEN

**Introducción:** La obesidad, patología compleja y multifactorial, es considerada uno de los principales desafíos sanitarios en México, la cual adquiere características alarmantes si consideramos que un 34.4% de la población infantil mexicana presenta sobrepeso u obesidad. Aun cuando la dieta y la actividad física han sido ampliamente reconocidas como los factores de riesgo modificables más importantes para el desarrollo de la obesidad y sus alteraciones metabólicas, éstas no explican en su totalidad la alta prevalencia de obesidad y comorbilidades. De manera reciente, se ha demostrado la participación de la microbiota intestinal como un factor ambiental relevante asociado no sólo a la obesidad, sino también a complicaciones metabólicas importantes como la resistencia a la insulina y diabetes. La evidencia acumulada, sugiere que la microbiota intestinal humana influye significativamente en el equilibrio energético, la absorción de nutrientes, la regulación del sistema inmune y varias rutas metabólicas del huésped. Esta compleja comunidad bacteriana incluye más de 1000 especies de bacterias de las cuales, los filos Bacteroidetes y Firmicutes conforman el 90%. Estudios en humanos han mostrado diferencias en la composición de microbiota intestinal entre sujetos delgados y obesos, observándose una mayor proporción de Firmicutes y menor proporción de Bacteroidetes en los sujetos obesos. De manera consistente, estudios en modelos animales y en humanos muestran que la eficiencia en la extracción de energía depende de la microbiota intestinal, vinculando a la microbiota con la acumulación de tejido adiposo. Estos antecedentes sugieren que hay una fuerte asociación entre la microbiota intestinal y la obesidad. Debido a que a la fecha, no existen reportes de estudios de la microbiota en población mexicana, en este trabajo se planteó identificar distintos perfiles de la microbiota intestinal asociados con la obesidad y sus complicaciones metabólicas en población infantil mexicana.

**Materiales y Métodos:** En este estudio participaron 39 niños mexicanos en edad escolar (6-12 años), de los cuales se obtuvieron las muestras fecales de niños obesos (n=13), obesos con complicaciones metabólicas (n=13) y delgados (n=13). Previamente se obtuvo un consentimiento informado de los padres de los niños estudiados donde se incluyó una historia clínica, cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y actividad física. Se obtuvo una muestra de sangre periférica de cada voluntario para evaluar el perfil bioquímico. Se extrajo el ADN bacteriano de las muestras fecales, se amplificó el gen 16S ARNr y posteriormente se analizó la composición y diversidad de la microbiota intestinal mediante pirosecuenciación. El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS.

**Resultados.** A nivel de filo no se encontraron diferencias significativas en la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes asociadas a la obesidad. En contraste, se encontró una diferencia significativa en la proporción de Actinobacterias entre los niños obesos con síndrome metabólico y los delgados ( $p=0.017$ ). A nivel de género se observó una diferencia significativa en la cantidad de Bifidobacterias ( $p=0.020$ ) entre los dos grupos mencionados. De manera interesante, la proporción de Bifidobacterias mostró correlación significativa y positiva con los meses de lactancia materna ( $r=0.358$ ,  $p=0.017$ ), así como una correlación negativa con los niveles de triglicéridos ( $r=-0.341$ ,  $p=0.033$ ). Por otra parte, se asoció el enterotipo de Prevotella a la presencia de síndrome metabólico.

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran una disminución significativa en la cantidad de Bifidobacterias en la composición de la microbiota intestinal de infantes mexicanos con síndrome metabólico. Posiblemente la duración de lactancia materna tenga un efecto protector contra la obesidad y sus complicaciones. La alimentación es uno de los principales factores que altera significativamente las poblaciones bacterianas del intestino y contribuye de manera importante en el desarrollo de obesidad y sus alteraciones metabólicas.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1. OBESIDAD.**

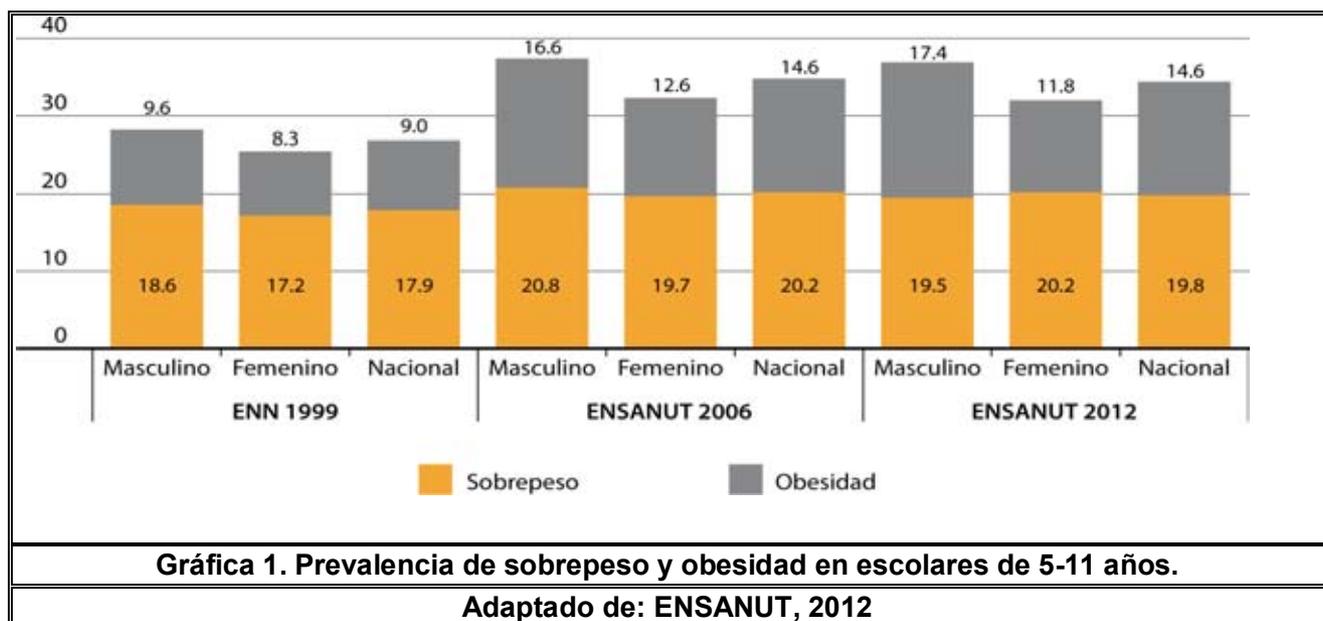
La obesidad es una enfermedad común, compleja y multifactorial que suele iniciar en la infancia, causada principalmente por un desequilibrio de energía debido a factores genéticos, alimentación inadecuada y falta de actividad física, que ocasionan un aumento en los depósitos de grasa corporal con el consecuente aumento de peso. Sin embargo, la cadena causal de la obesidad es más compleja de lo que aparenta dada su etiología multifactorial, donde confluyen factores genéticos, ambientales, económicos, psicológicos, sociales, metabólicos y endocrinos (Christakis, 2007; Angelakis et al, 2012). La obesidad actualmente es conocida como la gran epidemia del siglo XXI, afectando indistintamente a mujeres y hombres, niños y adultos.

#### **1.1 Prevalencia de obesidad.**

La obesidad es considerada la enfermedad no transmisible más prevalente en el mundo y ha sido catalogada como epidemia (Bosch et al, 2010). Cada año mueren, al menos 2.6 millones de personas a causa de la obesidad y sus comorbilidades. De acuerdo a datos de la OMS, la obesidad se ha duplicado desde 1980. Actualmente se estima que 1,000 millones de adultos tienen sobrepeso y más de 300 millones son obesos (OMS, 2013). Un análisis realizado en 199 países sugiere que hay cada vez mayor prevalencia de obesidad en todas las regiones del mundo, incluso en la mayoría de los países de ingresos bajos y medios, con los mayores incrementos en los países de ingresos más altos (Finucane et al, 2011). Se estima que la prevalencia de obesidad es más alta en mujeres que en hombres. La obesidad y sus comorbilidades como el síndrome metabólico (SM) y las enfermedades cardiovasculares (ECV) consumen del 2 al 6 % de los costos del sector de salud en muchos países, afectando la productividad y el desarrollo económico (Swinburn et al, 2011). En México, se reportó una prevalencia de obesidad de 27% y 38% en hombres y mujeres mayores de 20 años, respectivamente. Actualmente nuestro país ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil y el segundo en obesidad en adultos, antecedido por EUA (FAO, 2013). Así mismo, para el 2018, se pronostica que tendremos una prevalencia superior a 36% y 46% en hombres y mujeres, respectivamente (ENSANUT, 2012).

### 1.1.1 Obesidad Infantil.

La obesidad infantil es uno de los problemas de salud pública más severos del siglo XXI. El sobrepeso en infantes es un factor condicionante de obesidad en la vida adulta. Los niños que padecen sobrepeso u obesidad entre los 9 y 13 años tienen un 70% de probabilidades de ser adultos obesos (Flegal, 2005). La obesidad en la infancia se asocia a distintas complicaciones metabólicas (Velásquez-Mieyer et al, 2007). En nuestro país se reportó que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños fue de 34.4%, representando alrededor de 5, 664,870 niños mexicanos con sobrepeso u obesidad (gráfica 1). A pesar de las medidas preventivas, los programas de salud pública y el conocimiento sobre la obesidad, es preocupante que del 2006 al 2012 la prevalencia de obesidad en niños no haya disminuido.



### 1.2 Causas de la Obesidad.

Se ha definido a la obesidad como una patología compleja, multicausal y heterogénea donde el balance de energía positivo que la caracteriza surge como resultado de la interacción de un gran número de genes con factores ambientales, socioculturales y conductuales.

#### 1.2.1 Factores genéticos.

Además de las alteraciones en la dieta y la baja actividad física, la predisposición genética contribuye a la obesidad y causa diferencias en el almacenamiento y gasto energético

(Martínez-Romero, 2005). De acuerdo con distintos análisis, se ha sugerido que los genes determinan del 40 al 70 % de la obesidad (Bell et al, 2005).

#### **1.2.1.1 Obesidad poligénica.**

Esta es la forma de obesidad más frecuente y estudia la interacción de los genes, hormonas y proteínas con el medio ambiente según la individualidad genética. La búsqueda de los genes que conducen a la obesidad consiste principalmente en la identificación de mutaciones y polimorfismos en genes candidatos, y el escrutinio del genoma completo para detectar regiones cromosómicas ligadas con rasgos cuantitativos (QTL quantitative traits loci) (Rankinen et al, 2006). Mediante estudios de asociación se han identificado más de cien genes candidatos por su relación significativa con variables como peso corporal, IMC, distribución de grasa corporal, lipólisis en adipocitos, perímetro de cintura, entre otras. En los últimos años, uno de los hallazgos más importantes fue el descubrimiento del gen FTO (fat mass and obesity) y sus variantes alélicas (León-Mimila et al, 2013).

#### **1.2.2 Factores Ambientales.**

El notable aumento en la incidencia de obesidad desde hace treinta años a la fecha, sugiere que los cambios en el ambiente y en el estilo de vida, juegan el papel más preponderante en la génesis de la obesidad y sus comorbilidades (Swinburn, 2011). En nuestro país, la disminución de la actividad física, los altos niveles de sedentarismo y la mala alimentación, son los factores más relevantes que contribuyen a esta epidemia. Un estudio reciente evidenció mayor prevalencia de obesidad en edad escolar, particularmente en niñas y correlacionó positivamente con el nivel socioeconómico (Mercado y Vilchis, 2013). Varios autores enfatizan la importancia del ambiente “obesogénico” en el desarrollo de la obesidad, debido en gran medida a la comercialización y disponibilidad de alimentos hipercalóricos, ricos en grasas e hidratos de carbono que son baratos y agradables al paladar (James, 2010).

#### **1.3 Fisiología de la obesidad.**

El desbalance energético entre la ingesta de alimentos y el gasto energético conduce a un desorden metabólico en el cual existe un exceso de grasa corporal que tiene efectos adversos en la salud (Bouchard, 2008). El desequilibrio crónico en el aumento de almacenaje

de energía produce hipertrofia e hiperplasia del adipocito, estrés del retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial (Ferranti et al, 2009).

### **1.3.1 Tejido adiposo.**

Los adipocitos están distribuidos en el organismo, bajo la piel, alrededor de los vasos sanguíneos y en el abdomen, son metabólicamente activos y responden a estímulos hormonales en coordinación metabólica con los tejidos periféricos. Cuando se eleva la ingestión de glúcidos, los azúcares simples como la glucosa se transforma en ácidos grasos (AG), el cual se esterifica y forma triglicéridos (TG) que se almacenan en forma de grasa. Los AG almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados en respuesta a la acción de noradrenalina, a través de la lipoproteinlipasa (LPL) en situaciones de requerimiento energético y son transportados, a través del torrente sanguíneo, al músculo esquelético y al corazón. En los humanos la mayor parte de la síntesis de AG ocurre en los hepatocitos (Nelson, 2006).

### **1.3.2 Función endocrina.**

Se han descrito que múltiples señales endocrinas mediadas por hormonas producidas por el adipocito son relevantes en los estados de adiposidad excesiva, ya que desempeñan un papel clave en los mecanismos fisiopatológicos de las alteraciones metabólicas que acompañan a la obesidad (Sanz, 2009). El tejido graso además de servir como el principal reservorio energético, es un complejo órgano endocrino capaz de secretar diversas hormonas e intermediarios químicos que regulan el metabolismo de lípidos y glucosa en distintos tejidos, influyen la acción de insulina, estimulan la síntesis y producción de citocinas inflamatorias liberadas por la grasa visceral, modulan el consumo de alimentos y el equilibrio energético (Tilg, 2006). Adicionalmente los adipocitos participan en procesos como angiogénesis, disolución y reforma de la matriz extracelular (Medina-Gómez, 2009).

#### **1.3.2.1 Regulación de la Ingesta de alimentos.**

La obtención de energía de los alimentos se regula por mecanismos neuroendocrinos. En la regulación del apetito y el balance energético intervienen factores que inducen hambre (orexigénicos) y factores que dan lugar a saciedad (anorexigénicos). A largo plazo son

esenciales las señales que emanan del tejido adiposo (leptina) y del páncreas (insulina) liberadas en respuesta a la ingesta (Manzur et al, 2010).

### **1.3.2.2 Hormonas intestinales.**

El intestino se comunica con el hipotálamo mediante vías neuronales y endocrinas que regulan el balance energético. Las hormonas intestinales conocidas como “incretinas” controlan el apetito y el peso corporal. Se liberan en las células endocrinas que están distribuidas en el epitelio del tracto gastrointestinal entérico considerado el órgano endocrino más grande del organismo (Breen et al, 2011). Las incretinas activan circuitos neuronales que comunican con el hígado, músculo, páncreas y el tejido adiposo, además, potencian la secreción de insulina en respuesta a la glicemia. Las principales incretinas son los péptidos: inhibitorio gástrico (GIP), el similar al glucagón tipo 1 (GLP1) y tirosina-tirosina (PYY) que inducen saciedad, disminuyen la motilidad y el tránsito intestinal (Cani, et al, 2008; Samuel et al, 2008; Greiner, 2011).

## **1.4 Complicaciones metabólicas de la obesidad.**

Las alteraciones metabólicas que acompañan a la obesidad son factores de riesgo importantes para el desarrollo de diversos tipos de cáncer, enfermedades coronarias, arterioesclerosis, hígado graso no alcohólico, problemas respiratorios, entre otras (Ferrante, 2007). Otras complicaciones metabólicas de la obesidad, menos conocidas pero de interés, son los fenotipos que corresponden a sujetos con peso normal pero metabólicamente obesos quienes presentan las complicaciones propias de pacientes obesos. A la vez, existen los obesos metabólicamente sanos. Estos individuos tienen IMC > 30, pero ninguna de las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.

### **1.4.1 Síndrome metabólico (SM).**

El SM se ha definido como un conjunto de factores de riesgo cardiovascular, el principal de los cuales es la resistencia a la insulina (RI), entre otras alteraciones metabólicas que lo caracterizan como la obesidad, hipertensión, dislipidemia y DT2. Estas alteraciones metabólicas se asocian más con la distribución de la grasa que con el grado de obesidad (Daniels, 2008). La grasa intraabdominal altera los mecanismos inflamatorios y promueve la RI. Se ha sugerido que la RI es el factor que desencadena distintos trastornos metabólicos

asociados a la obesidad. En población adulta se han definido varios criterios para el diagnóstico del SM. Actualmente las definiciones más aceptadas son las que propone la NCEP (Programa Nacional de Educación del Colesterol) y la IDF (Federación Internacional de Diabetes) las cuales se caracterizan por la presencia de tres de los cinco rasgos de riesgo cardiovascular: obesidad abdominal, elevación de la presión arterial (PA), triglicéridos (TG), disminución del colesterol HDL y RI o intolerancia a la glucosa (IG). Aun cuando el SM afecta a más del 30% de los niños con obesidad y su prevalencia va en aumento, determinando un mayor riesgo de DT2 y ECV en la vida adulta (Goran et al, 2003), no hay consenso para su diagnóstico en infantes. No obstante, se han utilizado preferentemente los criterios de la IDF por su fácil manejo y porque la obesidad es el principal componente (Groner et al, 2006).

#### **1.4.1.1 Resistencia a la Insulina y Diabetes tipo 2.**

La alteración genética o adquirida en la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos provoca hiperinsulinemia e hiperglucemia. Tanto la RI como la hiperinsulinemia son características de la obesidad que pueden llevar a otras a complicaciones cardiometabólicas (Groner et al, 2006). Dichas complicaciones alteran el metabolismo de glucosa y favorecen el acúmulo de lípidos en el hígado y en el tejido adiposo, que contribuyen a la enfermedad de hígado graso no alcohólico (HGNA) (Snijder et al, 2003; Weiss, et al, 2004).

## **2. MICROBIOTA INTESTINAL**

En el intestino humano habita una comunidad microbiana altamente densa y diversa, la cual se encuentra en estrecha relación simbiótica con su huésped, producto de cientos de miles de años de evolución (Gotteland, 2013). La microbiota intestinal es un complejo ecosistema donde coexisten una amplia variedad de poblaciones bacterianas, además de un gran número de levaduras, virus, arqueas, algunos parásitos y protozoarios. Se sabe que esta microbiota tiene un efecto significativo en varios aspectos de la fisiología incluyendo el metabolismo energético, la absorción de nutrientes y la regulación del sistema inmune (Backed et al, 2007; Guarner, 2003). Estas bacterias en conjunto, pueden ser consideradas como un órgano más del cuerpo humano el cual es dinámico, renovable, y tiene un papel importante en la obtención de energía a partir de la dieta, a tal grado que se le ha

considerado equivalente al hígado por su importancia metabólica (Marathe et al, 2012; Qin et al, 2010).

En personas adultas, el intestino puede llegar a albergar aproximadamente hasta 100 trillones de microorganismos comensales, es decir 10 veces más bacterias que células humanas y que colectivamente contienen 150 veces más genes que el genoma humano (Qin et al, 2010). A esta cantidad total del genoma bacteriano se le denomina microbioma, (3-4 millones de genes) (Gill et al, 2006). Este arsenal de genes provee un amplio rango de actividades metabólicas y bioquímicas que ayudan y complementan la fisiología del huésped. Esta biomasa de bacterias pesa de 1 a 2 kilogramos, se compone de 150 a 200 especies bacterianas prevalentes y de aproximadamente 1,000 especies menos frecuentes (Qin et al, 2010; Turnbaugh et al, 2008). Los estudios metagenómicos en muestras fecales revelan que la diversidad en la población bacteriana intestinal está representada en casi su totalidad (>90 %) por los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (figura 1). Mientras que los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria* se encuentran en menor proporción (Ley et al, 2006; Tagliabue y Elli 2013).

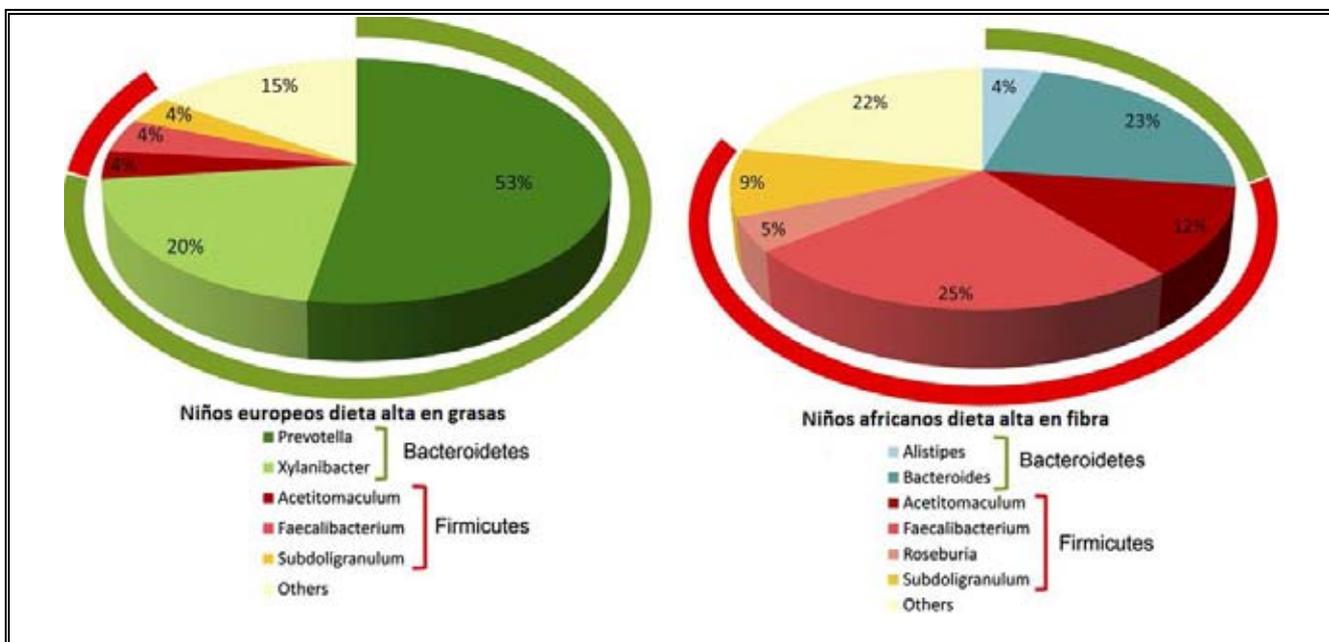


Figura 1. Abundancia relativa a nivel de filo y género de la microbiota intestinal entre dos poblaciones de niños de África y Europa, las variaciones en la microbiota intestinal se atribuyen a diferencias en la dieta, sin embargo en ambas poblaciones predominan los filos Firmicutes y Bacteroidetes.

Adaptado de: Fillipo et al, Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa 2011. PNAS vol.107 no.33

El filo *Firmicutes* es el más abundante y comprende alrededor de 274 géneros que incluyen *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Ruminococcus*, existiendo gran variabilidad en su filogenia (Eckburg et al, 2005). Los *Bacteroidetes* incluyen solo 20 géneros, donde *Prevotella* y *Bacteroides* son los que se encuentran en mayor proporción. Mientras que el filo *Actinobacteria* comprende bacterias Gram-positivas siendo *Bifidobacterium* el género más significativo, ya que es ampliamente utilizado como probiótico (Greiner, 2011). Dentro del filo *Proteobacteria*, se encuentran la familia de las *Enterobacterias* y *Helicobacter pylori*.

## 2.1 Composición de la microbiota intestinal.

La microbiota del intestino difiere en cantidades y tipos de bacterias a lo largo del tracto gastrointestinal y varía en función del pH, disposición de nutrientes, la concentración de oxígeno, y a pesar de que existen diferencias geográficas e individuales importantes, existe un patrón de colonización común para todas las personas (Guarner, 2003). El número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) es alto en la boca, desciende de forma significativa en el estómago y el duodeno, y se incrementa paulatinamente en el yeyuno e íleo, para alcanzar su nivel más alto en el colon. De acuerdo a varios estudios, se han reportado recuentos totales de  $10^{10} - 10^{12}$  UFC/g de heces (Eckburg et al, 2005; Marathe et al, 2012). El tracto gastrointestinal tiene la más alta densidad y diversidad bacteriana de todo el cuerpo humano y de cualquier hábitat en todo el mundo. Se estima que las bacterias anaerobias (>95%) predominan en el intestino humano, debido al ambiente reductor (desprovisto de oxígeno) del colon. Asimismo, el tiempo de tránsito en el colon es lento, lo cual facilita la proliferación de bacterias que fermentan los sustratos disponibles derivados de la dieta. En las heces de adultos los *Bacteroides* son las especies más comunes ( $10^{11}$  UFC/g), (Kleesen, 2000; Guarner, 2003).

**2.1.1 Heces.** El análisis de la composición de la microbiota intestinal se realiza en las heces, ya que la microbiota que se encuentra en las mismas, es muy semejante a la del colon, siendo su recolección sencilla y no invasiva. Sin embargo, esta microbiota no representa necesariamente a todas las bacterias residentes a lo largo del tracto gastrointestinal. Se debe considerar que un inadecuado almacenamiento de la muestra puede ser decisivo a la hora de detectar bacterias lábiles como los anaerobios estrictos (Ottman et al, 2004). La composición de las heces se divide en 75 % agua y 25 % de sólidos, de éstos últimos el 60

% son bacterias, lo restante se compone de residuos no digeribles de la dieta (Fibra) y células descamadas del huésped. De manera importante, sólo el 30 % de las bacterias que habitan en el intestino y colon humano son actualmente cultivables (Eckburg et al, 2005; Kleesen et al, 2000; Guarner, 2007).

## **2.2. Factores que modifican la microbiota intestinal.**

La microbiota es muy variable incluso entre sujetos sanos y cada persona presenta un perfil bacteriano único, el cual se configura por factores genéticos y en mayor medida por factores ambientales. Se ha descrito que la microbiota de mellizos monocigóticos criados en ambientes distintos se asemeja más que las personas no relacionadas (Parks et al, 2013). La dieta, la vía de nacimiento, la edad y el tipo de lactancia así como el uso de antibióticos provocan diferencias importantes en las poblaciones bacterianas del intestino. Aunque se ha revelado que una vez establecida la microbiota en un individuo, es estable a lo largo de la vida, solo sufrirá cambios transitorios causados por estrés, ejercicio, cirugías, modificaciones importantes en la dieta, prebióticos y probióticos (Adlerberth et al, 2006; Guarner, 2007). Cabe mencionar que la maduración del sistema inmune y endocrino está influenciada por la colonización bacteriana.

### **2.2.1 Evolución de la microbiota intestinal con la edad.**

Los cambios más drásticos en la composición bacteriana intestinal tienen lugar en los primeros años de vida, donde predominan los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. En los primeros días de vida, la microbiota se caracteriza por su inestabilidad y poca diversidad. Después la microbiota se estabiliza durante la lactancia. Los siguientes grandes cambios se producen tras la introducción de la alimentación sólida (Icaza-Chávez, 2013). Es a partir de los 2 años de edad, que la microbiota es estable, caracterizada por mayor diversidad donde dominan los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y los grandes grupos bacterianos permanecen constantes durante toda la vida, con mayor abundancia de *Bacteroides*. A lo largo de la vida la composición del microbioma aumenta en diversidad y llega a su máximo desarrollo en el adulto. Sin embargo el envejecimiento y el patrón alimenticio afectan la composición de la microbiota en los ancianos, que se distingue por un incremento de *Clostridium* mientras que *Bifidobacterium* y la biodiversidad bacteriana disminuyen, a nivel de filo se aprecia una

reducción de *Bacteroidetes* y un aumento de *Firmicutes* (figura 2) (Nicholson et al, 2012; Turnbaugh et al, 2009; Eckburg et al, 2005; Thompson-Chagoyan et al, 2004).

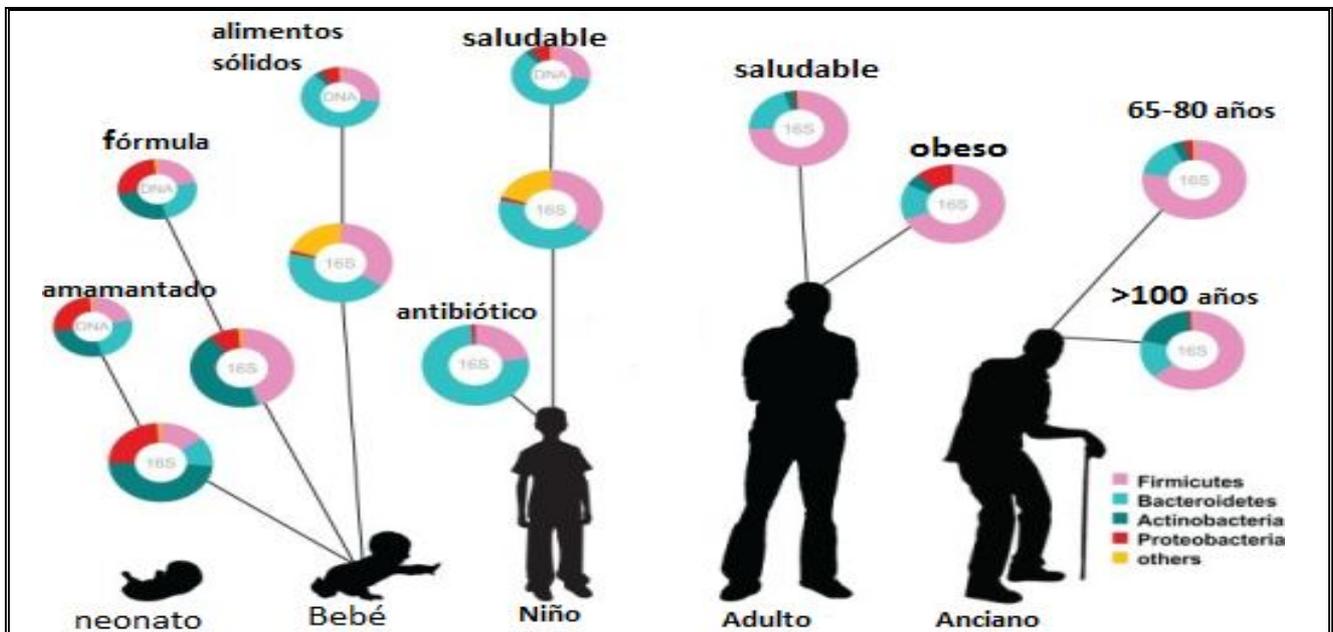


Figura 2. Evolución de la composición microbiana intestinal con la edad a nivel de filo. Las características de la microbiota intestinal cambian a través del tiempo y se modifica en respuesta a las diversas condiciones ambientales.

Adaptado de; Ottman et al, 2012, the function of our microbiota; who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and infection microbiology*.

### 2.2.2 Tipo de Nacimiento.

Aunque se ha considerado que el tracto gastrointestinal es estéril antes del nacimiento, recientes evidencias ponen en duda esta creencia, ya que se ha encontrado ADN bacteriano y estructuras celulares de bacterias intestinales en la placenta (Satokari et al, 2009). Un hallazgo constante es que todos los bebés son colonizados por *E.coli* y *Streptococcus ssp.*, que son responsables del ambiente reductor favorable para el establecimiento de bacterias anaerobias.

**Nacimiento natural:** La colonización se inicia durante el parto por exposición del recién nacido a la microbiota fecal y vaginal de la madre. Esta condición favorece la colonización con *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Prevotella* (Ravel et al, 2011).

**Nacimiento por cesárea:** Por el contrario, los bebés que nacen vía cesárea no reciben contribuciones de la microbiota vaginal (bacterias anaerobias) y su primer contacto bacteriano se produce en el ambiente intrahospitalario o bien por la microbiota de la piel de la

madre. En estos niños, la colonización anaerobia es retardada, en cambio hay un predominio de *Staphylococcus*, y *Clostridium*, y una baja prevalencia de *Bacteroides* y *Bifidobacterias* (Adlerberth et al, 2006; Domínguez-Bello et al, 2010; Mändar 1996). Otros factores que alteran la microbiota intestinal de los neonatos son las medidas de higiene, la hospitalización y la edad gestacional (Walker, 1998).

### **2.2.3 Tipo de lactancia.**

El tipo de lactancia es muy relevante en la composición bacteriana intestinal a lo largo de toda la vida. La leche materna contiene una mezcla compleja de oligosacáridos (oligofruktosa) y particularmente nutrientes inmunoreguladores (IgA) que se cree inhiben la unión de bacterias patógenas, estimulan el crecimiento de bacterias benéficas, regulan la inflamación y favorecen la maduración del sistema inmune. En los bebés que reciben este tipo de lactancia predominan los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Bjorksten, 2001). En contraste, los niños alimentados con fórmulas lácteas adquieren una microbiota bastante heterogénea, con mayores cantidades de *Enterobacterias* y *Staphylococcus*. Además de un incremento importante de *Clostridium* y *Streptococcus*. Se ha reportado que un 50-60% de los niños que reciben fórmula tienen presente *Clostridium difficile* (patógeno), contra 6-20% de los que reciben lactancia materna (Martín et al, 2004). Aunque a medida que avanzan en edad la cantidad *Clostridium difficile* disminuye y se parece más a la del adulto. Por otro lado, se ha observado que los niños que reciben lactancia materna presentan menor riesgo de obesidad y una mejor regulación del apetito en comparación con los alimentados con fórmula, sugiriendo que el tipo de lactancia pudiera afectar a la microbiota e impactar directamente en el fenotipo del individuo en la edad adulta (Hediger et al, 2001).

### **2.2.4 Antibióticos**

Es bien sabido que el consumo indiscriminado de antibióticos causa aberraciones en la composición de la microbiota, afecta la diversidad y el metabolismo bacteriano, además de producir resistencia bacteriana e infecciones por *Enterobacterias* y patógenos oportunistas como "*C. difficile*". Un ciclo de administración oral de ciprofloxacina de 5 días disminuyó considerablemente la diversidad de la microbiota natural intestinal (Dethlefsen, et al 2010). Así mismo, se ha demostrado que la disminución en la prevalencia de "*H. pylori*" en las

poblaciones occidentales se debe al elevado uso de antibióticos incrementando la incidencia de asma y sus enfermedades asociadas (Anderson, 2005; Banatvala et al, 1993).

### 2.2.5 Dieta.

La dieta es el factor ambiental más significativo que influye en la composición de la microbiota y contribuye a su diversidad. Los cambios en los hábitos alimenticios pueden explicar hasta el 57% de la variación de la microbiota intestinal (Brown et al, 2012). Numerosos estudios han enfatizado la asociación entre la dieta y distintos perfiles microbianos (Tabla 1). La cantidad y calidad de los nutrientes ejercen un profundo impacto en la microbiota, particularmente las proteínas e hidratos de carbono van a determinar la cantidad de alimento no digerido que llega al intestino, condicionando el metabolismo, la proliferación y el predominio de algunas bacterias sobre otras.

**Tabla 1. Algunos estudios que evalúan la influencia de la dieta sobre la microbiota intestinal y la salud del huésped.**

Dieta	Microbiota	Efecto en el huésped	Referencia
Rica en polisacáridos derivado de plantas	Incremento de <i>Bacteroidetes</i> Disminución de <i>Firmicutes</i>	Tiempo de tránsito intestinal más rápido comparado con una dieta alta en proteínas y grasa animal	Wu et al, 2011 De Filippo et al, 2011
Dieta Occidental, alta en grasas e hidratos de carbono	Incremento <i>Firmicutes</i> y <i>Proteobacterias</i> Reducción de <i>Bacteroidetes</i>	Obesidad inducida por la dieta. Incrementa el tejido adiposo	Turnbaugh et al, 2009
Basada en productos animales, alta en proteínas y grasa animal	Aumento de diversidad bacteriana, incluyendo <i>Bacteroides</i> , disminución de <i>Firmicutes</i>	Disminución del peso independientemente de las calorías consumidas	David et al, 2013
Cambio de una dieta vegetariana a una dieta basada en productos animales.	Disminución de <i>Prevotella</i> , aumento de <i>Bacteroides</i>	No reportado	Cleason et al, 2009

Adaptado de: Beneficial modulation of the gut microbiota, CJ Wash et al. Elsevier FEBS Lett. 2014.

### 3. MICROBIOTA INTESTINAL Y OBESIDAD.

Los factores ambientales y genéticos están bien caracterizados en el desarrollo de la obesidad pero ambos no explican en su totalidad, la alta incidencia de esta patología y sus comorbilidades. En años recientes, numerosas investigaciones han sugerido a la microbiota

intestinal como un nuevo factor que contribuye de manera importante al aumento de peso, la obesidad y sus desórdenes metabólicos asociados debido a su influencia en las funciones inmunológicas y metabólicas del huésped. Recientes estudios tanto en humanos, como en animales, describen un aumento en la proporción *Firmicutes/Bacteroidetes* en sujetos obesos (Dibaise et al, 2008; Raoult, 2008; Bäckhed et al, 2007). En ratones obesos genéticamente modificados (lep ob/ob) se ha visto que la proporción de *Firmicutes* está aumentada y la de *Bacteroidetes* disminuida, en comparación con los ratones delgados (Ley, 2005). Otro estudio demostró que después de trasplantar la microbiota intestinal de un ratón normal a uno libre de bacterias (GF por sus siglas en inglés), el ratón receptor desarrolló RI y un aumento significativo en la grasa corporal, a pesar de la reducción de la ingesta calórica (Bäckhed et al, 2007). En consecuencia, el fenotipo obeso puede trasplantarse entre organismos a través de la microbiota. En este mismo modelo, se observó que el consumo de una dieta alta en grasa y en azúcar incrementaba la proporción de *Firmicutes*. De manera interesante, la disminución de peso a través de una dieta baja en calorías incrementan la proporción de *Bacteroidetes*, sugiriendo que esta fila puede responder a la dieta (Turnbaugh et al, 2008). Igualmente, en un estudio en ratones se observó que el microbioma del ratón obeso estaba empobrecido con genes involucrados en motilidad (flagelina y quimiotaxis) y enriquecido con genes que codifican enzimas que desdoblan polisacáridos complejos (glucósido hidrolasas). Así mismo, en ratones obesos se ha descrito un aumento de las arqueas metanogénicas, que se asociaron con una baja presión de hidrogeno y mayor velocidad de fermentación bacteriana (Murphy et al, 2010; Turnbaugh et al, 2006). En ratones alimentados con una dieta rica en grasa, se observó que *Akkermansia muciniphila* restaura la capa de moco (mucinas) y se correlaciona de manera inversa con el peso corporal, incluso mejora el perfil metabólico (Everard et al, 2013).

### **3.1 Funciones metabólicas**

El genoma de la microbiota intestinal, conocido como microbioma, excede ampliamente la complejidad del genoma humano, el cual codifica numerosas funciones metabólicas que son únicas y no pueden ser realizadas por el huésped. De tal forma que la interacción metabólica entre el humano y su microbiota se consideran en la actualidad como un supra organismo (Hooper, 2002). En esta relación de mutualismo y en el ambiente intestinal se dan diversas actividades benéficas entre el genoma humano y los genes microbianos que mediante

señales químicas provocan cambios en los respectivos genomas, a tal nivel que se considera que forman un genoma común, llamado “hologenoma” (Ley et al, 2005).

Por su parte, la microbiota intestinal es eficiente en la extracción de energía de la dieta y contribuye en gran medida en la salud y nutrición del huésped (Macfarlane et al, 2012). Además impacta significativamente en la fisiología humana y su metabolismo mediante la transformación de la fibra dietética en azúcares simples, la producción de ácidos grasos de cadena corta (ACGG), vitaminas y ácido fólico, la regulación del metabolismo de ácidos biliares y colina, desintoxicación de compuestos xenobióticos o cancerígenos e interesantemente puede afectar el metabolismo farmacológico (Droege, 2008). Adicionalmente, la microbiota aporta nuevos nutrientes y afecta vías bioquímicas concretas que modulan el metabolismo lipídico, de hidratos de carbono y de aminoácidos (Guarner et al, 2003; Duncan et al, 2007).

### **3.1.1 Extracción de energía de la dieta.**

El hecho de que la microbiota es relevante para la extracción de energía, ha sido demostrado en estudios en ratones libres de bacterias que no adquieren su microbiota intestinal al nacimiento y que son resistentes a la obesidad inducida por la dieta debido a que muestran una mayor tasa de oxidación de AG en su músculo esquelético. A pesar del incremento en la ingesta, los ratones GF necesitaron ingerir 30% más de energía que los ratones convencionales para mantener su peso normal, revelando que la microbiota ayuda a extraer el máximo valor energético de la dieta. Los ratones GF se asociaron con menor almacenamiento de energía en el hígado y en el músculo (Bäckhed et al, 2007; Tremaroli et al, 2010; Hooper, 2002). Asimismo, se ha descrito que la microbiota intestinal modula la capacidad de obtención de energía de la dieta, representando hasta un 10% de los requerimientos energéticos (Balamurugan, 2010), además mejora la capacidad de almacenamiento de energía en los adipocitos, a través de la modificación en la expresión de algunos genes que influyen en el metabolismo de lípidos y glúcidos. En ratones GF, la adquisición de una microbiota intestinal convencional produce aumento de factores de transcripción ChBREP y SREBP-1 así como un aumento de acetil-CoA carboxilasa y sintetasa de ácidos grasos favoreciendo una mayor síntesis de AG (Bäckhed, et al, 2004). En ratones colonizados por *Bacteroides thetaiotaomicron*, se observó que la actividad de la

fucosyl-transferasa por los colonocitos favorece la absorción de monosacáridos y AGCC, que son utilizados a nivel hepático para sintetizar lípidos de novo (Hooper, 2001). Algunos autores proponen que la disbiosis de la microbiota intestinal contribuye a la obesidad a través del incremento de la fermentación de la fibra, lo que implica una mayor producción de AGCC que son acumulados como triacilgliceroles en el hígado y tejido adiposo (Bäckhed et al, 2004). Estas evidencias sugieren que la obesidad y la ingesta pueden afectar de manera importante la composición de la microbiota intestinal (Santacruz et al, 2009).

### **3.1.2 Enterotipos.**

Un estudio publicado por el consorcio Europeo MetaHIT sugiere que aunque la variación en la composición de la microbiota es interindividual, predominan solo tres grupos bacterianos denominados “enterotipos” (Arumugam, et al, 2011). Cada enterotipo se distingue por las vías metabólicas a partir de las cuales obtienen energía de los nutrientes disponibles y por las diversas vitaminas que sintetizan. El primer enterotipo se caracteriza por la abundancia de *Bacteroides*, que obtiene energía de la fermentación de proteínas y grasas de origen animal. Mientras que *Prevotella* se ha asociado a una dieta rica en hidratos de carbono. El tercer enterotipo es rico en *Ruminococcus*, que se distingue por degradar mucinas y la celulosa presente en la pared de los tejidos vegetales. De manera interesante, la distribución de estos enterotipos no está relacionada aparentemente con características fenotípicas como: sexo, edad, IMC y nacionalidad. Se especula que esta agrupación en enterotipos pudiera estar asociada con patrones dietéticos de larga evolución (Lozupone et al, 2012; Wu et al, 2011).

### **3.1.3 AGCC.**

La microbiota fermenta polisacáridos no digeribles a ácidos grasos de cadena corta: acetato, butirato y propionato, su producción en una relación molar es de 60:20:20, respectivamente. Los AGCC son absorbidos, oxidados y permiten el rescate adicional de energía (Icaza-Chávez, 2013). Además de mejorar y regular la respuesta inmune del huésped, los AGCC también son la principal fuente de energía de los colonocitos, reducen el consumo energético y modulan el metabolismo de lípidos (figura 3), por ejemplo se ha descrito que el acetato es captado por el hígado que sirve como sustrato para la síntesis de colesterol y triglicéridos (Maslowski y Mackay, 2011; Schwartz et al, 2009). Por otra parte, se sabe que los individuos

obesos tienen niveles elevados de AGCC y menor energía residual de la dieta en las heces (Vrieze et al, 2010).

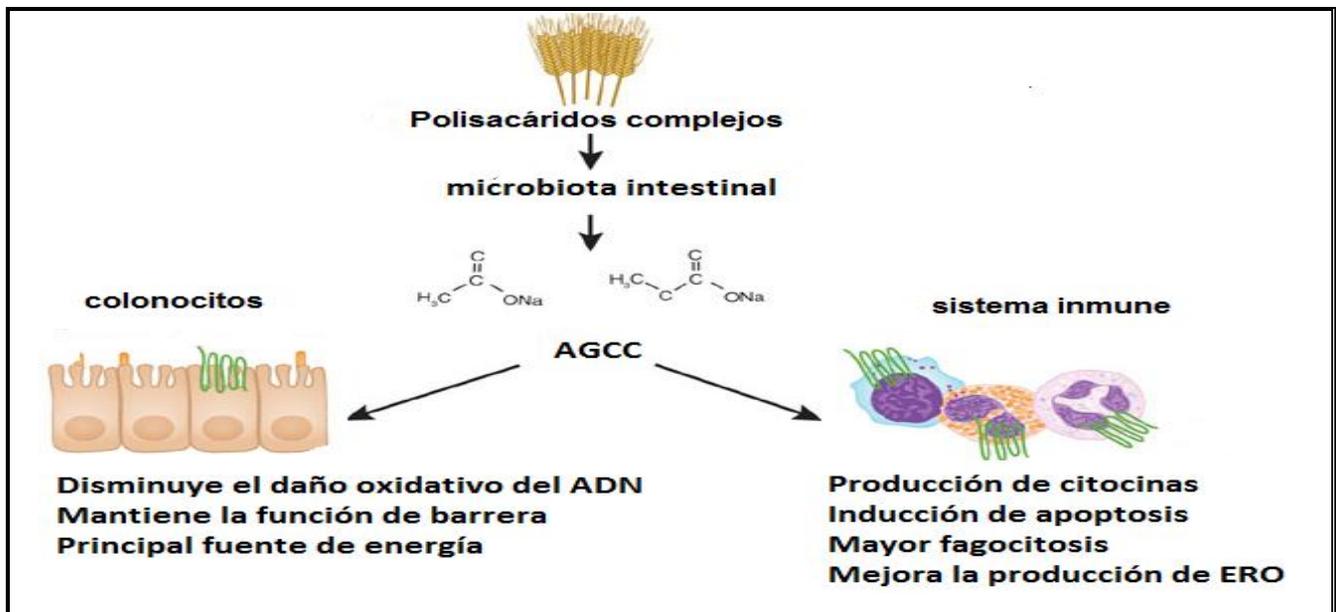


Figura 3. Funciones de los AGCC en el huésped.

Adaptado de: Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. Nat Immunol. 2011; 12:5-9.

### 3.3 Microbiota, Obesidad y complicaciones metabólicas.

Evidencias recientes sugieren una fuerte asociación entre las enfermedades metabólicas y la composición de la microbiota del intestino. Algunos autores han señalado un aumento de la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* en la microbiota como biomarcador de predisposición a la obesidad, DT2 y síndrome metabólico (Roberfroid, 2010). En sujetos con DT2, se ha visto que la microbiota intestinal se caracteriza por una menor abundancia de *Bifidobacterium spp.* y *Faecalibacterium prausnitzii*, conocidos por tener actividad anti-inflamatoria (Gotteland, 2013; Furet et al, 2010). Por otra parte, Larsen et al, reportaron una reducción significativa en la proporción de *Firmicutes* (clase Clostridia) en adultos con DT2. Un estudio en gemelos reveló que los gemelos obesos tenían diferente composición bacteriana intestinal comparada con los hermanos delgados, incluyendo una marcada reducción de *Bacteroidetes* y menor diversidad bacteriana (Turnbaugh et al, 2008). En mujeres embarazadas se asoció el sobrepeso con aumento en la cantidad de *S.aureus* y *E.coli* (Santacruz et al, 2009). En sujetos obesos se ha descrito una mayor cantidad de la familia *Prevotellaceae* y arqueas metanogénicas (Zhang, et al 2009). Por otro lado, en pacientes obesos después de la

pérdida de peso, se observó un descenso en las poblaciones de *Enterobacterias* y bacterias sulfato-reductoras (*Desulfuvibrio*) y un aumento en la concentración de *B.fragilis* (Angelakis et al, 2012). De particular interés han sido los estudios de la microbiota en población infantil, los cuales muestran asociación de distintos géneros bacterianos con la obesidad. Un estudio realizado en niños caucásicos mostró que una menor concentración de *Bifidobacterium* y mayor de *Staphylococcus aureus* durante el primer año de vida puede ser útil para predecir obesidad a los 7 años de edad, lo que sugiere que la composición de la microbiota intestinal sobre la obesidad se puede observar desde edades tempranas (Kalliomäki, 2008). En niños de una comunidad rural en la India, el género *Faecalibacterium prausnitzii* mostró mayor proporción en los niños obesos (Balamurugan et al, 2010). En contraste, hay estudios que no observan diferencias significativas en las poblaciones de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* entre sujetos obesos y delgados (Duncan et al, 2008; Zhang et al, 2009). Incluso algunas investigaciones han reportado resultados contradictorios (Schwiertz et al, 2009; Nadal et al, 2009) lo cual puede explicarse en parte por las cohortes pequeñas en cada estudio, las distintas poblaciones estudiadas y los diferentes métodos utilizados. Cabe señalar que aún no se ha determinado claramente si las alteraciones de la microbiota son causa o consecuencia de la obesidad.

### **3.3.1 Microbiota intestinal e inflamación.**

La obesidad es considerada un estado de inflamación de bajo grado y está asociada a niveles plasmáticos elevados del Lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas (Sun, 2010). Se sabe que el LPS es un potente desencadenante de la respuesta inmune innata y está fuertemente vinculado con la adiposidad, síntesis *de novo* de triglicéridos y RI. Recientemente, se ha evidenciado que el consumo de una dieta alta en grasas y en proteínas, así como baja en fibra, incrementa fuertemente la permeabilidad intestinal y aumenta los niveles plasmáticos de LPS (Cani et al, 2007). La circulación de LPS en la sangre refleja el paso de fragmentos bacterianos a través del intestino, ya sea mediante la absorción por los enterocitos o transporte de LPS dependiente de quilomicrones (Griffiths, 2004). Este fenómeno es conocido como “endotoxemia metabólica” y se asocia con la pérdida de *Bifidobacterium*, bacteria implicada en el mantenimiento e integridad de la barrera intestinal. Otro mecanismo que se ha propuesto para explicar la endotoxemia es que el elevado contenido de grasa de la dieta reduce la expresión de dos genes que codifican proteínas (ZO-1 y ocludina) que mantienen

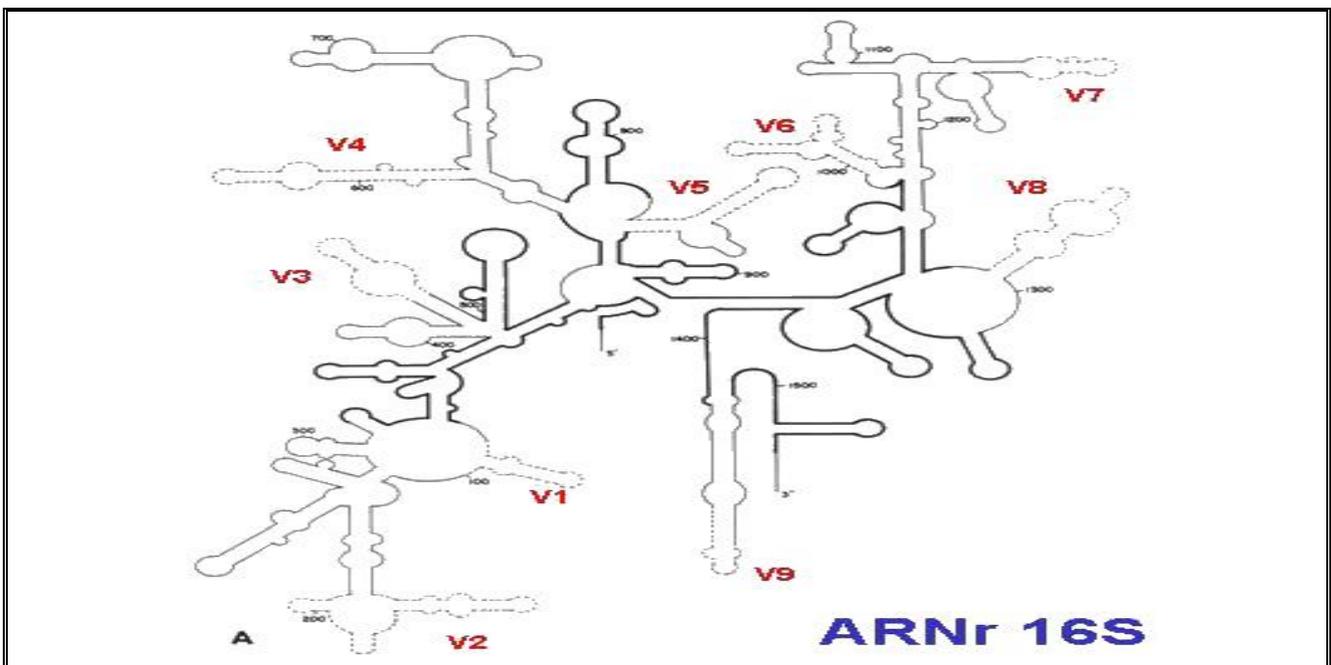
uniones fuertes entre las células epiteliales del intestino. En este contexto se ha demostrado que tanto los LPS de las bacterias como los AG de la dieta pueden activar el receptor toll tipo 4 (TLR4) e inducir la síntesis de citosinas inflamatorias como: TNF- $\alpha$  IL-6, IL-1B, con la inducción de RI, además el incremento de LPS en plasma tiene un efecto deteriorante en el metabolismo de glucosa. Se ha descrito que el TNF-  $\alpha$  contribuye en el desarrollo de la resistencia a la insulina mediante un aumento excesivo en la fosforilación de serina en el sustrato receptor de la insulina intracelular-1 (IRS-1), inhibiendo la señalización intracelular de la insulina, lo que conduce a un excesivo almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo y hepático (Cani et al, 2007; Ruan, 2007).

#### **4. TÉCNICAS MOLECULARES BASADAS EN EL ESTUDIO DEL GEN ARNr 16S**

Durante los últimos años, el conocimiento sobre la composición y la función de la microbiota intestinal se ha ampliado considerablemente debido al progreso de técnicas moleculares independientes de cultivo de microorganismos, las cuales se basan en el análisis de la secuencia del gen que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal (16S ARN). Esta molécula es habitualmente la más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, y permite analizar poblaciones de microorganismos sin necesidad de aislarlos y cultivarlos (Woese, 1987). La secuenciación del gen ARNr 16S se enfoca principalmente en cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, incluyendo bacterias no cultivables, o muy complicadas de cultivar ya sea por su crecimiento lento o por sus requerimientos nutricionales. En estas condiciones, la caracterización molecular basada en el ARNr 16S representa una ventaja tanto en tiempo como en precisión (Amaral-Zettler et al, 2008).

**4.1 ARNr 16S:** Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos (nt), codificado por el gen *rrs*, el cual presenta nueve regiones variables que están flanqueadas por regiones altamente conservadas en la mayoría de las bacterias que permiten el diseño de oligonucleótidos o primers específicos mediante la técnica de PCR, para cuantificar microorganismos y estudiar su diversidad (figura 4) (Claesson et al, 2010). El 16S ARNr presenta características peculiares por las cuales fue considerado como cronómetro molecular (Woese, 1987). Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las

bacterias, cuya estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado. Las diferencias en las secuencias de nucleótidos entre dos organismos distintos, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellos. Dada la longitud de la secuencia del gen resulta relativamente fácil secuenciar los fragmentos de 16S ARNr. En la actualidad existen amplias bases de datos en continuo crecimiento como el Ribosomal Database Project, el GenBank y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) las cuales contienen miles de secuencias de ARNr, pertenecientes a un gran número de microorganismos.



**Figura 4. Estructura secundaria del ARN ribosomal 16S bacteriano. Se muestran las nueve regiones variables y altamente conservadas entre especies de bacterias.**

**Adaptado de: Rodicio MR, et al. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica**

#### **4.1 Secuenciación**

Históricamente hay dos métodos de secuenciación de ADN. La secuenciación química desarrollada por Gilbert y Maxam, y el método de Sanger que usa dideoxinucleótidos. En los últimos años, los rápidos avances en las tecnologías de secuenciación han permitido secuenciar e identificar un gran número de bacterias mediante el análisis del gen ARNr 16S, de manera más rápida y con un costo menor que la secuenciación tipo Sanger. Además, estas técnicas evitan el paso previo de clonación y/o cultivo, permitiendo que las

comunidades bacterianas puedan ser evaluadas con una mayor resolución e identificando especies menos abundantes (Maccaferri, 2011).

#### **4.1.1 Pirosecuenciación.**

La primera aproximación a la secuenciación masiva en paralelo está basada en la pirosecuenciación, donde la cantidad de reactivos requeridos se minimiza al máximo (nanoreacciones), se abarata el coste por base leída y se obtiene información taxonómica de alta fidelidad que permite la investigación simultánea de varias muestras por corrida. El primer equipo comercial de secuenciación masiva (Secuenciador GS 20™) fue desarrollado por la empresa Roche, que tenía una capacidad para secuenciar 20 millones de bases por corrida en 4 horas. En el 2007, mejorando la cinética de secuenciación apareció el modelo GS-FLX capaz de producir hasta 100 millones de bases en un tiempo similar y produce alrededor de 400.000 lecturas (Droege y Hill, 2008). Actualmente, las dos plataformas de secuenciación masiva más utilizadas son el sistema 454 de Roche (Wang et al, 2012), el cual permite obtener secuencias de un tamaño de 600 pb y la plataforma Illumina (Lazarevic et al, 2009), la cual proporciona lecturas de secuencias más cortas de aproximadamente 150 pb, con una mayor profundidad (número de lecturas) y a un menor costo (Qin et al, 2010, Shokralla et al, 2012).

## II JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Aun cuando la dieta y la actividad física han sido ampliamente reconocidas como los factores de riesgo modificables más importantes para el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones metabólicas (Rivera et al, 2012), éstas no explican en su totalidad la alta prevalencia de obesidad y la presencia de complicaciones metabólicas. Por ello, otros factores como el desequilibrio de la microbiota intestinal (disbiosis) han sido recientemente propuestos para contribuir en el desarrollo de la obesidad, resistencia a la insulina y otros rasgos de riesgo cardiometabólico. Diversos estudios han mostrado que un aumento en la relación de las filas *Firmicutes/Bacteroidetes* se asocia a la presencia de obesidad y podría ser un marcador de predisposición de complicaciones metabólicas. Sin embargo, ha sido la caracterización más fina a nivel de género y/o especie la que ha permitido obtener los resultados más interesantes en los distintos grupos de estudio, observándose diferencias en género y/o especie dependiendo del origen de la población y del fenotipo estudiado.

Considerando que población infantil mexicana presenta una de las prevalencias más altas de obesidad y comorbilidades asociadas (Gutiérrez-Delgado et al, 2012), es de gran importancia identificar factores de riesgo modificables adicionales a la dieta y el ejercicio que permitan proponer medidas preventivas integrales más eficaces para prevenir, controlar y/o disminuir la incidencia de obesidad y sus complicaciones metabólicas en escolares. Por ello, en este estudio se propone primeramente caracterizar la microbiota intestinal asociada a la obesidad y/o a sus complicaciones metabólicas en población infantil.

Debido a que a la fecha no existen reportes que describan la estructura y composición de la microbioflora intestinal de la población mexicana esta estrategia permitirá un mejor entendimiento de los perfiles de la microbiota intestinal que pudieran condicionar a un mayor riesgo de obesidad y/o complicaciones metabólicas desde la infancia, generando conocimientos potencialmente útiles para el diseño de tratamientos dietarios que permitan modificar la composición de la microbiota intestinal hacia un estado de equilibrio protector contra uno de los principales problemas de salud pública en México, como es la obesidad y sus alteraciones metabólicas

### III OBJETIVOS

#### General

- Evaluar la asociación de la microbiota intestinal con la obesidad y/o sus complicaciones metabólicas en población infantil mexicana

#### Específicos

- Identificar perfiles de microbiota intestinal relacionados con el desarrollo de obesidad y/o complicaciones metabólicas en población infantil.
- Caracterización bacteriana a nivel de filo (*Firmicutes* y *Bacteroidetes*) como a nivel de género mediante secuenciación masiva.
- Evaluar la interacción de la microbiota intestinal con los componentes de la dieta, así como su asociación con la obesidad y sus complicaciones metabólicas.
- Determinar la composición de la microbiota intestinal de niños con peso normal, niños obesos sin complicaciones y niños obesos con complicaciones metabólicas y correlacionar los resultados con variables bioquímicas y antropométricas.

## IV MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de casos y controles para identificar:

- 1) Perfiles de la microbiota intestinal asociados a la presencia de obesidad (comparando niños con peso normal vs. niños con obesidad sin complicaciones metabólicas)
- 2) Perfiles de la microbiota asociados a las complicaciones metabólicas de la obesidad (niños con obesidad sin complicaciones metabólicas vs. niños con obesidad con complicaciones metabólicas).

Para ello, se analizaron las regiones hipervariables de la V3 a la V9 de los genes 16S rRNA mediante pirosecuenciación, lo que permitió un análisis detallado de la diversidad microbiana intestinal. Por lo cual, un punto esencial del trabajo fue obtener de los niños participantes una muestra de materia fecal.

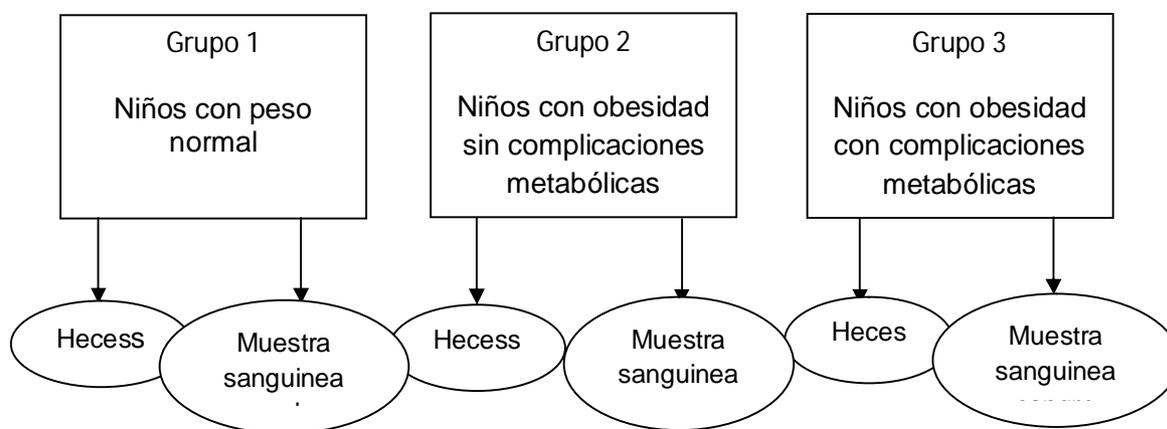


Figura 5. Diseño experimental del estudio de la microbiota intestinal mediante pirosecuenciación.

### 5.2 Población de estudio

El estudio se llevó a cabo en niños mexicanos mestizos en al menos tres generaciones con edades de entre 6-12 años que asistieron a la Convivencia Infantil del Sindicato Nacional de Trabajadores de la Secretaría de Salud del 2013, provenientes de distintas delegaciones del Distrito Federal y municipios del Estado de México.

Los criterios de exclusión para seleccionar a los participantes del estudio fueron: uso de antibióticos o probióticos dos semanas antes del estudio, enfermedades gastrointestinales crónicas (ej. Enfermedad de Crohn), diagnóstico de enfermedades infecciosas agudas y enfermedades que alteren de manera importante el peso corporal.

Previamente, se obtuvo el consentimiento informado de los padres o responsables de los niños así como el asentimiento de los infantes para participar en el Proyecto “Estudio de la asociación de la microbiota intestinal con la obesidad y sus complicaciones en población mexicana”. Por otro lado, los padres contestaron un cuestionario en donde se recolectó información referente al nivel socioeconómico, historia clínica, antecedentes heredofamiliares patológicos o no patológicos, cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos, recordatorio de 24 horas, uso de medicamentos y actividad física. Con el recordatorio se procesaron los datos de las características y cantidades de distintos alimentos mediante el software NutriKcal®VO. Con la información de los equivalentes de azúcar, carne, cereal, fruta, grasa, leche, leguminosas, verduras, bebidas se obtuvieron las kilocalorías totales y las proporciones de los macro nutrientes.

### **5.3 Mediciones y recolección de muestras**

Las mediciones antropométricas como peso, talla, circunferencia de cintura, cadera y muñeca se tomaron de acuerdo a la técnica de Lohman con equipos que cumplen con las normas de calidad establecidas internacionalmente. Se determinó la composición de grasa corporal mediante impedancia bioeléctrica (BIA Akern-RJL Systems). Posteriormente se obtuvieron las muestras de sangre periférica en un ayuno de 8 horas de todos los niños participantes, se separó el suero de las muestras y se realizó la determinación del perfil bioquímico. Por otra parte, a cada participante se le proporcionó el material necesario con las instrucciones adecuadas para recolectar una muestra de materia fecal. Después de la recolección, las heces fueron etiquetadas y almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso posterior para la extracción de ADN bacteriano.

**Determinaciones bioquímicas;** se utilizaron distintos métodos enzimáticos para medir los siguientes parámetros bioquímicos: niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y transaminasas. Se estimó la RI mediante el índice HOMA y se midió la proteína C reactiva de cada muestra. Todas las mediciones bioquímicas se

realizaron en colaboración con el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ.

De un total de 750 niños (6-12 años) que se incluyeron en el estudio se captaron 650 muestras fecales. Para el presente trabajo se seleccionaron y analizaron las muestras de 39 niños agrupados como se mencionó previamente. Al final se eligieron intencionadamente 13 niños por cada grupo pareados por edad, IMC, y sexo que cumplieran los criterios de inclusión. Para definir el síndrome metabólico los infantes debían cumplir con al menos tres de los cinco rasgos descritos en la tabla 2.

<b>Obesidad (Cintura abdominal)</b>	<b>Triglicéridos</b>	<b>HDL</b>	<b>Presión arterial</b>	<b>Glucosa</b>
> P 75 por edad y género	≥ 100 mg/dl	< 50 mg/dl	≥ P 90 por edad, género y talla	≥ 110 mg/dl

**Tabla 2. Criterios de Ferranti para definir el Síndrome metabólico en población infantil.**

#### **5.4 Extracción de ADN bacteriano.**

Para la extracción de ADN de las muestras fecales se usó el QIAamp DNA Stool Mini kit-Qiagen (Alemania) de acuerdo a las instrucciones especificadas por el fabricante. La muestra fecal se manipuló en todo momento en hielo seco para evitar la contaminación de crecimiento de bacterias por efecto de la temperatura. Se disgregó de 0.18 a 0.22g de muestra fecal en 1.4mL de Buffer ASL (detergente) y se calentó durante 5 minutos a 95 °C para provocar la ruptura de la pared bacteriana. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min y se añadió 1 tableta de Inhibitex con el objetivo de inhibir sustancias que interfieren con la técnica por PCR. Después se agregó 15 µL de proteinasa K y se incubó a 70 °C durante 30 min. Enseguida se adicionó 200 µL de etanol frío para precipitar el ADN. Para finalizar, se realizaron dos lavados con buffer para limpiar impurezas y por último, se eluyó el ADN y se traspasó a un nuevo tubo. El ADN extraído se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

### **5.5 Calidad e integridad del ADN.**

Para evaluar la pureza y concentración del ADN por  $\mu\text{L}$  de buffer de cada una de las muestras, se realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nanómetros empleando el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®). Se consideró que las relaciones entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O. son las óptimas. Para corroborar la integridad del ADN se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, previamente teñido con bromuro de etidio, utilizando TAE 10X como amortiguador (Tris-HCl 0.9 M (pH=7), Ácido acético,  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2mM); se utilizó azul de bromofenol ( $1\mu\text{L}$ ) al 0.05% como colorante. La migración se efectuó a 70 volts por 30 min, y se observó en un transiluminador de luz UV (Sambrook et al, 1990).

### **5.6 Amplificación del gen 16S ARNr.**

Para la amplificación de ADN bacteriano se empleó un termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) en un sistema de microplaca de 96 pocillos. El volumen total de todas las reacciones fue de 25  $\mu\text{L}$ . Para la mezcla se utilizó el kit Platinum® PCR SuperMix, High Fidelity (enzima DNA polimerasa; 66 mM Tris- $\text{SO}_4$  (pH 8.9); 19.8 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2.4 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 220  $\mu\text{M}$  dNTPs) (Invitrogen) 2  $\mu\text{L}$  de DNA (1ng/  $\mu\text{L}$ ) y 0.5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (10mM) (Forward y Reverse51)

### **5.7 Pirosecuenciación**

El sistema GS-FLX Titanium (Roche, Alemania) fue empleado para analizar la composición bacteriana intestinal. Una vez amplificado el gen ARNr 16S como paso previo a la pirosecuenciación, se purificó el ADN con el kit Agencourt® AMPure® XP, que mediante unas perlas magnéticas se fijó el ADN de la muestra. A continuación, se cuantificó la cantidad y calidad del ADN mediante QUIBIT y después se hizo un pool equimolar con el amplicón purificado de cada una de las muestras. En total se realizaron dos corridas, una para las muestras de los niños y otra para las niñas.

Inicialmente el ADN del pool se fragmentó en fracciones de 200 a 700 pb aproximadamente, mediante un proceso llamado "nebulización" y se añadieron dos secuencias adaptadoras a cada fragmento de ADN (adaptador A y B). A continuación, se realizó una amplificación mediante unas microperlas en una emulsión de agua y aceite de tal forma que cada perla quedó dentro de una gota con todos los reactivos y enzimas necesarias para la PCR. Se

amplificaron en cada microperla un gran número de secuencias. El siguiente paso fue cargar las microperlas en una placa conocida como “PicoTiterPlate” la cual tenía más de un millón de pocillos de 44µm de diámetro, de tal manera que al ingresar una perla por cada pozo, permitió realizar una reacción de secuenciación individual. Después de agregar las perlas con ADN y enzimas, el “PicoTiterPlate” se introdujo en el secuenciador. El equipo automatizó la secuenciación, la captura de graficas e imágenes y la interpretación. En cada pocillo, la incorporación de cada nucleótido durante la polimerización de ADN, libera una molécula de pirofosfato (PPi), que al interactuar con algunas enzimas como la luciferasa produce una señal quimioluminiscente que es capturada por una cámara de detección de fotones con la ayuda de un potente programa de computo. La intensidad del haz de luz es directamente proporcional al nucleótido que esté leyendo, lo cual permite determinar el orden de nucleótidos en la secuencia de ADN. El esquema del procedimiento de la pirosecuenciación se detalla en la figura 6.

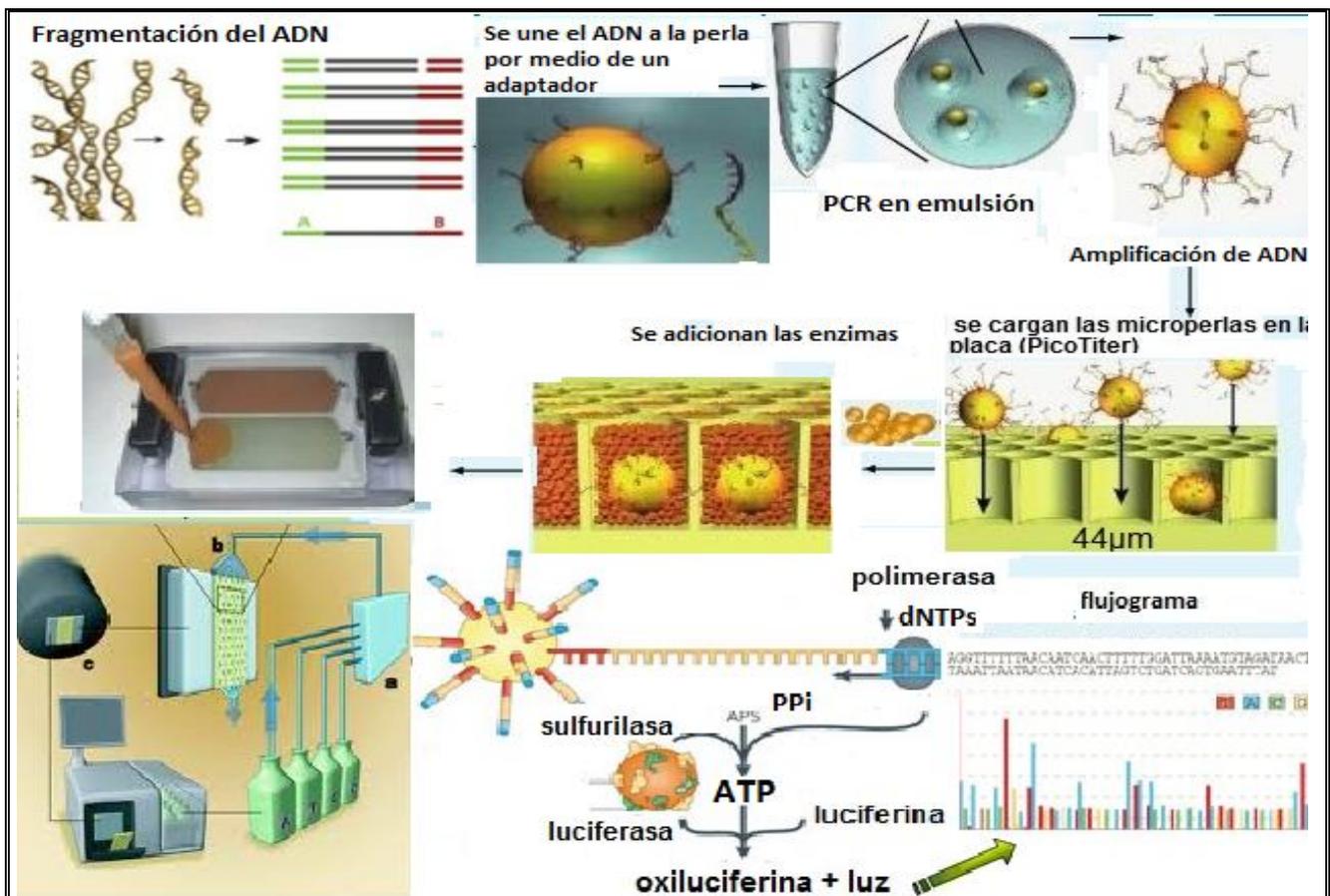


Figura 6. Procedimiento general del fundamento de pirosecuenciación 454 que se utilizó para secuenciar el ADN bacteriano.

Adaptado de: Future Virol 2011.

### **5.8 Análisis bioinformático**

El análisis de la composición y diversidad bacteriana intestinal fue realizado mediante el software bioinformático QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Inicialmente se obtuvieron las secuencias crudas. Como paso previo a analizar las secuencias, se eliminaron posibles errores y secuencias de mala calidad. Estas secuencias anómalas pueden generar errores en el análisis de diversidad. Mediante el programa QIIME se identificaron “los códigos de barra” para ubicar las muestras y se agruparon las secuencias similares en unidades taxonómicas operacionales (OTUs). A continuación, se idéntico la taxonomía de las secuencias usando la base de datos GreenGenes como referencia. Las OTUs se asignaron con 97% de similitud con la secuencia de referencia y se consideraron como desconocidas aquellas secuencias que compartieron menos de un 50% de similitud con las existentes en la base de datos.

### **5.9 Análisis estadístico.**

Para evaluar las diferencias en la composición de la microbiota intestinal así como su asociación con la obesidad entre los distintos grupos de estudio se utilizó el Programa estadístico SPSS v15.0 (SPSS Chicago, IL, USA). Para la comparación entre los grupos de estudio se utilizó el test de ANOVA para las variables con distribución normal. Se utilizó la prueba de U Mann-Whitney para comparar las diferencias de las variables sin esa distribución y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las diferencias entre grupos independientes. Así mismo se empleó la prueba de Spearman para un análisis de correlación. En todos los casos el valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### **5.10 Diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio.**

En la figura 7 se ilustra la metodología utilizada en este estudio. Para la caracterización de la microbiota intestinal, empleamos la plataforma de pirosecuenciación para secuenciar los amplicones del gen 16S ARN a partir del ADN extraído de las heces de cada uno los niños incluidos en el estudio. De esta forma se pudo conocer la composición bacteriana intestinal de niños delgados (controles) y compararla con la microbiota de niños obesos sin complicaciones metabólicas y niños con síndrome metabólico. Cabe destacar, que un paso

importante en el trabajo fue el análisis computacional realizado para manejar y analizar las grandes cantidades (millones de secuencias) de datos biológicos obtenidos de la secuenciación masiva.



**Figura 7. Esquema general de la metodología utilizada en el estudio de la microbiota intestinal**  
 Adaptado de: Microbiología ambiental CENPAT-CONYCEP  
<http://www.cenpat.edu.ar/fisicambien/LabMicroAmb.htm>

## V.RESULTADOS

### 6.1 Descripción de parámetros antropométricos y bioquímicos

En la tabla 4 se presenta una descripción de las principales características antropométricas y bioquímicas de la población incluida en el estudio comparando los tres grupos de estudio: niños delgados, obesos sin complicaciones metabólicas y obesos con complicaciones

metabólicas. Como se esperaba, las principales diferencias se observaron en los parámetros relacionados a la obesidad (peso, cintura, porcentaje de grasa corporal, presión arterial sistólica y diastólica e IMC), así como en algunos parámetros bioquímicos incluyendo niveles de triglicéridos, GGT, HDL y el índice HOMA-IR.

**Tabla 3. Características antropométricas y bioquímicas de la población infantil.**

Variables	Delgados n= 13	Obesos sin complicaciones n=13	Obesos con complicaciones n=13	P ANOVA
Edad ( años)	9 ± 1.9	8.5 ± 1.33	9.7 ± 1.8	0.293
Peso ( kg)	<b>31.8 ± 7.4</b>	<b>41.8 ± 7.5</b>	<b>53.4 ± 8.4</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
Cintura (cm)	<b>61.1 ± 7.2</b>	<b>74.1 ± 7.3</b>	<b>82.7 ± 8.2</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
IMC kg/m <sup>2</sup>	<b>16.9 ± 1.2</b>	<b>22.6 ± 2.6</b>	<b>25.7 ± 2.1</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
Z-score de IMC	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>1.7 ± 0.4</b>	<b>1.9 ± 0.4</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
P.A. Sistólica (mmHg)	<b>95 ± 5.3</b>	<b>98.3 ± 8.9</b>	<b>110.8 ± 7.8</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
P.A. Diastólica( mmHg)	<b>63 ± 7.8</b>	<b>67.8 ± 5.4</b>	<b>79 ± 4.3</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
% de Grasa	<b>30.7 ± 3.9</b>	<b>42.7 ± 5.2</b>	<b>46.6 ± 4.9</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
Glucosa mg/dl	88.7 ± 5.9	90.2 ± 5.5	93 ± 7	0.211
Triglicéridos mg/dl	<b>63.9 ± 14.2</b>	<b>74.6 ± 16.7</b>	<b>185.2 ± 55.6</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
GGT UI/L	<b>12.7 ± 2.8</b>	<b>16.2 ± 2.7</b>	<b>20.2 ± 9.5</b>	<b>0.011</b>
AST UI/L	30.7 ± 5.9	31.8 ± 6.3	30.8 ± 12.2	0.942
ALT UI/L	18.7 ± 6	23.1 ± 6.7	30.7 ± 20.3	0.067
Colesterol mg/dl	164.3 ± 20.5	187.5 ± 27.1	170.1 ± 24.6	0.053
HDL	<b>59.3 ± 8.6</b>	<b>62.8 ± 8.2</b>	<b>39.1 ± 6.1</b>	<b>&lt; 0.001*</b>
LDL	92 ± 12.7	109.7 ± 26	97.3 ± 21.5	0.099
Ácido Úrico mg/dl	4.6 ± 0.7	5.3 ± 0.9	5.9 ± 1.3	0.121
Creatinina mg/dl	0.5 ± 0.1	0.47 ± 0.1	0.55 ± 0.1	0.069
Proteína C reactiva	4.39 ± 2.7	1.76 ± 0.6	1.18 ± 0.8	0.557
HOMA-IR	0.9 ± 0.4	1.22 ± 0.6	3.34 ± 1.47	<b>&lt; 0.001*</b>

\* Diferencias significativas

Los datos se presentan como medias ± Desviación estándar

## 6.2. Amplificación de productos por PCR.

En la figura 8 se incluyen las fotografías de los productos de PCR mediante la amplificación de las regiones variables del gen ARN16s. Se observan los amplicones de algunas de las muestras secuenciadas y algunos productos que no amplificaron, en estos casos se repitió la amplificación por PCR. Se obtuvieron los tamaños esperados (1500pb) y posteriormente se procedió a la pirosecuenciación. En general se obtuvo una buena calidad del producto amplificado esperado.

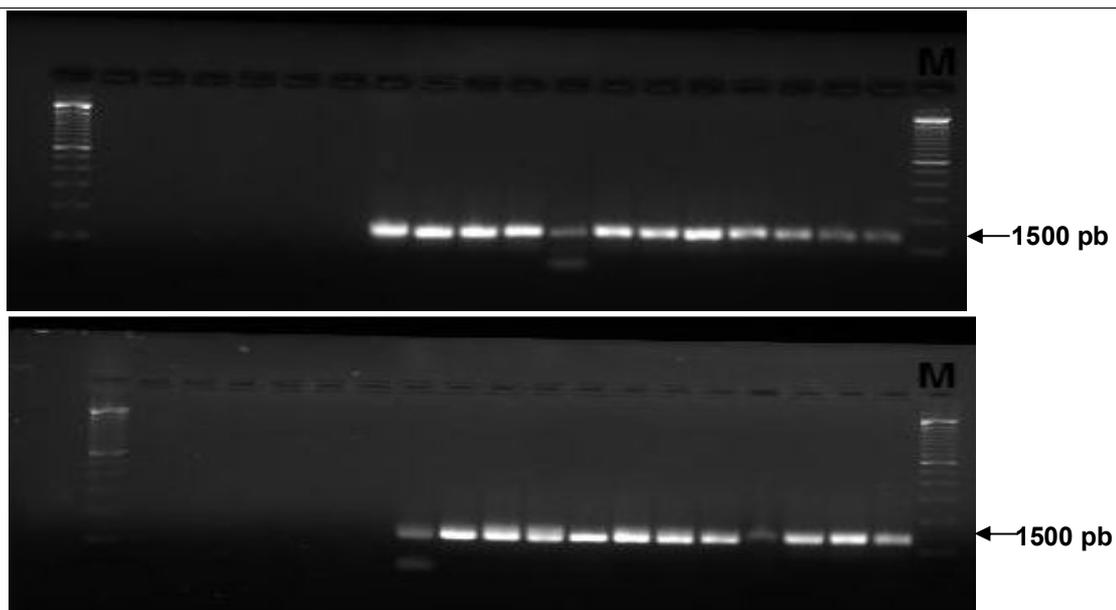
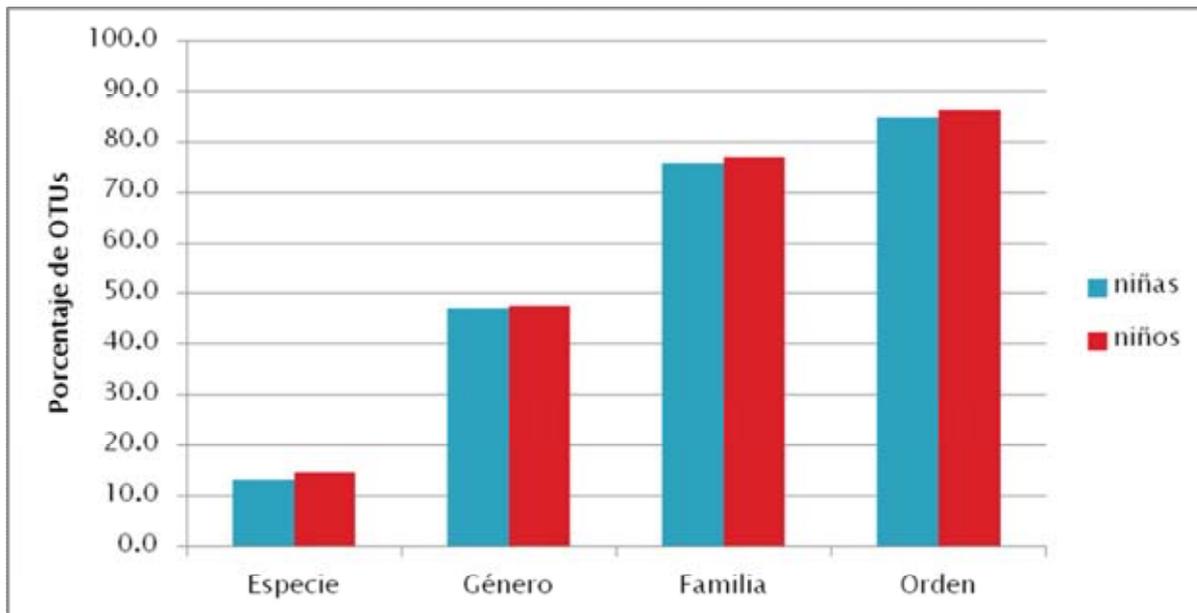


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos obtenidos por PCR, teñido con bromuro de etidio y documentado en un transiluminador con luz UV. (M)= marcador de peso molecular.

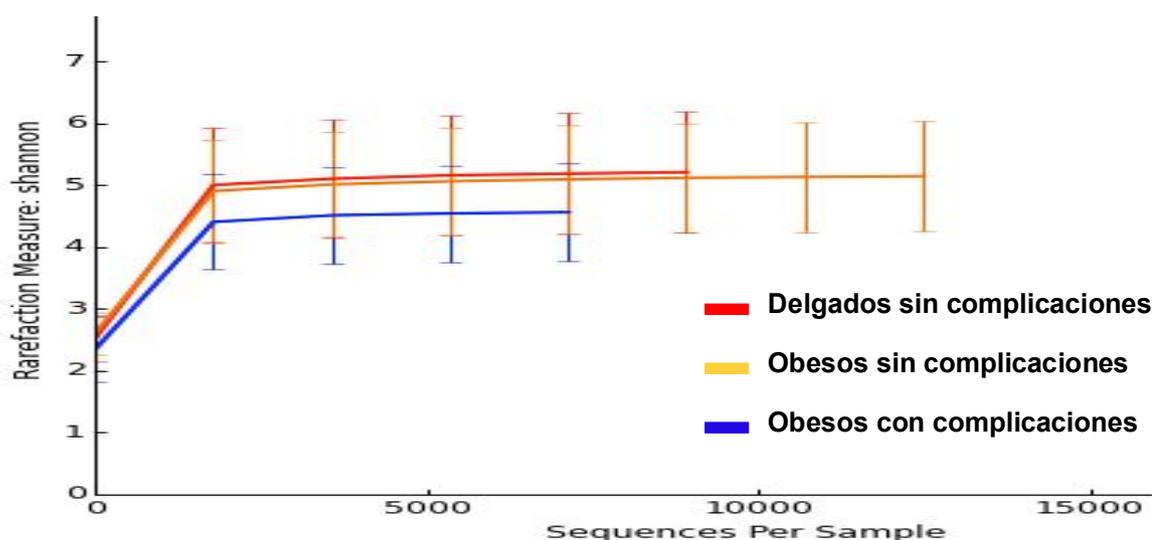
## 6.3 Análisis Bioinformático.

Tras aplicar los filtros de control de calidad de un total de 1, 434,707 lecturas, se obtuvieron 1, 030,778 lecturas del ARNr 16S. Los niveles de clasificación taxonómica y el porcentaje de OTUs determinados con el programa QIIME de las dos corridas realizadas en la gráfica 2. Cabe mencionar que para la corrida de las niñas se obtuvo mayor diversidad con respecto a los niños, se detectaron familias y géneros bacterianos que no estuvieron presentes en los niños.



**Gráfica 2. Comparación de los niveles de clasificación taxonómica de las dos corridas obtenidas de la secuenciación**

En el análisis filogenético de la microbiota intestinal no se encontraron diferencias significativas en la diversidad bacteriana entre los grupos de estudio, sin embargo se aprecia mayor diversidad en la microbiota de niños delgados y obesos sin complicaciones metabólicas con respecto a los obesos con complicaciones metabólicas (gráfica 3). Los principales filos analizados fueron *Actinobacterias*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacterias*, los cuales estaban constituidos por las familias bacterianas representadas en la tabla 4.

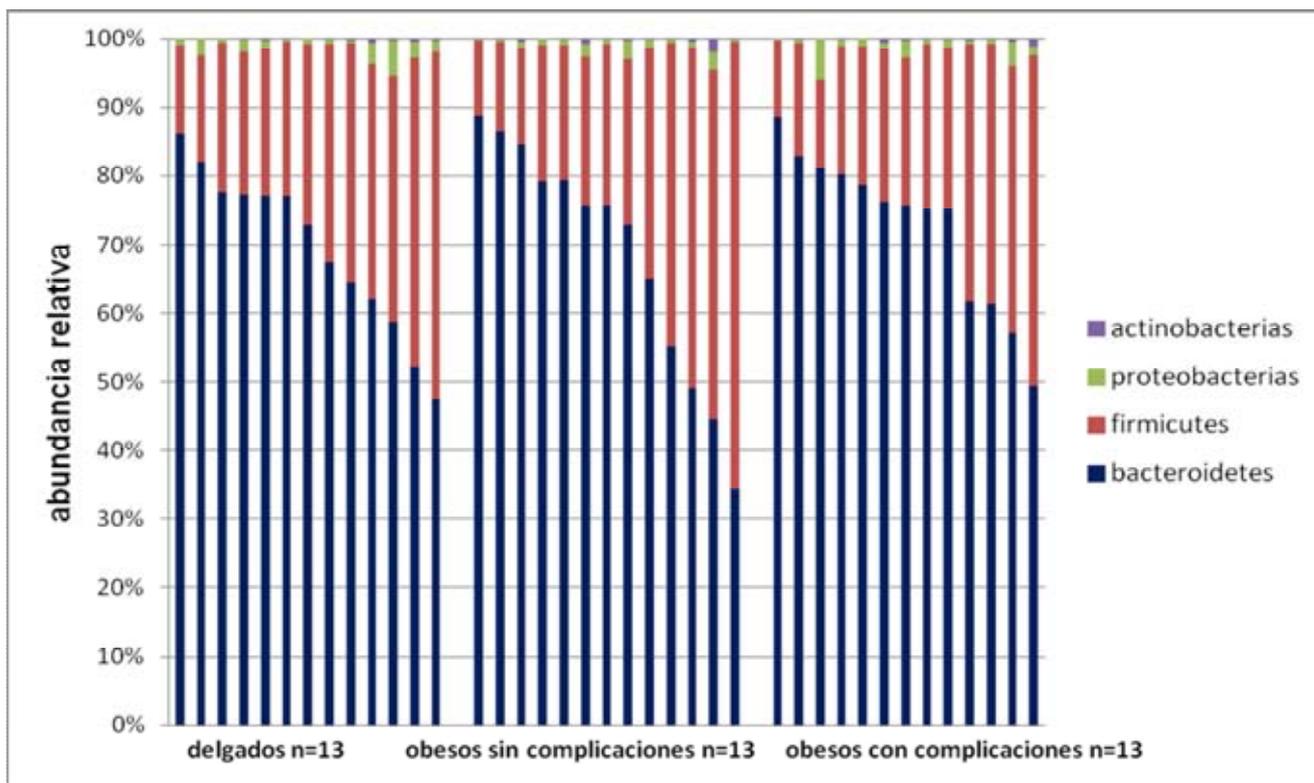


Gráfica 3. Comparación entre la diversidad filogenética y secuencias por muestra entre los distintos grupos de estudio.

Tabla 4. Familias de bacterias identificadas por pirosecuenciación.

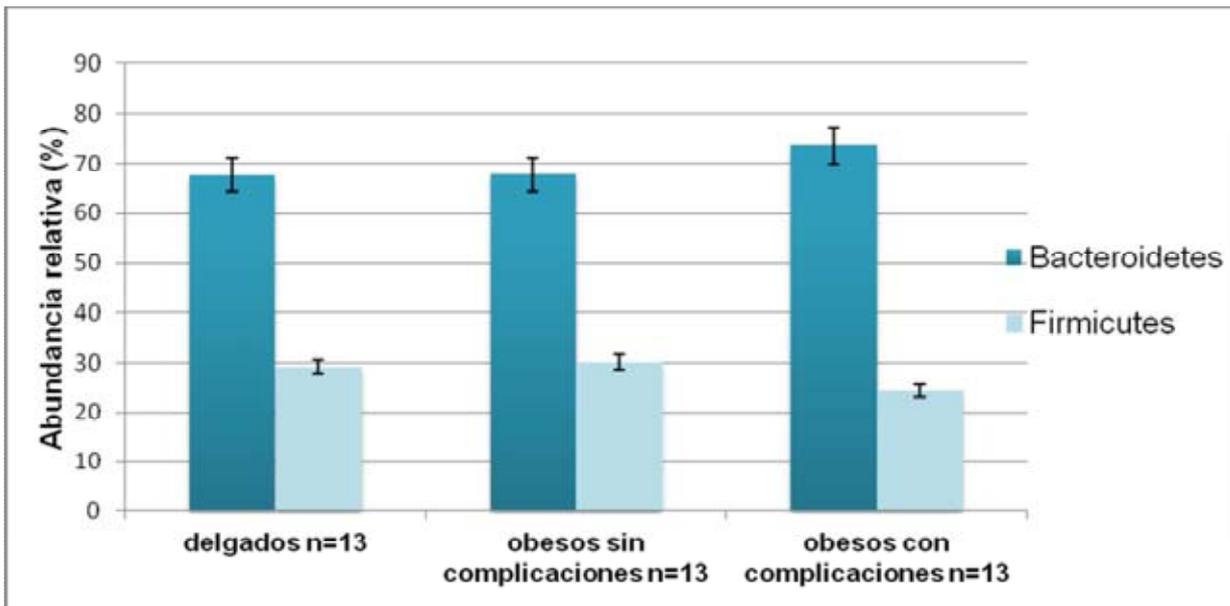
<b><i>Actinobacterias</i></b>	<b><i>Bacteroidetes</i></b>	<b><i>Firmicutes</i></b>	<b><i>Proteobacterias</i></b>
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Christensenellaceae</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
	<i>Barnesiellaceae</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>
	<i>Odoribacteraceae</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Paraprevotellaceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Succinivibrionaceae</i>
	<i>Phorphyromonadaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	
	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>	
	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Veillonellaceae</i>	

Al analizar la composición de la microbiota intestinal de los voluntarios estudiados a nivel de filo, se observó un mayor predominio de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* como se aprecia en la gráfica 4. Se observó un aumento de *Bacteroidetes* en los niños con síndrome metabólico con respecto a los niños con peso normal. Por el contrario, los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteriase* detectaron en menor cantidad. Otros filos no incluidos en la gráfica 4 pero presentes en muy baja proporción fueron *Verrucomicrobia* y *Lentisphaerae* (<0.02 %).

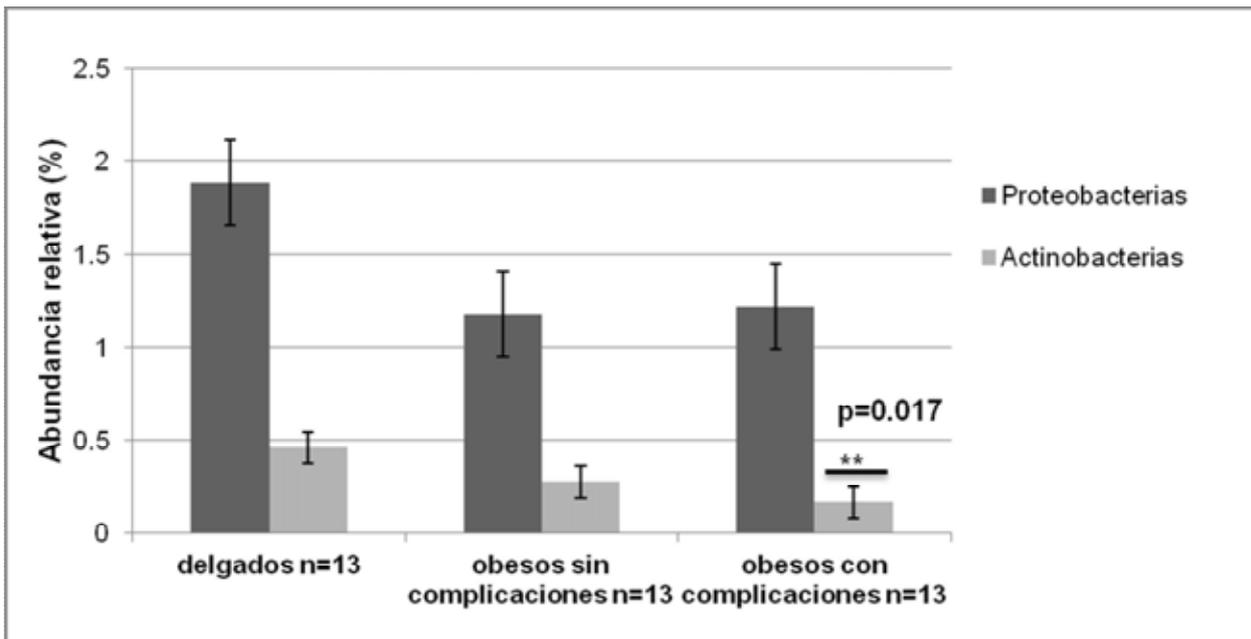


**Gráfica 4. Abundancia relativa a nivel de filo de la composición microbiana intestinal entre los grupos analizados.**

Al comparar los valores de las medianas de los filos entre los grupos de estudio, no se observaron diferencias significativas en las proporciones de *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacterias*. Cuando comparamos las medianas en la abundancia relativa de *Bacteroidetes*, esta aumentó y la de *Firmicutes* disminuyó en los niños obesos con complicaciones metabólicas en comparación a los controles (gráfica 5). Cabe señalar que tanto la proporción de *Firmicutes* como de *Bacteroidetes* en los niños delgados y los obesos sin complicaciones fue muy similar. De manera interesante, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la abundancia relativa de *Actinobacterias* en los niños obesos con complicaciones metabólicas en comparación a los controles ( $p=0.017$ ), notándose una marcada disminución en los grupos con obesidad. Por otro lado, la mediana de la abundancia relativa de *Proteobacterias* aumentó en los controles en comparación a los dos grupos de niños obesos, que presentaron niveles similares en este filo (gráfica 6).



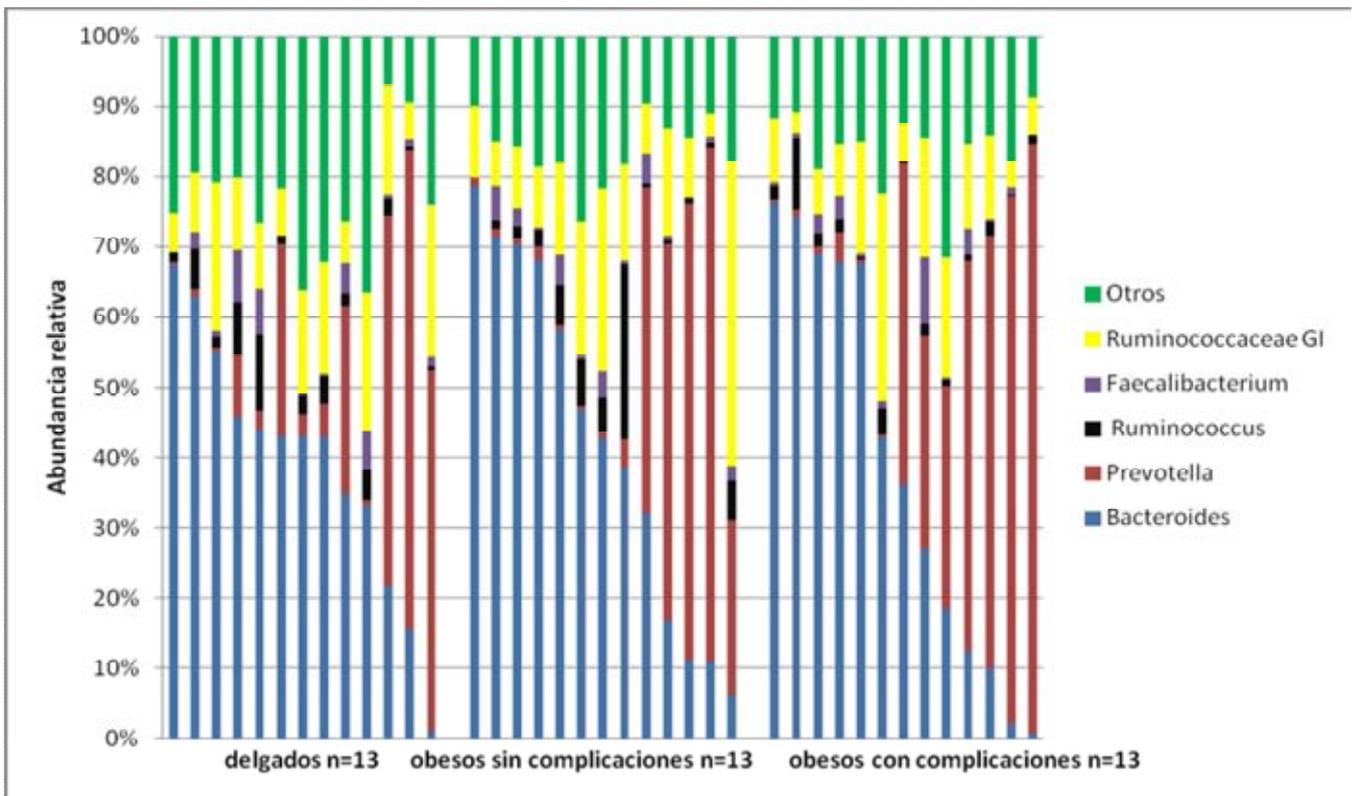
**Gráfica 5. Proporción de Bacteroidetes y Firmicutes**  
 Los datos se presentan como medianas  $\pm$  Desviación estándar



**Gráfica 6. Proporción de Actinobacterias y Proteobacterias**  
 Los datos se presentan como medianas  $\pm$  Desviación estándar \*\* diferencias significativas.

Cuando analizamos a nivel de género la composición de la microbiota intestinal, no se encontraron diferencias significativas para los géneros más prevalentes entre los grupos de estudio, sin embargo la cantidad de *Bacteroides* predominó en la microbiota intestinal de la

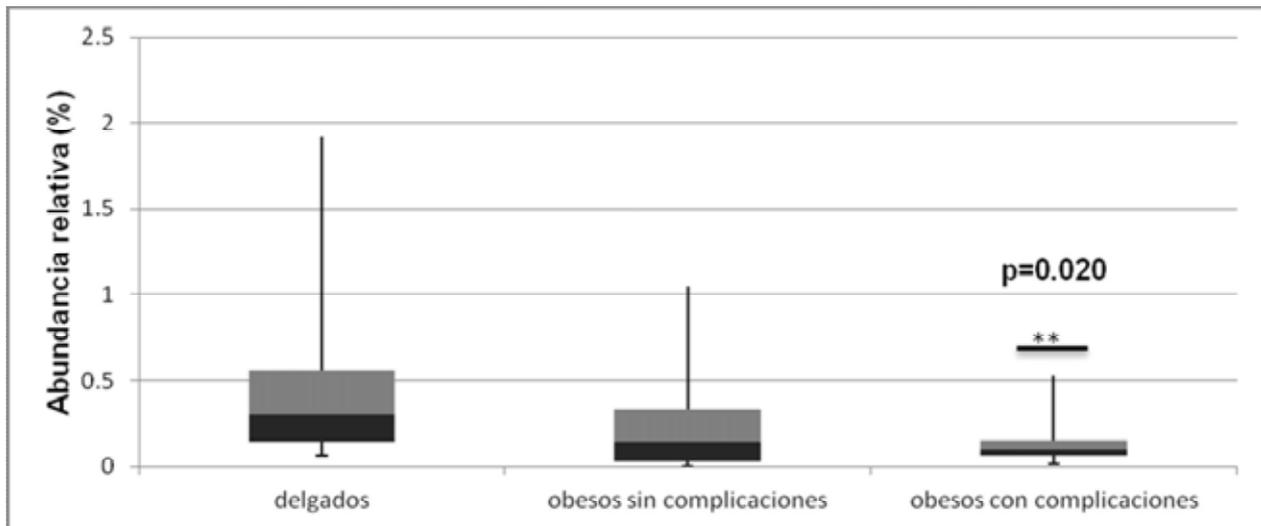
mayoría de las muestras analizadas como lo ilustra la gráfica 7. El segundo género más prevalente fue *Prevotella*. Además se encontró mayor cantidad de otros géneros bacterianos en el grupo de los delgados que en los obesos. Estos géneros detectados en muy baja proporción en todas las muestras fueron: *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Clostridium*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Odoribacter*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Paraprevotella*, *Phascolarctobacterium*, *Roseburia*, *Streptococcus*, *Succinivibrio* y *Sutterella*. Dentro de la familia *Ruminococcaceae* se observó un género indefinido en cantidad pequeña pero considerable en todas las muestras. Tanto *Ruminococcus* como el género indefinido disminuyeron en el grupo de niños obesos con complicaciones con respecto a los otros dos grupos.



**Gráfica 7. Abundancia relativa de los géneros más predominantes en la composición microbiana intestinal entre los grupos analizados. GI= genero indefinido**

Dentro de las *Actinobacterias*, que fue el filo que mostró una diferencia significativa entre los niños con síndrome metabólico y los delgados, a nivel de género, se encontró una disminución estadísticamente significativa en la cantidad de bifidobacterias en el grupo de los obesos con complicaciones metabólicas en comparación a los controles ( $p=0.020$ )(gráfica 8).

Cabe mencionar, que las *Bifidobacterias* representaron casi toda la población de *Actinobacterias*. Por otra parte, la proporción de *Bifidobacterias* mostró una correlación negativa y significativa con el percentil de IMC ( $r=-0.364$ ,  $p=0.023$ ), Z-score del IMC ( $r=-0.333$ ,  $p=0.023$ ) y los niveles de triglicéridos ( $r=-0.341$ ,  $p=0.033$ ) (tabla 5). De manera interesante, se encontró una correlación positiva y significativa con los meses de lactancia materna ( $r=0.385$ ,  $p=0.017$ ).



Gráfica 8. Diferencias en la proporción de Bifidobacterias entre los grupos de estudio. La grafica se presenta en diagrama de cajas. \*\* Diferencias significativas

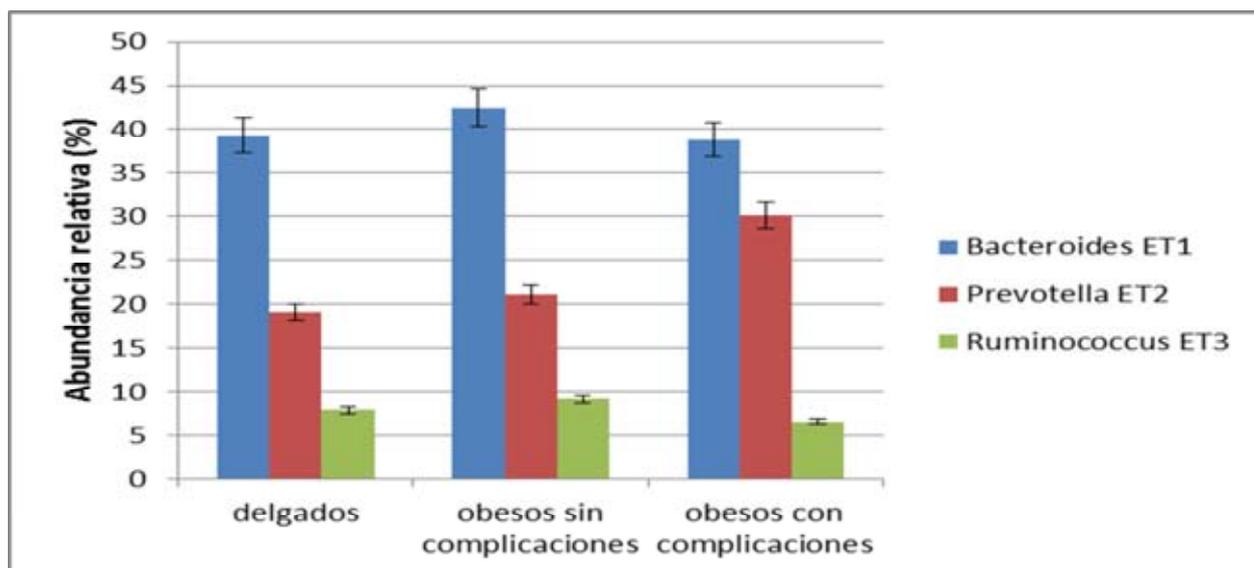
Tabla 5. Correlación entre proporción de Bifidobacterias, parámetros bioquímicos y antropométricos.

Variables	$\rho$ (Rho)	P valor
Colesterol	-0.156	0.341
Triglicéridos mg/dl	<b>-0.341</b>	<b>0.033*</b>
HDL	0.021	0.897
Ácido Úrico mg/dl	-0.267	0.099
Insulina U.I.	-0.266	0.106
IMC kg/m <sup>2</sup>	-0.202	0.218
Z-score de IMC	<b>-0.333</b>	<b>0.038*</b>
Percentil de IMC	<b>-0.364</b>	<b>0.023*</b>
% de Grasa corporal	-0.225	0.178
Lactancia Materna (meses)	<b>0.358</b>	<b>0.017*</b>

Correlaciones significativas \*,  $\rho$  (Rho) Spearman

## 6.4 Enterotipos

Como se mencionó previamente los géneros bacterianos que estuvieron presentes en mayor proporción fueron *Bacteroides* (39-43%) y *Prevotella* (19-31%) en los tres grupos analizados. La prevalencia de estos géneros también denominada como enterotipos fue consistente en las muestras analizadas. En la gráfica 9 se representa la distribución de los enterotipos entre los grupos de estudio. En los niveles de *Bacteroides* no se observaron cambios importantes entre los tres grupos. En contraste, la cantidad de *Prevotella* aumentó gradualmente en los niños con síndrome metabólico respecto a los controles, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Por otra parte, *Ruminococcus* fue el enterotipo menos prevalente. Cuando se realizó un análisis de componentes principales para todas las muestras secuenciadas, se observaron dos agrupaciones que corresponden a los enterotipos 1 y 2 (figura 9).



**Gráfica 9. Abundancia relativa de enterotipos en los grupos estudiados. Los datos se presentan como medianas  $\pm$  Desviación estándar**

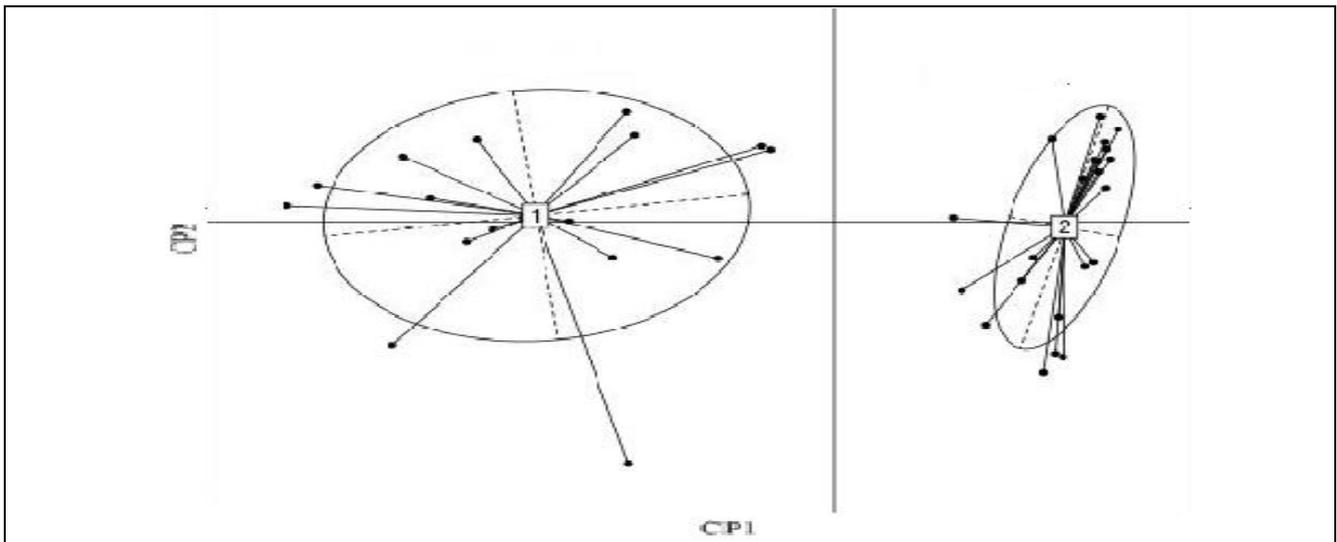


Figura 9. Comparación entre todas las muestras secuenciadas (puntos) mediante un Análisis de Componentes Principales. Los círculos muestran el agrupamiento de las muestras en función del género bacteriano: Bacteroides (Enterotipo 1) y Prevotella (Enterotipo 2).

En este apartado se estimó el efecto de la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal con los nutrimentos específicos a partir del recordatorio de 24 horas. Los resultados se muestran en la tabla 6 para los tres grupos analizados. Cabe mencionar que de todas las muestras secuenciadas se obtuvo la información completa del recordatorio de 24 horas de 14 niños. De manera interesante, la energía procedente de hidratos de carbono aumentó en el grupo con alteraciones metabólicas sin alcanzar significancia estadística.

Tabla 6. Comparación de la ingesta dietaria entre los grupos de estudio.

	Delgados n= 4	Obesos sin complicaciones metabólicas n= 5	Obesos sin complicaciones metabólicas n= 5	P ANOVA
% Energía de proteínas	34.2 ± 10.8	34.1 ± 4.4	30.1 ± 2.7	0.550
% Energía de lípidos	16.7 ± 0.4	21.2 ± 4.1	16.4 ± 1.9	0.103
% Energía de hidratos de carbono	49.1 ± 7.7	44.7 ± 5.9	53.5 ± 2.1	0.082

Los datos se presentan como medias ± Desviación estándar

## VI .DISCUSIÓN

La posibilidad de prevenir o tratar la obesidad a través de modificaciones en la composición de la microbiota intestinal ha estimulado un gran número de intensas investigaciones en este campo. Dado el gran interés por estudiar la microbiota y su asociación con la salud y la fisiología humana, durante la última década se han publicado numerosos estudios que sugieren que la microbiota intestinal contribuye de manera importante no sólo al desarrollo de obesidad sino también a complicaciones metabólicas importantes como la resistencia a la insulina y diabetes. Las diferencias en la composición bacteriana intestinal y su eficiencia metabólica pueden ser responsables de la predisposición de un individuo a ganar peso y almacenar más cantidad de grasa. Los primeros estudios al respecto, evidenciaron que al trasplantar el microbioma de ratones normales a ratones libres de bacterias, estos últimos aumentaban significativamente su grasa corporal sin un aumento en su ingesta calórica (Gordon et al, 2004). Por consiguiente el microbioma de los ratones trasplantados incrementaba la cantidad de energía extraída a partir de misma cantidad de alimento, este perfil metabólico podría contribuir a un fenotipo patológico en el huésped. Igualmente en ratones, la obesidad causada por una mutación del gen que codifica leptina se asoció a perfiles alterados de la microbiota intestinal; aumento de *Firmicutes* y la consiguiente disminución de *Bacteroidetes*. Con base a estos antecedentes, se buscó extrapolar los mismos resultados en humanos, aunque los primeros resultados parecían congruentes, al confirmar con estudios posteriores se encontraron resultados heterogéneos y contradictorios, debido tal vez a la complejidad del estilo de vida humano comparado con modelos en animales.

En humanos, la obesidad ha sido asociada con alteraciones en la composición de la microbiota intestinal (disbiosis), así como con una reducida diversidad microbiana. La disminución en la diversidad bacteriana presente en las muestras analizadas de los sujetos obesos es consistente con estudios previamente reportados (Turnbaugh et al, 2008; Li et al, 2011), aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio, si una marcada reducción de biodiversidad microbiana entre obesos y delgados, en concordancia con nuestros datos, una microbiota sana se ha definido por una alta diversidad. A pesar de que la diversidad bacteriana en individuos obesos es reducida se distingue por mayor capacidad de extracción de energía de la dieta. A su vez, estos resultados concuerdan con un estudio

donde se reportó un aumento en la diversidad bacteriana intestinal después de la pérdida de peso mediante cirugía bariátrica (Li et al, 2011). Por otra parte y como era de esperar, la composición filogenética de todas las muestras secuenciadas confirma que *Bacteroidetes* y *Firmicutes* constituyen los filos dominantes de la mayor parte de las poblaciones bacterianas del intestino humano (Ley, et al 2006; Furet et al, 2010). El género más abundante en la mayoría de las muestras analizadas fue *Bacteroides* que pertenece al filo *Bacteroidetes*, cabe mencionar con respecto a la edad, que este filo se ha reportado como mayormente predominante en la infancia (Monira et al, 2011).

Los primeros análisis de heces sobre la microbiota intestinal humana, describieron que existía una mayor proporción de *Firmicutes* y menor de *Bacteroidetes* en individuos obesos que en delgados (Ley et al, 2006; Turnbaugh et al, 2009). No obstante, las proporciones de estos filos en sujetos obesos no se han demostrado de manera consistente en los análisis realizados posteriormente. Algunos autores no han observado diferencias en la proporción de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* entre individuos delgados y obesos (Duncan et al, 2008; Balamurugan et al, 2010), incluso se ha reportado una mayor abundancia de *Bacteroidetes* en sujetos obesos mediante PCR en tiempo real (Schwiertz et al, 2009; Collado et al, 2008) y por pirosecuenciación (Zhang et al, 2009), lo cual es consistente con nuestros resultados, aunque no se encontraron diferencias significativas en los niveles de *Bacteroidetes* con la obesidad, se observó un aumento de *Bacteroidetes* en los niños obesos con alteraciones metabólicas con respecto a los controles. En concordancia con este dato, hay un estudio en una población del norte de México que refiere una mayor proporción de *Bacteroidetes* sobre *Firmicutes* en niños y adolescentes (Mejia-Leon, et al 2014). Con respecto a la diferencia significativa encontrada en las *Actinobacterias* en los niños con síndrome metabólico ( $p=0.017$ ; prueba de U Mann-Whitney) se reportó un resultado similar en la caracterización de la microflora intestinal en sujetos con hígado graso no alcohólico (Zhu, et al 2013). Cabe mencionar que en los grupos analizados se observó una baja proporción de *Actinobacterias* (0-2 %) en comparación a otras poblaciones (3 %). Es preciso señalar que no se conoce la importancia y el papel fisiológico de las poblaciones bacterianas minoritarias que podrían ser determinantes en estados de enfermedad como la obesidad.

En relación a la población de *Firmicutes*, ésta fue menor en los dos grupos de niños obesos que en los controles. Estos datos coinciden con lo reportado mediante el análisis de heces

por PCR en tiempo real en sujetos obesos (Schwiertz et al, 2009; Armougom et al, 2009) y por pirosecuenciación en individuos con DT2 (Larsen et al, 2010). Sin embargo, dichos resultados contrastan con la mayoría de los estudios que refieren que la proporción de *Bacteroidetes* disminuye y *Firmicutes* aumenta en el fenotipo obeso, reflejando la gran discrepancia de resultados (Ley et al, 2006; Armougom et al, 2009; Furet et al, 2010; Bervoets et al, 2013), sugiriendo que la asociación entre la obesidad y la microbiota es más compleja que la simple relación de los filos: *Firmicutes/Bacteroidetes* identificada inicialmente.

Se ha determinado que los cambios en la microbiota observados en individuos obesos están más asociados a alteraciones en la dieta. Si bien los estudios en roedores sugieren a la microbiota como un factor causal de obesidad, los resultados en humanos no permiten definir si las alteraciones de la microbiota son causa o consecuencia de la obesidad. Las fluctuaciones en la dieta así como el tipo de nutrimentos cambian profundamente la composición de la microbiota intestinal, provocando modificaciones en la cantidad y tipo de poblaciones de bacterias, en la prevalencia de ciertos géneros y en la transcripción de sus genes. En este contexto, se ha descrito que los polimorfismos genéticos del huésped explicarían el 12 % de la predisposición a padecer síndrome metabólico (Brown et al, 2012), indicando que el ambiente y particularmente una alimentación inadecuada como el principal factor en el desarrollo de obesidad y sus alteraciones metabólicas. Se considera que las dietas caracterizadas por un consumo excesivo de grasa/energía y baja en fibra provocan perturbaciones en la estructura y la funcionalidad de la microbiota del intestino favoreciendo una disminución en la diversidad bacteriana (De Wit et al, 2011). El contenido de grasa en la dieta contribuye en la disrupción de la barrera intestinal y aumento de la permeabilidad intestinal. Se ha descrito que la vía del factor nuclear Kappa (NF-κB) induce la transcripción de citosinas inflamatorias que promueven la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo condicionando un estado de inflamación de bajo grado, que finalmente sería un factor importante en la aparición de resistencia a la insulina, DT2, esteatosis hepática y estrés oxidativo. Por tanto, la dieta, la microbiota y la endotoxemia juegan un papel relevante en el desarrollo y evolución de las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad. Vale la pena señalar que la disbiosis inducida por la dieta, se ha implicado en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el síndrome del intestino irritable (SII) y cáncer colorrectal (CRC).

Sin duda, uno de los hallazgos más importantes e interesantes de este estudio fue la disminución en la cantidad de Bifidobacterias en la microbiota de niños con alteraciones metabólicas con respecto a los controles ( $p=0.017$ ; prueba de U Mann-Whitney). Además, este género bacteriano correlacionó con algunos parámetros bioquímicos y antropométricos propios de la obesidad, sugiriendo que esta bacteria pudiera tener un efecto protector contra las complicaciones metabólicas. Este resultado es consistente con varios estudios que reportan menor cantidad de Bifidobacterias en sujetos obesos (Schwartz et al, 2009; Santacruz et al, 2010). Por otra parte, Cani et al. (2007) mostró que tras la administración de oligofruktosa en ratones, los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium ssp.* alivian y mejoran el estado inflamatorio mediante un mecanismo dependiente de la producción del péptido-2 similar al glucagón (GLP-2), el cual reduce la permeabilidad intestinal de LPS, mejora la integridad de la mucosa y disminuye el impacto de la endotoxemia inducida por una dieta alta en grasa. El GLP-2 es un péptido de 33 aminoácidos con conocida actividad intestinoatrópica que induce saciedad, el cual es co-secretado con GLP-1 por las células enteroendocrinas-L. Estos hallazgos muestran la importancia de la microbiota intestinal en la regulación hormonal intestinal y en el equilibrio energético.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran por primera vez la participación de la microbiota intestinal en particular, el género de las Bifidobacterias en la obesidad y sus complicaciones metabólicas en población infantil mexicana, lo que demuestra la presencia de un componente bacteriano en la patogénesis de la obesidad y sus consecuencias metabólicas. En este sentido, los resultados que asocian significativamente una menor concentración de Bifidobacterias en individuos obesos, parecen ser más consistentes, que los resultados obtenidos para los filos *Firmicutes/Bacteroidetes* asociados a la obesidad.

En la población infantil analizada, los géneros bacterianos más abundantes en la microbiota intestinal fueron *Bacteroides* y *Prevotella* presentes en los tres grupos de estudio, los cuales corresponden a los enterotipos 1 y 2 descritos en la literatura (Arumugam et al, 2011; Wu et al, 2011). Con respecto a los enterotipos, en el grupo de los niños con síndrome metabólico se observó un aumento en la cantidad de *Prevotella* con respecto a los controles. Aunque este incremento no fue estadísticamente significativo, debido posiblemente al bajo número de muestras ( $n=13$ ). No obstante, en un análisis realizado mediante pirosecuenciación, se

reportó que la familia *Prevotellaceae* estaba significativamente enriquecida en la microbiota intestinal de sujetos obesos (Zhang et al, 2008).

Es probable que *Prevotella* esté jugando un papel importante en el metabolismo de los niños con síndrome metabólico, ya que como se ha descrito, obtiene energía de la fermentación de los hidratos de carbono de la dieta. En relación a ello, el enterotipo 2 en el grupo de obesos con alteraciones metabólicas coincidió con un aumento de energía procedente de hidratos de carbono sin alcanzar significancia estadística. A este respecto, se ha propuesto que algunos géneros bacterianos incluido *Prevotella* maximizan la extracción metabólica de la ingesta de polisacáridos de las plantas (fibra) y que esta capacidad bacteriana pudo haber conferido una ventaja evolutiva que permitía aprovechar al máximo los alimentos en épocas ancestrales cuando era difícil conseguir comida (Filippo et al, 2010), lo cual puede resultar contraproducente en condiciones de sobre aporte energético, favoreciendo la ganancia de peso y el almacenamiento de grasa. De tal manera que la microbiota intestinal podría ser otro factor adicional asociado al fenotipo ahorrador. En este sentido, un mecanismo que se ha propuesto para explicar el aumento en el consumo energético en personas obesas es la transferencia de hidrogeno ( $H_2$ ) entre especies de arqueas-bacterias, particularmente la relación de simbiosis entre ciertas bacterias productoras de  $H_2$  (*Prevotellaceae*) y arqueas metanogénicas que utilizan  $H_2$ , las cuales mejoran la eficiencia en la fermentación de los polisacáridos de la dieta y por tanto incrementan su conversión a AGCC resultando en mayor acumulación de tejido adiposo (Zhang et al, 2008). Nuestros resultados sugieren que la microbiota intestinal de los niños con síndrome metabólico es diferente comparada con los controles y se caracteriza por mayor cantidad de *Prevotella* que es más eficiente en la extracción de energía de la dieta, la cual posiblemente sería responsable de las alteraciones metabólicas en estos niños.

Considerando lo anterior, los resultados que asocian un grupo de bacterias específicas con el desarrollo de obesidad no son concluyentes, por lo tanto se requieren más estudios prospectivos para confirmar los resultados en poblaciones mas grandes. En este escenario, algunos autores argumentan interpretar cautelosamente los diversos resultados. Las causas de resultados contradictorios y discordantes en la composición intestinal de la microbiota probablemente sean las limitaciones mismas de las diversas metodologías utilizadas y las condiciones de estandarización, así como los diseños de los experimentos, ya que al

momento de caracterizar la microbiota existen múltiples variables confusoras inherentes a la población de estudio tales como la edad, el género, poblaciones étnicamente heterogéneas, tamaño de la muestra, actividad física, estado fisiológico e inmune, componente genético, vía de nacimiento, hospitalización, ubicación geográfica, uso de antibióticos, y parece ser que en mayor medida la dieta y el tipo de lactancia. Aunado a ello, parece claro que la lactancia materna tiene un papel relevante en la nutrición y salud del infante, ya que aporta una microbiota compleja con altos recuentos de bacterias vivas más nutrientes específicos (oligosacáridos) que permiten el crecimiento selectivo de bacterias benéficas. La composición de la leche materna depende del estado inmunológico y metabólico de la madre. En relación a ello, nuestros resultados sugieren que la cantidad de *Bifidobacterium ssp.* se correlaciona con la duración de lactancia materna, confirmando el efecto protector contra la obesidad. Aunque se debe considerar que el microbioma de la leche materna durante la lactancia de madres obesas alberga grupos de bacterias diferentes y menos diversas con respecto a la leche de madres de peso normal. En un estudio puntualmente se reportó que leche de madres con obesidad contenía mayores niveles de *Lactobacillus* y *Staphylococcus ssp.* y menos cantidades de *Bifidobacterium spp.* con respecto a la leche materna de madres con peso normal (Cabrera-Rubio et al, 2012).

En este contexto, se requieren extensos estudios epidemiológicos para mejorar la caracterización de la microbiota, un mejor entendimiento de cómo la variabilidad y la cantidad de ciertas bacterias pueda favorecer el desarrollo enfermedades concretas es importante para tomar posibles estrategias terapéuticas y en este caso poder frenar la creciente incidencia de obesidad y sus comorbilidades asociadas. En este sentido, se necesitan estudios adicionales para esclarecer la variabilidad de las comunidades bacterianas de poblaciones geográficamente diversas, ya que como se ha visto en algunos estudios la dieta y el ambiente impactan en la composición del microbioma (Filippo et al, 2010), lo que puede explicar en parte la gran discrepancia de los resultados reportados en la literatura. Así mismo, se requieren estudios integrales y globales que analicen la diversidad y los cambios de las poblaciones microbianas en un rango de tiempo más grande, que evalúen la interacción entre la microbiota, el huésped y el ambiente que en conjunto producen un fenotipo específico. Estos hechos, indican que se requieren estudios futuros orientados en elucidar la interacción de bacterias entre sí y también la interacción de la microbiota con los nutrientes de la dieta.

Con base en los datos presentados, se deben considerar estrategias para modificar la composición del microbioma con la finalidad de mejorar la cantidad de Bifidobacterias en la lactancia y embarazo posiblemente con el uso de prebióticos y probióticos, ya que son etapas críticas y blancos de las intervenciones destinadas a reducir el riesgo de desarrollar sobrepeso en generaciones futuras. Aunado a ello, la teoría de la programación metabólica considera que la salud esta determinada por eventos de la vida temprana en el útero y durante la primera infancia, donde el entorno nutricional impacta significativamente en la estructura del organismo y por consiguiente en la microbiota intestinal, contribuyendo en el desarrollo del metabolismo y el sistema inmune. La madre transmite información ambiental al feto a través de la placenta o bien a su bebé mediante la lactancia. Dicha programación metabólica incluye el estado de peso y de salud de la madre (desnutrición o sobrepeso), alteraciones en la dieta, la composición de la microbiota y la vía de nacimiento.

Por último, el progreso en las tecnologías de secuenciación las hace idóneas para el estudio de hábitats tan complejos el ecosistema bacteriano intestinal humano. Una limitante importante de la pirosecuenciación sigue siendo su elevado costo a pesar de que está disminuyendo con rapidez. En contraste, esta metodología revela la presencia de un mayor número de taxones identificando nuevas especies a diferencia de otros métodos, por lo que ha sido catalogada como el estándar de oro para el estudio de las comunidades bacterianas, no solamente para caracterizar la microbiota intestinal, sino también se ha utilizado frecuentemente para estudiar poblaciones bacterianas procedentes de animales, suelos y océanos. Un factor determinante en la secuenciación masiva es la elección de las regiones variables del gen 16s ARN (V1, V2, V4 y V6), debido a que el análisis individual puede subestimar la abundancia de diversas poblaciones bacterianas. Debido a ello, se ha recomendado la secuenciación de fragmentos largos que incluyan varias regiones variables.

En conjunción, el análisis de la microbiota intestinal es interesante y ha abierto un campo extenso de investigación fascinante en pleno desarrollo y con ramificaciones importantes. Los avances en la comprensión del papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de enfermedades metabólicas importantes como la obesidad y la diabetes prometen potenciales aplicaciones terapéuticas.

## VII.CONCLUSIONES

- Los niños delgados presentaron mayor diversidad bacteriana en su microbiota intestinal que los niños obesos, aunque esta diferencia no fue significativa.
- No se encontraron diferencias significativas en los filos Firmicutes/Bacteroidetes asociadas a la obesidad.
- Se encontró una disminución estadísticamente significativa en la cantidad de Bifidobacterias entre los niños con complicaciones metabólicas con respecto a los delgados.
- La abundancia relativa del enterotipo 2 (Prevotella) fue mayor en los niños con síndrome metabólico, sin alcanzar significancia estadística.

## VIII. PERSPECTIVAS

Es importante considerar que el análisis metagenómico de muestras fecales no incluye las interacciones moleculares que ocurren en el intestino humano. Además es importante evaluar que la metagenómica provee información basada en el contenido de microorganismos vivos o muertos, por lo que otras metodologías como la metatranscriptómica y metaproteómica son necesarias para disponer de un análisis funcional más profundo de los componentes de la microbiota (Karlsson, 2013). Algunos autores han propuesto que estas ciencias pueden ser de gran utilidad para evaluar el metabolismo bacteriano y su efecto en el huésped (Turnbaugh et al, 2009). De particular interés han sido los análisis de metatranscriptómica, mediante este enfoque sería interesante dilucidar redes y vías metabólicas complejas, e identificar perfiles de expresión transcripcional de la microbiota intestinal asociados a las complicaciones metabólicas de la obesidad en población infantil mexicana. El análisis y la caracterización funcional del metatranscriptoma de microorganismos viables de la microbiota en combinación con estrategias bioinformáticas, permitirán un mayor entendimiento de la importancia de la microbiota intestinal en los trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes altamente prevalentes en nuestra población.

Por otra parte, sería de interés la caracterización de la microbiota intestinal de sujetos obesos en población mexicana pero de diversas localizaciones geográficas, ya que como se ha venido mencionado la composición de la microbiota varía en función del ambiente y dadas las grandes diferencias genéticas regionales (mestizaje) en la población mexicana sería interesante identificar perfiles de la microbiota intestinal asociados a la obesidad en otros grupos poblacionales de nuestro país.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Abedi D, Feizizadeh S, Akbari V, Jafarian-Dehkordi A. In vitro antibacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in pharmaceutical sciences*. 2013 Oct; 8(4):260-8. PubMed PMID: 24082895.
- 📖 Adlerberth, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard et al. Reducción de enterobacterias y el aumento de la colonización estafilocócica del intestino infantil. ¿Un efecto del estilo de vida higiénica? *Pediatric Research*.59,2006, 96-101
- 📖 Aguilar-Salinas CA, García EG, Robles L, Riaño D, Ruiz-Gomez DG, García-Ulloa AC, Melgarejo MA, Zamora M, Guillen-Pineda LE, Mehta R, Canizales-Quinteros S, Tusie Luna MT, Gómez-Pérez FJ. High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(10):4075-4079
- 📖 Aguilar-Salinas CA, 2012. Las Proteínas desacoplantes en la patogenia de la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 10 No. 3 pp 165-170
- 📖 Amaral-Zettler L, Peplies J, Ramette A, Fuchs B, Ludwig W, Glöckner FO. Proceedings of the international workshop on Ribosomal RNA technology, April 7-9, 2008, Bremen, Germany. *Syst Appl Microbiol*. 2008; 31(4):258-68.
- 📖 Amber V, Bloom SR, 2007, Adiposity and the Gut. The role of gut hormones, *Current Nutrition & Food Science*, 3:75-90
- 📖 Anderson, HR (2005). Prevalence of asthma. *BMJ* 330, 1037-1038.
- 📖 Angelakis E, Armougom F, Million M, et al, 2012, The relationship between gut microbiota and weight gain in human, *Future Microbiol*, 7 (1): 91-99
- 📖 Artola Menéndez A, Duelo Marcos M, Escribano Ceruelo E. Síndrome metabólico. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2009; 11 Supl 16:s259-s277.
- 📖 Arumugam, M., et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, DOI: 10.1038/nature09944
- 📖 Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 2009;4:e7125
- 📖 Balamurugan R, George G, Kabeerdoss J, Hepsiba J, Chandragunasekaran AM, Ramakrishna BS. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br J. Nutr*. 103(3) 335-338 (2010)

- 📖 Barker DJP (Ed.) Fetal and infant origins of adult disease. London. BMJ Publishing Group, 1989.
- 📖 Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 2;101(44):15718-23
- 📖 Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI: Mechanism underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:979-984.
- 📖 Banatvala N, Mayo K, Megraud F, Jennings R and Feldman RA. 1993. The cohort effect and *Helicobacter pylori*, *J. Infect, Dis* 168, 219-221.
- 📖 Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity *Nat Rev Genet* 2005;6(3):221-234
- 📖 Bervoets L, Hoorenbeeck M, Kortleven I, Noten C, Hens N, Vael C, Goossens H, Desager K and Vankerckhoven V. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children; a cross-sectional study. *Gut pathogens* 2013, 5; 10.
- 📖 Bosch, A., Casademont, M. R., Edo, A., Fábrega, M. T., Fernández, A., Gamero, M., Montaner, I. y Ollero, M. A. (2010). Estilos de vida, hábitos dietéticos y prevalencia del sobrepeso y la obesidad en una población infantil. *Revista Pediatría de Atención Primaria*, 12 (45). \*\*
- 📖 Bouchard C. Gene-environment interactions in the etiology of obesity: defining the fundamentals. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16 Suppl 3: S193-S228.
- 📖 Breen DM, Yang CS, Lam TK (2011). Gut-brain signaling; how lipids can trigger the gut. *Diabetes Metab Res Rev* 27: 113-119
- 📖 Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet Induced dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the effects on Immunity and Disease. *Nutrients* 2012, 4, 1095-1119.
- 📖 Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, *et al*. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS One* 2011; 6: e25792.
- 📖 Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, Burcelon, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., Delzenne, N.M., 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with edotoxemia 50 (11), 2374-2383.
- 📖 Canizales Quinteros, S. 2010. Aspectos genéticos de la obesidad. La obesidad, perspectivas para su comprensión y tratamiento. Ed: Panamericana. pp: 61-66.

- 📖 Canizales Quinteros, S. 2008. Aspectos genéticos de la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 16, No 1.
- 📖 Carey CM, Kirk JL, Ojha S, Kostrynska M. Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Can J Microbiol.* 2007;53:537-50
- 📖 Christakis NA, Fowler JH. The spread of obesity in a large social network over 32 years. *N Engl J Med.*2007;357(4):307
- 📖 Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:840-62
- 📖 Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(22):e200.
- 📖 Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O'Toole PW. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One.* 2009; 4(8):e6669.
- 📖 Committee on Nutrition. AAP. Prevention of Pediatric Overweight and Obesity. *Pediatrics* 2003; 112:424.
- 📖 Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Knowles NG, Wang F, Hull RL, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Kahn SE, Carr DR, Havel PJ, Walden CE. The concurrent accumulation of intraabdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations. *Diabetes* 2002; 51: 1005-1015.
- 📖 Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am.J. Clin. Nutr.* 88 (4) 849-899 (2008).
- 📖 Cotillard, A et al. 2013 Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585-588.
- 📖 Dalmau J, Alonso M, Gómez L, et al, 2007, Obesidad Infantil, Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría, Parte II. Diagnóstico Comorbilidades y Tratamiento, *An Pediatr (Barc)*,66:294-304
- 📖 Daniels SR, Greer FR and the Committee on Nutrition. Lipid Screening and Cardiovascular Health in Childhood. *Pediatrics*, 2008, 122:198-208.
- 📖 David, L.A. et al. 2013. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*

- 📖 Dethlefsen L, et al. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 108
- 📖 De Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C, Bosch J, Kleerebezem M, Muller M, Meer R. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *American Journal of Physiology*. 2012. Vol 303. No 5
- 📖 Dibaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):460-9.
- 📖 Domínguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(26):11971-5
- 📖 Droege M, Hill B. The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol*. 2008; 136(1-2):3-10.
- 📖 Duncan, SH, Belenguer, A, Holtrop, G, Johnstone, AM, Flint, HJ and Lobley, 2007. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and buturate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol*. 73, 1073-1078.
- 📖 Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, M Sargent, Gill SR, Nelson KE, Relman DA: diversidad de la flora microbiana intestinal humana *Science* 2005, 308: 1635-1638
- 📖 Everard A, Belzer C, Geurtz L, et al: Cross-talk between *Akkermansia muciphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Sci USA* 2013;110:9066-9071
- 📖 Farias MM, Cuevas AM, Rodriguez F. Set-point theory and obesity. *Metab Syndr Relat Disor* 2011;9:85-9
- 📖 Ferrante AW Jr, 2007, Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation, *J Intern Med*, 262(4):408- 414
- 📖 Ferranti Sarah, Dariush Mozaffarian. La tormenta perfecta: obesidad, disfunción del adipocito y consecuencias metabólicas. *Clinical Chemistry*. Volumen 34 No. 2 Abril-Junio 2009. p. 95-108
- 📖 Figueroa, D. (2009) Obesidad y Pobreza: marco conceptual para su análisis en Latinoamérica, *Saude Soc. Sao Paulo*, 18, (1), 103-117.
- 📖 Filippo DC, Cavalieri D, Paola DM, Ramazzoti, Massart S, Collini S and Lioneti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS* 2010: vol. 107 no. 33

- 📖 Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al. National, regional and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011; 377: 557-67\*\*
- 📖 Flegal KM. Epidemiologic aspects of overweight and obesity in the United States. *Physiol Behav* 2005; 86(5):599-602.
- 📖 Freedman D, Kettel-Khan L, Dietz W, Srinivasan S, Berenson G. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood. The Bogalusa Heart Study, *Pediatrics* 2001; 108:712-18
- 📖 Galvan-Moroyoqui, et al (2008). The interplay between *Entamoeba* and enteropathogenic bacteria modulates epithelial cell damage. *Plos Negl. DIS.* 2e266
- 📖 Gao Z, Yin J, Zhang J, et al, 2009, Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice, *Diabetes*, 58(7):1509-1517
- 📖 Gill, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-1359 2006
- 📖 Goran MI, Ball GDC, Cruz M. Obesity and Risk of type 2 Diabetes and cardiovascular Disease in children and adolescents. *JCEM* 2003;88:1417-27
- 📖 Gotteland M, The role of intestinal microbiota in the development of obesity and type-2 diabetes. *Rev. chil. Endocrinol. Diabetes* 2013, 6(4): 155-162
- 📖 Greiner T, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2011 Apr;22(4):117-123
- 📖 Griffiths, E.A., Duffy, L.C. Schanbacher, F.L. Qiao, A, Rossman, J. Rich, D, Ogra, P.L. 2004. In vivo effects of bifidobacteria and lactoferrin on gut endotoxin concentration and mucosal immunity in Balb/c mice. *Dig. Sci.* 49 (4) 579-589.
- 📖 Groner JA, Joshi M, Bauer JA, Pediatric precursors of adult cardiovascular disease: noninvasive assessment of early vascular changes in children and adolescents. *Pediatrics.* 2006;118: 1683-91
- 📖 Gronlund MM, Lehtonen OP, Enrola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal microbiota after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28:19-25.
- 📖 Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003 Feb 8;361(9356): 512-9 PubMed PMID:12583961
- 📖 Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y la enfermedad. *Nutr Hosp.* 2007;(Supl 2):14-19

- 📖 Gutiérrez-Delgado C, Guajardo-Barrón V. Documento técnico para la estimación del impacto financiero en la salud de la población mexicana derivado de la obesidad y el sobrepeso. Documento de trabajo 2/2008, Unidad de Análisis Económico, Secretaría de Salud, México, 2009.
- 📖 Hediger ML, Overpeck MD, Kuczmarski RJ, Ruan WJ. Association between infant breastfeeding and overweight in young children. *JAMA* 2001; 285:245360
- 📖 Heijtz, R.D. Wang S., Farhana Anuar, Yu Qiana, Björkholm, Samuelsson A, Martin L. Hibberdc, H Forssberg and S Pettersson. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *PNAS*, 2011. Vol 108 No.7 3047-3052.
- 📖 Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291:881-4.
- 📖 Icaza-Chávez ME. Microbiota intestinal en la salud y enfermedad. Elsevier. *Revista de Gastroenterología en México* 2013.
- 📖 Ichihara S, Yamada Y. 2008. Genetic factors for human obesity. *Cell Mol Life Sci*. Vol.65 No. (7-8) pp: 1086-98.
- 📖 International Obesity Task Force. The global epidemic. Disponible en: <http://www.iaso.org/iotf/obesitytheglobalepidemic/> Consultado en enero del 2014.
- 📖 James P T, 2011, Chapter 2 Obesity: A modern Pandemic, Obesity, Elsevier España.
- 📖 Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008 87(3):534-8.
- 📖 Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*. 2013;62:3341
- 📖 Kleessen B, Bezirtzoulou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 2000: 53-63.
- 📖 Larsen N, Vogensen FK, van den BergFW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, *et al*. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5: e9085.
- 📖 Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, Osterås M, Schrenzel J, François P. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods*. 2009; 79(3):266-71
- 📖 Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 2; 102(31):11070- 11075.

- 📖 Ley RE, Turnbaugh 5.PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 21; 444(7122):1022-3.
- 📖 León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparan M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, Gutierrez-Vidal R, Vega-Badillo J, Jacobo-Albavera et al, Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in mexican children and adults. *PLoS One*. 2013; 8(8):e70640.
- 📖 Li JV, Ashrafián H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic crosstalk. *Gut* 2011; 60:1214-23.
- 📖 Louis P, Scott KP, Duncan SH, Flint HJ: La comprensión de los efectos de la dieta sobre el metabolismo bacteriano en el intestino grueso *J Appl Microbiol* 2007, 102: 1197-1208
- 📖 Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220e30
- 📖 Maccaferri S, Biagi E, Brigidi P. Metagenomics: key to human gut microbiota. *Dig Dis*. 2011; 29(6):525-30.
- 📖 Mändar R, Mikelsaar M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate* 1996; 69(1):30-5.
- 📖 Manzur F, Ciro A, Alayon NA. Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular Vol. 17 No.5 ISSN 0120-5633.
- 📖 Marathe N, Sudarshan S, Vikram L, Dilip R, Yogesh S. Changes in human gut flora with age: an Indian familial study et al. *BMC Microbiology* 2012 12:222
- 📖 Martín R, et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. March–April 2004, Pages 121–127
- 📖 Martínez-Romero S. Genética y Obesidad. Tomado de gaceta urbana N3. Disponible:<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spi/unidad3/gu5.pd>
- 📖 Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*. 2011; 12:5-9.
- 📖 Mcfarlane S, Hopkins MJ, Mcfarlane GT. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microb Ecol Health Dis* 2000:64-72.
- 📖 Medina-Gómez G y Vidal-Puig A. Tejido adiposo como diana terapéutica en la obesidad. Departamento de Bioquímica y Fisiología. Facultad de Ciencias de la Salud. España. *Endocrinol Nutr*. 2009;56 (8):404-11

- 📖 Mejia-Leon ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Dominguez-Bello MG, Calderón de la Barca AM. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. January 2014, Scientific Reports 4:3814 Doi: 10.1038/srep03814.
- 📖 Mercado P, Vilchis G. La obesidad infantil en México. Alternativas en Psicología. Revista Semestral. Tercera Época. Año XVII. Número 28. Febrero-Julio 2013
- 📖 Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Raoult D. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanovibacter smithii*. *Int. J Obesity*. 2011.153
- 📖 Muller N, and Von Allmen (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int. J Parasitol*. 35, 1339-1347.
- 📖 Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, Sullivan OO, Fouthy F, Clarke SF, Toole PW and Shanahan F. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota; relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*. 2010; 59: 1635-1642 doi 10.1136
- 📖 Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriquer F, Queipo-Ortuño MI. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med* 2013; doi: 10.1186/1741-
- 📖 Nelson L. y Cox M. 2006 Integración y regulación hormonal del metabolismo de los mamíferos. Principios de bioquímica de Lehninger. Ed Omega. Pp: 881-922.
- 📖 Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012; 336(6086):1262-7.
- 📖 Ottman N, Smidt H, de Vos W and Belzer C, The function of our microbiota; who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and infection microbiology*. 2012, doi;10.3389/fcimb.2012.00104
- 📖 Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, MA McDowell, Tabak CJ, Flegal KM 2006 Prevalencia de sobrepeso y obesidad en los Estados Unidos, 1999-2004. *JAMA* 295:1549-1555
- 📖 Parks B, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota. *Cell Metabolism* 2013; 17: 141-152
- 📖 Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, et al, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65.
- 📖 Raj M, 2012, Obesity and Cardiovascular risk in children and adolescents, *Indian J Endocrinol Metab*, 16(1):13-19
- 📖 Raoult D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27(8):631-4.

- Rankinen T, Zuberi A, Changon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 2006; 14: 529-644.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(Suppl 1):4680-7
- Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly F, Rohwer F and Gordon J, 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466, 334-338.
- Rita Balistreri, Calogero Caruseo y Giuseppina Candore. 2010. The role of Adipose Tissue and adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm*. Vol. 10.pp:1-19.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*. 2010 Aug; 104 Suppl 2:S163.
- Rodicio MR, et al. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(4):238-45
- Sambrock, J, Fritsch, FE y Maniatis, T 1990. Agarose Gel Electrophoresis. En. *Molecular cloning a Laboratory Manual*. (ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America. Capitulo: 6.3-6.15.
- Samuel BS, Shiato A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor. Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Oct 28; 105(43):16767-72
- Samuel BS, Gordon JI (2006) A humanized gnotobiotic mouse model of host-microbial mutualism, *Proc Natl Acad Sci USA* 103;10011-10016
- Sanz Y, Santacruz A, Dalmau J, 2009, Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad y enfermedades metabólicas, *Acta Ped*, 1-9
- Satokari R, Gronroos T, Laitinen K et al: Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Letl Appl Microbiol* 2009; 48: 8-12
- Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Nicolaas A, Donus and Hardt P. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* 2009, 18, 190-195. Doi 1038
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*. 2012;21:1794-805
- Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Disponible en: [http://ensanut.insp.mx/doctos/ENSANUT2012\\_Sint\\_Ejec-24oct.pdf](http://ensanut.insp.mx/doctos/ENSANUT2012_Sint_Ejec-24oct.pdf)

- 📖 Sneijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, Kostense PJ, et al. Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:1192-7.
- 📖 Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009, 50; 1094-1104.
- 📖 Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989; 299:1259-60.
- 📖 Suez J, Korem T, Zeevi D, Schapira C, Thaiss A, Maza O, Israeli D, Zmora Gilad S, Weinberger A, Kuperman Y, Harmelin A, Kolodkin-Gal I, Shapiro H, Halpern Z, Segal E & Elinav E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering gut microbiota. *Nature* 2014. 13793.
- 📖 Sun, L.Yu, Z., Ye, X., Zou, S., Li, H., Yu, D., Wu, Chen, Clement, I 2010 *et al.* A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. *Diabetes Care* 33 (9) 1925-1932
- 📖 Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, Gortmaker SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet.* 2011; 378(9793):804-14.
- 📖 Tagliabue A, Elli M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012 3(3):160-8.
- 📖 Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *Alim Nutr Salud* 2004; 11:37–48.
- 📖 Tilg H, Moschen AR, 2006, Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity, *Nat Rev Immunol*, 6: 772-783
- 📖 Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. A role for the gut microbiota in energy harvesting? *Gut.* 2010; 59(12):1589-90.
- 📖 Turnbaugh PJ, Bäckhed, F, Fulton, L, and Gordon, JI 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3,213-223.
- 📖 Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI: The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009; 6ra14-16ra14.
- 📖 Velásquez-Mieyer Pa, Neira Cp, Nieto R, Cowan Pa. Obesity and Cardiometabolic Syndrome In Children. *Therap Adv Cardiovasc Dis* 2007; 1: 61-81.

- 📖 Vrieze A. et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 2012; 143; 913-6.
- 📖 Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of gut microbiota. *Elsevier FEBS Lett*. 2014. 588(22):4120-4130.
- 📖 Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. *J Nutr Biochem* 1998; 9: 668-75.
- 📖 Wall R, Ross RP, Ryan CA, Hussey S, Murphy B, Fitzgerald GF, et al. Role of gut microbiota in early infant development. *Clinical medicine Pediatrics*. 2009; 3:45-54. Pubmed PMID: 23818794.
- 📖 Wang Y, Chen Y, Zhou Q, Huang S, Ning K, Xu J, Kalin RM, Rolfe S, Huang WE. A culture-independent approach to unravel uncultured bacteria and functional genes in complex microbial community. *PLoS One*. 2012; 7:e47530.
- 📖 Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Eng J Med*. 2004; 350: 2362-74
- 📖 Werner T, Haller D. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: From the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutat Res*. 2007; 622(1-2):42-57.
- 📖 Winkler P, Ghadim D, Schrezenmeir J, et al, 2007, Molecular and cellular basis of microflora-host interactions, *J Nutr*, 137:756S-772S
- 📖 Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(12):4576-9.
- 📖 Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. 1987; 51(2):221-71.
- 📖 Wu, G.D. et al 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105-108
- 📖 Yabe D, Seino Y. (2011) Two incretin hormones GLP-1 and GIP; comparison their actions in insulin secretion and  $\beta$  cell preservation. *Prog Biophys Mol Biol*. 107; 248-256
- 📖 Zamora Barrón y Reynoso Mendoza. 2010. El tejido adiposo como órgano endocrino. La obesidad perspectivas para su comprensión y tratamiento. Ed: Panamericana. pp: 67-74.
- 📖 Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A et al (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2365–2370
- 📖 Zhu L, Baker S, Gill C, Liu W, Alkhouri R, D. Baker, Steven R. Gill. Characterization of Gut Microbiomes in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Patients: A Connection Between Endogenous Alcohol and NASH. *Hepatology* 2013

