



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Programa de maestría y doctorado en ciencias  
Médicas, Odontológicas y de la Salud

“Descripción de la microbiota intestinal  
en escolares de Chimalhuacán con malnutrición”

Tesis para optar por el grado de :  
Maestro en Ciencias en Investigación Clínica Experimental en Salud

Presenta:

**EDER ORLANDO MÉNDEZ SALAZAR**

Tutores principales:

**DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**DRA. BERENICE PALACIOS GONZÁLEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 202 de diabetes en el edificio F de la Facultad de química de la UNAM, en colaboración con las Unidades de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud. Facultad de Química-Universidad Nacional Autónoma de México y Unidad de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina UNAM-INMEGEN del Instituto Nacional de Medicina Genómica, México, bajo la dirección de la Dra. Marta A. Menjívar Iraheta y de la Dra. Berenice Palacios González

El alumno fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el período de julio de 2014 a julio de 2016. Número de becario: 328630. Este proyecto fue apoyado por el proyecto IN221014 de la Dirección General de Asuntos Académicos de la UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a Dios por brindarme esta oportunidad de crecer y por mostrarme su fidelidad todos los días. A mis padres y a mis hermanos: Eduardo, Erick y Frank. A mis abuelos por ser un ejemplo de sencillez incomparable, a mis comunidades del Camino Neocatecumenal de Coatzacoalcos Veracruz y la Ciudad de México; por mostrarme su apoyo incondicional en momentos adversos. Agradezco de corazón a mis amigos de antaño: Edu, Nancy, Serapio y Arístides. A Daniel, Humberto, Ceci, Oswaldo y Josselyn por motivarme siempre siendo un ejemplo de paciencia, y por estar conmigo y brindarme su hermandad y amor incondicional. A mis compañeros y amigos del laboratorio 202 de la Facultad de Química de esta prestigiosa UNAM, por compartir sus conocimientos y transmitirme siempre su peculiar interés por la ciencia. Al Dr. Julio, la maestra Isela, Dr Miguel, Dra Katy, Caro, Moni, Belisario, Helena, Bere y Bárbara. Agradezco sinceramente a la doctora Berenice Palacios por tantas enseñanzas, por su paciencia y por el compromiso mostrado en este proyecto. A la doctora Ángeles Granados, porque sin su apoyo este proyecto no sería posible, gracias por su diligencia, orientación y por estar siempre presente en este proceso formativo. Por último un agradecimiento especial a la doctora Marta Menjívar por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar con ella en su laboratorio, por su dirección, sus consejos y su tutoría.

# ÍNDICE GENERAL

## CONTENIDO

Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas.....	x
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii

## 1. ANTECEDENTES

1.1. Microbiota intestinal.....	1
1.1.1. Las bacterias no cultivables.....	1
1.1.2. Bacterias anaerobias dominantes en heces.....	1
1.2. Gen ribosomal ARNr 16S.....	2
1.2.1. Estudio del gen ribosomal ARNr 16S para identificación de bacterias.....	2
1.2.2. PCR para identificación de bacterias anaerobias intestinales por medio del estudio del gen ribosomal ARNr 16S .....	3
1.2.3. Proyecto del microbioma humano.....	3
1.3. Microbiota intestinal antes, durante y posterior al parto.....	4
1.3.1. Microbiota intestinal y primeras transmisiones al feto.....	4
1.3.2. Microbiota intestinal durante el nacimiento.....	4
1.3.3. Impacto de la lactancia en el neonato.....	5
1.3.4. Microbiota intestinal después del nacimiento.....	6
1.3.5. Consumo de antibióticos y su impacto en la microbiota intestinal.....	7
1.4. Microbiota intestinal, funciones e interacciones.....	7
1.4.1. Microbiota intestinal: un órgano metabólico.....	7
1.4.2. Ácidos grasos de cadena corta (agcc).....	8
1.4.3. Composición de la microbiota intestinal.....	9
1.4.4. Clasificación de la microbiota intestinal por enterotipos.....	10
1.5. Microbiota y alteraciones.....	12

1.5.1. Cambios en la dieta y repercusión en la microbiota intestinal.....	12
1.5.2. Disbiosis intestinal.....	13
1.6. Mala nutrición y microbiota.....	13
1.6.1. Mala nutrición y el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas.....	13
1.6.1.1. Desnutrición.....	13
1.6.1.2. Obesidad.....	14
1.6.3. Microbiota intestinal: Nuevo factor ambiental para explicar patologías.....	14
1.6.4. Transición epidemiológica y nutricional en México.....	15
1.7. Introducción.....	15
2. Justificación.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivos.....	20
5. Material y métodos.....	21
5.1. Tipo de estudio.....	21
5.2. Descripción del universo de trabajo.....	22
5.3. Criterios de inclusión.....	22
5.4. Criterios de exclusión.....	22
5.5. Criterios de eliminación.....	23
5.6. Tamaño de muestra.....	23
5.7. Desarrollo metodológico.....	23
5.7.1. Análisis bioquímicos.....	23
5.7.2. Determinación de insulina en suero.....	23
5.7.3. Determinación de leptina y adiponectina en suero.....	23
5.7.4. Estudios antropométricos.....	24
5.7.5. Análisis de dieta.....	25
5.7.6. Procesamiento de heces.....	25
5.7.7. Extracción de DNA bacteriano de heces.....	25
5.7.8. Cuantificación del DNA bacteriano.....	26
5.7.9. Reacción en cadena de la polimerasa.....	26

5.7.9.1. Secuenciación del gen ARNr 16S y procesamiento de los datos.....	27
5.7.9.2. Análisis bioinformático y estadístico.....	28
6. Resultados.....	30
6.1. Evaluación de parámetros bioquímicos y hormonales entre grupos.....	31
6.2. Evaluación de parámetros antropométricos entre grupos.....	32
6.3. Evaluación de componentes principales y gráfico biplot de los grupos estudio.....	33
6.3.1. Gráfico de sedimentación de medidas bioquímicas hormonales y antropométricas.....	34
6.4. Análisis de dieta.....	35
6.4.1. Análisis de macronutrientes.....	35
6.4.2. Análisis de micronutrientes.....	35
6.4.3. Biplot de macro y micronutrientes.....	37
6.4.4. Gráfico de sedimentación de parámetros nutricios.....	39
6.5. Amplificación de los productos de PCR.....	40
6.6. Estudio de microbiota intestinal.....	41
6.6.1. Diversidad alfa.....	41
6.6.2. Cociente Firmicutes/Bacteroidetes.....	42
6.6.3. Descripción de microbiota a nivel de filo.....	43
6.6.4. Análisis discriminante lineal de poblaciones bacterianas.....	44
6.6.5. Descripción de microbiota a nivel de género.....	45
6.6.6. Comparación de enterotipos entre grupos de estudio.....	47
6.6.7. Análisis de coordenadas principales.....	48
6.6.8. Correlación entre enterotipos y parámetros bioquímicos hormonales y antropométricos.....	49
6.6.9. Correlación entre enterotipos y variables de macronutrientes y micronutrientes.....	50
6.6.9.1 Correlación de familias bacterianas con la dieta.....	52

6.7. Descripción del tipo de nacimiento microbiota intestinal.....	53
6.8. Descripción del tipo de lactancia.....	54
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>10.REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Estructura 2D y 3D del gen ribosomal ARNr 16S	3
2	Análisis de componentes principales del cambio de la microbiota intestinal en niños en un periodo consecutivo de 3 años	6
3	Filogenia de la microbiota gastrointestinal humana	10
4	Comparación de la abundancia relativa de filos y géneros bacterianos en dos poblaciones de niños: africanos y europeos	11
5	Esquema general de trabajo	21
6	Terminadores cíclicos reversibles de la Secuenciación de siguiente generación (NGS)	28
7	Análisis de componentes principales y biplot de parámetros hormonales, bioquímicos y antropométricos	33
8	Gráfico de sedimentación de parámetros hormonales, bioquímicos y antropométricos	34
9	Biplot de contribución de análisis de macro y micronutrientes	38
10	Gráfico de sedimentación de macronutrientes y micronutrientes	39
11	Productos de la amplificación de las regiones V3-V4 por PCR	40
12	Alfa diversidad	41
13	Cociente Firmicutes/Bacteroidetes	42
14	Distribución porcentual de filos	43
15	Análisis discriminante lineal de linajes bacterianos entre los grupos de estudio	44

16	Distribución porcentual de géneros	45
17	Comparación de enterotipos	47
18	Análisis de coordenadas principales de géneros bacterianos	48
19	Correlación de enterotipos con parámetros bioquímicos, hormonales y antropométricos	49
20	Correlación de enterotipos con macro y micronutrientes	50
21	Correlación de consumo de frijol con prevotella	52
22	Descripción del tipo de nacimiento	53
23	Descripción del tipo de lactancia	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>		<b>PÁGINA</b>
1	Primers específicos de las regiones hipervariables V3-V4 del gen ribosomal ARNr 16S.	25
2	Evaluación de parámetros bioquímicos y hormonales de los grupos estudiados	31
3	Evaluación de parámetros antropométricos de los grupos estudiados	31
4	Evaluación de consumo energético y de macronutrientes de los grupos estudiados	36
5	Evaluación de micronutrientes de los grupos estudiados	37

## ABREVIATURAS

<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>PHM</b>	Proyecto del microbioma humano
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>HMO</b>	Oligosacáridos de leche humana
<b>AGGC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>NPY</b>	Polipéptido de 36 aminoácidos liberado por las células L
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagón tipo 1
<b>GIP</b>	Polipéptido inhibidor gástrico
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado al intestino
<b>ZPS</b>	Polisacárido iónico dipolar
<b>T CD4+</b>	Glucoproteína monomérica de 59 kDa de peso que constituye una parte esencial del sistema inmunitario
<b>GWAS</b>	Estudio de asociación del genoma completo
<b>FIAF</b>	Factor adiposo inducido por el ayuno
<b>LPL</b>	Lipoproteinlipasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>TRC</b>	Terminadores reversibles cíclicos
<b>PS</b>	Pliegues subcutáneos
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>ACP</b>	Análisis de coordenadas principales
<b>OZ-1</b>	Proteína adaptadora citosólica que regula la permeabilidad celular intestinal
<b>CHO</b>	Carbohidratos

## RESUMEN

La disbiosis intestinal es una alteración en la composición de la microbiota intestinal humana que está asociada a graves daños a la salud, incluyendo la mala nutrición. Esta alteración bacteriana puede tener secuelas a largo plazo, aumentando el riesgo de padecer enfermedades crónicas. En México, paradójicamente los niños sufren de una doble carga de mala nutrición (desnutrición y obesidad), en paralelo la prevalencia de diabetes y obesidad en los adultos se ha convertido en un grave problema de salud pública en los últimos años en nuestro país. La desigualdad económica y social de nuestra población contribuye a acrecentar los problemas de mala nutrición en diversos municipios de México. Por tanto, nuestros objetivos fueron describir y comparar la riqueza bacteriana y la diversidad de la microbiota intestinal de niños mexicanos en edad escolar con obesidad y desnutrición en un municipio de bajo ingreso económico. **Métodos:** Se obtuvieron datos y muestras de 36 escolares del Municipio de Chimalhuacán, Edo. de México. Para el estudio de la microbiota, se amplificó la región V4 del gen ribosomal bacteriano ARNr 16S y se secuenció por la plataforma Illumina MiSeq. Los escolares se agruparon en 3 grupos: control (n=12) (C), desnutrición (n=12) (DES) y obesidad (n=12) (OB), de acuerdo a su altura, peso e índice de masa corporal (IMC) calculando sus respectivas puntuaciones (z). Se obtuvieron datos de consumo dietético mediante el uso de recordatorios de 24 horas. **Resultados:** El grupo C tuvo mayor riqueza y diversidad en especies que los grupos OB y DES, aunque éstos últimos poseían un aumento del cociente Firmicutes/Bacteroidetes. En este sentido, el grupo DES tuvo una mayor abundancia relativa del filo Firmicutes y también la mayor cantidad de *Lachnospiraceae*, que correlacionó negativamente con el consumo de energía. En este grupo también se observó una correlación positiva entre el consumo de grasa monoinsaturada, hidratos de carbono y consumo energético, con el enterotipo 1 (*Bacteroides*). Por otra parte, se encontró que el grupo OB posee mayor abundancia relativa de *Proteobacterias* y miembros del género *Bilophila*. Además hubo una correlación positiva entre enterotipo 1 y todo tipo de grasas que consumieron. Con respecto a la enterotipo 2 (*Prevotella*), encontramos una correlación positiva con el consumo de frijoles. **Conclusión:** Los resultados indican la existencia de una disbiosis intestinal entre los grupos OB y DES. La presencia abundante de la familia *Lachnospiraceae* (Firmicutes) pueden ser un marcador temprano de riesgo a obesidad en el grupo de desnutrición. Los enterotipos podrían utilizarse para identificar la exposición dietética que conduce al riesgo de enfermedades.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Microbiota intestinal**

Los seres humanos al igual que otros organismos superiores viven en simbiosis con un vasto conjunto de microorganismos residentes en el tracto gastrointestinal que comprende un complejo ecosistema calculado en 1057 especies, pertenecientes a la Eukarya (92), Archea (8) y bacterias (957), y que de manera conjunta es denominada microbiota intestinal <sup>(1)</sup>.

#### **1.1.1 Las bacterias no cultivables**

Las bacterias que se pueden cultivar en el laboratorio son sólo una pequeña fracción de la diversidad total existente en la naturaleza. En todos los niveles de la filogenia bacteriana existen bacterias conocidas como fastidiosas, cuyo microambiente no es posible replicar con medios regulares, debido a los requerimientos de temperatura, pH, condiciones osmóticas y nutrimentos <sup>(2)</sup>. Estas bacterias anaerobias estrictas poseen una versatilidad metabólica fundamental en el ciclo del carbono, nitrógeno, y otros elementos que afectan a los organismos y el entorno circundante <sup>(3)</sup>.

#### **1.1.2 Bacterias anaerobias dominantes en heces**

En 1933 con Eggerth y Gagnon, se estableció que los organismos dominantes en las heces eran anaerobios. Posteriormente, Muller y Beuthow en los años 1956-1957 respectivamente y Haenel en 1961; coincidieron que más del 50 por ciento de estas bacterias eran cultivables y la mayoría pertenecía a lactobacilos anaerobios; en segundo lugar *Bacteroides* spp, mientras que Enterobacterias, Enterococos y otros organismos constituían menos del 1 por ciento del total <sup>(4)</sup>.

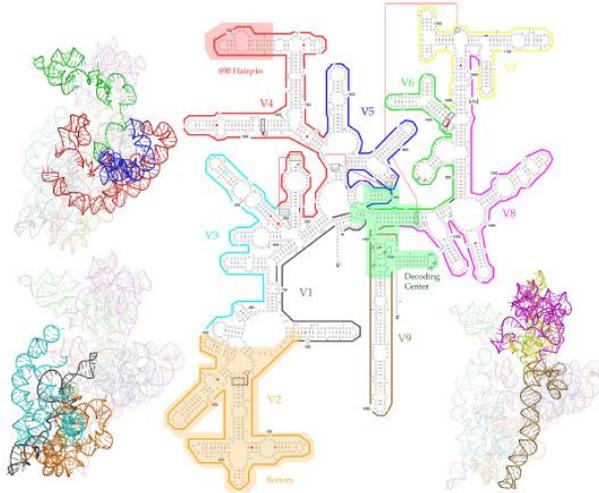
Por otro lado, Drasar B.S utilizó por primera ocasión medios libres de oxígeno con una cámara anaeróbica para el cultivo de bacterias anaeróbicas presentes en heces. Con esta técnica especial, el número de bacterias aisladas fue 100 veces mayor que con el uso de técnicas convencionales, además encontró  $10^{11}$  de anaerobios no esporulados por gramo, siendo *Escherichia coli* la bacteria más dominante ( $10^{6.4}$  por gramo) <sup>(4)</sup>.

## **1.2. Primeros estudios del gen ribosomal ARNr 16S para identificación de bacterias.**

### **1.2.1 GEN RIBOSOMAL ARNr 16S**

Las limitaciones de los métodos de identificación bacteriana en los laboratorios de microbiología clínica representó una problemática importante, hasta que en 1977 Carl Woese y cols fueron pioneros en caracterizar bacterias a través del gen ribosomal ARNr 16S (Figura 1), empleando oligonucleótidos producidos por digestión de ribonucleasa T1, que facilitó el descubrimiento de nuevos géneros y especies bacterianas metanogénicas. Este mismo investigador empleó por primera vez secuenciadores capilares de DNA para identificar bacterias como *Halobacterium volcanii*, y *Archaeobacterium*, con la misma estrategia de estudio del gen ARNr 16S <sup>(5)</sup>.

Este gen ribosomal 16 ARNr está asociado directamente con la peptidil transferasa, enzima esencial del ribosoma en la síntesis de proteínas, que cuenta con nueve regiones hipervariables (V1-V9)<sup>(6)</sup> de mil cuatrocientos pares de bases cuya estructura es altamente conservada; por lo que se considera un gen marcador que permite identificar las características filogenéticas de los microorganismos <sup>(7)</sup>.



**Fig 1. Estructura 2D y 3D del gen ribosomal ARNr 16S.** Las regiones hipervariables V1-V9 son identificadas individualmente en bloques de diferentes colores. (Referencia: Yang et al. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC Bioinformatics. 2016 Mar 22; 17(1):135.)

### 1.2.2. PCR para identificación de bacterias anaerobias intestinales por medio del estudio del gen ribosomal ARNr 16S

En 1996, con la invención de la PCR se facilitó el estudio de una amplia gama de especies bacterianas. Dichas especies fueron aisladas en materia fecal de animales y humanos y además, se estableció la frecuencia relativa de bacterias tales como *Fusobacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Lactobacillus acidophilus*; se comprobó la eficacia de esta técnica como una herramienta valiosa para una recopilación cualitativa y cuantitativa más completa en estudios del tracto gastrointestinal microbiano. Posteriormente, esta técnica molecular junto con la secuenciación del gen ARNr 16S se convirtió en un procedimiento clave para la detección de microorganismos <sup>(5, 8)</sup>.

### 1.2.3 Proyecto del Microbioma Humano

El costo aminorado de los métodos moleculares y el aumento en la velocidad de los sistemas de extracción y secuenciación masiva del ADN denominada *Next-Generation Sequencing* (NGS), permitió la identificación filogenética de

microorganismos nunca antes descritos con las técnicas convencionales anteriormente mencionadas <sup>(9)</sup>. Es así como surge el proyecto del microbioma humano (PMH) en el 2007, que aprovechó estas tecnologías; acoplándolas con los avances en los enfoques computacionales para analizar conjuntos de datos complejos basados en secuencias microbianas, e impulsó el estudio del gen marcador ribosomal bacteriano ARNr 16S. Esto permitió conocer la taxonomía y caracterización bacteriana que reside en la piel, boca, esófago, estómago, colon y vagina <sup>(9, 10)</sup>. De todas estas comunidades bacterianas, la que mayormente llama la atención a la comunidad científica, es la microbiota intestinal ya que en su etapa de maduración forma un complejo ecosistema conformado de aproximadamente 2 billones de células bacterianas que representan 10 veces más que el total de células somáticas humanas y representa 150 veces más genes (microbioma), que en el genoma humano <sup>(11, 12)</sup>.

### **1.3 Microbiota intestinal antes, durante y posterior del parto**

#### **1.3.1 Microbiota intestinal y primeras transmisiones al feto.**

Se pensó durante años, que el intestino del feto es estéril dentro del útero. Sin embargo, al analizar el meconio de neonatos sanos nacidos por cesárea, Jiménez y cols, observó la presencia de bacterias ácido láctico productoras. Tal hallazgo reveló que los fetos no son completamente estériles y puede existir una transmisión de bacterias comensales por parte de la madre al hijo, sin embargo esta información aún es incierta y controversial <sup>(13)</sup>.

#### **1.3.2 Microbiota intestinal durante el nacimiento.**

El tipo de nacimiento puede determinar la composición de la microbiota intestinal en la infancia temprana <sup>(14)</sup>. Los niños nacidos por cesárea parecen presentar cambios en su microbiota intestinal debido a la falta de contacto del recién nacido con la microbiota vaginal de la madre. En este sentido, el grupo de investigación de

Domínguez-Bello y cols, encontró en su investigación que el grupo de niños nacidos por parto vaginal presentó una colonización intestinal microbiana enriquecida de *Lactobacillus*, seguido de *Bacteroides* en comparación de aquellos niños que no fueron expuestos a fluidos vaginales. A su vez, estos niños que nacen por cesárea albergan comunidades enriquecidas por la microbiota de la piel <sup>(14)</sup>.

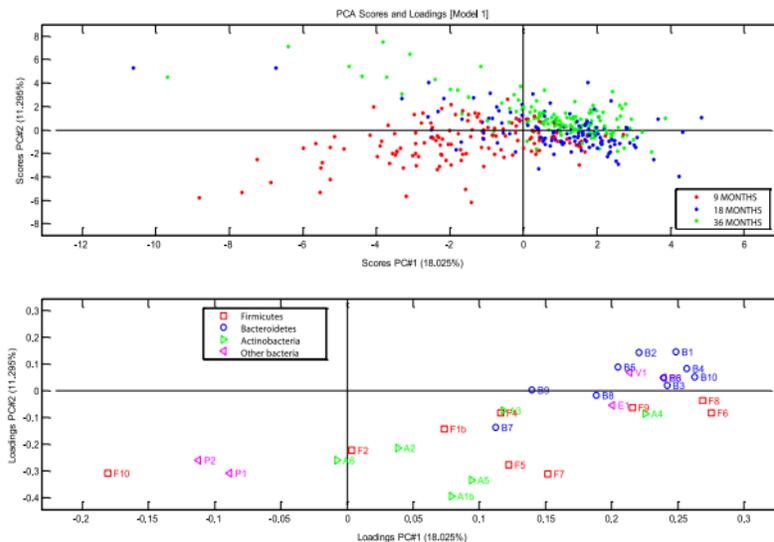
Estudios epidemiológicos señalan que los nacimientos vía cesárea representan en algunos países más del 50% del total y el problema real es la demostración de asociaciones de este tipo de nacimiento con un mayor riesgo a desarrollar enfermedades como obesidad, asma y alergias <sup>(14)</sup>.

### **1.3.3 Impacto de la lactancia en el neonato**

En los últimos años, los resultados proporcionados por diferentes grupos de investigación sugieren que ciertas bacterias del tracto gastrointestinal materno podrían migrar a las glándulas mamarias a través de un mecanismo que implica a las células inmunes mononucleares, por una ruta celular endógena (la vía bacteriana entero-mamaria), y posteriormente colonizar el tracto gastrointestinal del neonato alimentado con leche materna <sup>(15)</sup>. La leche materna contiene una gran cantidad de compuestos bioactivos y factores inmunológicos que conducen a la maduración del intestino del infante <sup>(15)</sup>. Tales compuestos incluyen a la inmunoglobulina (IgA), lactoferrina, lisozima, alfa-lacto albúmina, lípidos complejos y los oligosacáridos <sup>(15, 16)</sup>. Estos últimos tienen una concentración en la mujer lactante, hasta de 100 veces mayor que en cualquier otro mamífero y actúan directamente como prebiótico y promueven la proliferación de bacterias que benefician el intestino del neonato como las bifidobacterias, que constituyen entre el 60% al 91% del total de bacterias en su intestino. Una función importante de los oligosacáridos, es bloquear los sitios de unión de patógenos en el intestino reduciendo su colonización en el infante <sup>(16)</sup>.

### 1.3.4 Microbiota intestinal después del nacimiento

La microbiota intestinal mantiene estabilidad y es menos sensible a la modificación cuando el infante alcanza los tres años de edad, es aquí cuando las bacterias que colonizan el intestino se convierte a una muy similar a la que posee el adulto y se alcanza una microbiota intestinal madura <sup>(17)</sup>. Estudios longitudinales como el que realizó Bergström A y cols, que por un lapso de tres años consecutivos evaluó una cohorte de 330 niños lactantes sanos y caracterizó diferentes niveles filogenéticos; definió que la composición de la microbiota intestinal cambia sobre todo entre los meses 9 y 18 después del nacimiento, especialmente cuando los lactantes reciben la alimentación complementaria <sup>(21)</sup>. Los principales cambios están dados por la sustitución de una microbiota dominada por *Lactobacillus*, *Bifidobacterias* y *Enterobacteriaceae*, por una enriquecida de *Clostridium* spp. Además del establecimiento de géneros pertenecientes al grupo *Prevotella* y *Bacteroides* entre los 9 y 36 meses (Figura 2)<sup>(18)</sup>.



**Fig 2. Análisis de componentes principales del cambio de microbiota de niños en un periodo consecutivo de 3 años.** Esta figura muestra dos componentes principales que explican el 18% y el 11.2% de la varianza de los datos. El cuadrante superior muestra con puntos de colores, el cambio de la microbiota intestinal a los 9(rojo), 18(azul) y 36 (verde) meses. El cuadrante inferior izquierdo muestra altas abundancias a los 9 meses de *Enterococcus* spp (F10), *Enterobacteriaceae* (P1), y *Escherichia coli* (P2). En menor cantidad, *B. breve* (A6) y *Lactobacillus* spp. (F2). A los 36 meses las abundancias más altas pertenecen a *Bacteroidetes* (B1), grupo *Bacteroides-Prevotella* (B2), *Bacteroides* spp. (B3), *B. fragilis* group (B4), *B. vulgatus* (B5), *Bacteroides thetaiotaomicron* (B6), *Alistipes* spp. (B10), *A. muciniphila* (V1), y *Desulfovibrio* spp. (P3). (Referencia: Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. Appl Environ Microbiol. 2014; 80:2889–90017.)

### **1.3.5 Consumo de antibióticos y su impacto en la microbiota intestinal**

Después de que la diversidad de la microbiota intestinal humana aumenta posterior a los tres años de edad, la composición puede fluctuar en respuesta a factores externos, tales como el consumo de antibióticos <sup>(19)</sup>. Estudios previos, como el de Panda, S. y cols, demuestran que el consumo de antibióticos beta-lactámicos o fluoroquinolonas en ratones, disminuye significativamente la diversidad microbiana en un 25% y reduce a nivel filogenético a 12 de 29 taxones <sup>(19)</sup>. Así también, se demostró cambios taxonómicos en el microbioma de ratones jóvenes que consumieron antibióticos y se observaron alteraciones en genes implicados en el metabolismo de CHO complejos. Asimismo, se observó una producción aumentada de ácidos grasos de cadena corta y alteraciones en el metabolismo hepático de lípidos y colesterol (Cho y cols; 2012). Esto demuestra que existe una alteración en la homeostasis metabólica por el uso de antibióticos desde la etapa temprana de la vida y que aplicados en el infante de manera indiscriminada, podría generar consecuencias metabólicas a largo plazo que repercutiría, generando obesidad <sup>(20)</sup>.

## **1.4 Microbiota intestinal, funciones e interacciones**

### **1.4.1 Microbiota intestinal: un órgano metabólico**

Especialmente en el colon distal, la microbiota es conocida como órgano metabólico ya que contribuye a la fermentación de hidratos de carbono y fibra no digerible en tracto alto digestivo; produciendo ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido propiónico, ácido acético y ácido butírico principalmente, que pueden repercutir en procesos fisiológicos relacionados con el metabolismo energético, incluyendo la saciedad, la lipogénesis hepática y la deposición de grasa en adipocitos <sup>(21)</sup>.

Además existen otras funciones, como el aprovechamiento y asimilación de los macro y micronutrientes provenientes de la dieta, así como la capacidad de la síntesis de vitaminas y síntesis *de novo* de aminoácidos esenciales como treonina y lisina <sup>(22, 23)</sup>.

### 1.4.2 Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC)

Los AGCC actúan también como moléculas de señalización, y Yeon- Hee y cols; 2006, descubrió que activan a dos receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas en el intestino; (GPR41 ó FFAR3) y GPR43 ó FFAR2), que traducen señales extracelulares a través de la membrana plasmática, permitiendo la activación de respuestas mediante la transmisión de señales en cascada por segundos mensajeros como los AMPc dependientes de proteína quinasa A y proteína quinasa C <sup>(24, 25)</sup>.

En este sentido el propionato activa al receptor GPR41, que actúa como un sensor energético en el intestino relacionado con la microbiota y el sistema nervioso simpático; estimula por ejemplo, la producción de leptina; mientras que el acetato y el propionato son ligandos de GPR43 cuyo papel se centra en la adipogénesis y en desarrollo de tejido adiposo<sup>(25, 26)</sup>. Por otro lado, el butirato activa preferentemente a GPR41, aunque también es el ácido graso de cadena corta que emplea el colonocito como principal fuente de energía <sup>(26)</sup> .

FFAR2 y FFAR3 también se expresan en un subconjunto de células enteroendócrinas donde las células L y K se encuentran presentes. De tal manera que estimulados por el butirato y el propionato en el epitelio de la mucosa, se regula la secreción de péptido YY y otras hormonas peptídicas como las incretinas anorexigénicas GLP-1 y GIP; produciendo la inhibición de la ingesta de alimentos <sup>(27)</sup>.

Por otro lado, se ha reportado que el propionato posiblemente es utilizado como substrato para la gluconeogénesis hepática de *novo* y que además suprime la lipogénesis a través de la disminución de la expresión de la ácido graso sintasa <sup>(22)</sup>. Además se ha demostrado que el acetato y el butirato también son substratos lipogénicos a nivel hepático <sup>(22)</sup>.

Los (AGCC), proporcionan uno de los ejemplos más claros de cómo los macronutrientes como polisacáridos complejos, que al no poder ser digeridos por los seres humanos son procesados por la microbiota mediante fermentación microbiana, y en simbiosis con el hospedero promueven la respuesta inmunológica <sup>(28)</sup>. En ese sentido el butirato puede modificar el perfil de la producción de citocinas en las células T auxiliares y promover la barrera del epitelio intestinal, que a su vez puede ayudar a limitar la exposición del sistema inmune de la mucosa a microorganismos luminales y prevenir respuestas inflamatorias aberrantes <sup>(28)</sup>.

Yun Kyung lee, señaló que el (GALT), que es la primera línea de defensa de la mucosa intestinal, se encuentra alterado en ratones libres de gérmenes. Además estos animales poseen menos placas de Peyer y menos ganglios linfáticos mesentéricos en comparación con ratones que si poseían microbiota <sup>(29)</sup>.

En esa alianza forjada entre las bacterias intestinales y el ser humano es bien sabido que miembros comensales del género *Bacteroides* inducen la expresión de moléculas antimicrobianas que fungen como moléculas inmunomoduladoras, como *Bacteroides fragilis* que produce (ZPS) que activa a las células T CD4+ y puede corregir ciertos defectos inmunes, tales como la reducción del porcentaje de células T CD4+ en la población de linfocitos del bazo, además de disminuir la expresión de citocinas pro-inflamatorias en el intestino <sup>(30)</sup>.

### **1.4.3 Composición de la microbiota intestinal**

El 90% de la comunidad bacteriana intestinal distal está dominada principalmente por dos filos bacterianos llamados Firmicutes y Bacteroidetes. Además existen otros filos presentes en menor abundancia como Actinobacteria y Proteobacteria pero poco se sabe acerca de los factores que rigen las interacciones entre todos estos miembros (Figura 3)<sup>(1, 31)</sup>.

**Principales divisiones o phyla del Dominio Bacteria que componen la microbiota del intestino humano.**

<b>Phylum</b>	<b>Características</b>	<b>Géneros representativos</b>
Firmicutes	Es una división de las bacterias que agrupa a más de 250 géneros, compuesta por bacterias Gram positivo de bajo contenido en Guanina y Citosina (G+C) en su DNA. Pueden tener forma bacilar o cocacea y se subdivide en dos clases taxonómicas: Bacilli y Clostridia.	<i>Ruminococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus</i>
Bacteroidetes	Esta división incluye alrededor de 20 géneros bacterianos y está compuesta por 3 clases: Bacteroidia, Flavobacteria y Sphingobacteria	<i>Bacteroides</i>
Proteobacterias	Son el grupo o phylum más grande de las bacterias e incluye una amplia variedad de bacterias patógenas. Todos sus miembros son bacterias Gram negativo que poseen una membrana externa y lipopolisacradido. Está dividido en 6 clases: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria y Zetaproteobacteria.	<i>Desulfovibrio</i> <i>Escherichia</i> <i>Helicobacter</i>
Actinobacteria	Es uno de los grupos dominantes del dominio bacteria. Está compuesto por bacterias Gram positivo de alto contenido G+C de su DNA de hábitat terrestre o acuático.	<i>Bifidobacterium</i> <i>Actinomyces</i>
Verrucomicrobia	Es un grupo o phylum reciente del dominio Bacteria y se han descrito unas pocas especies. Está formado por tres clases: Spartobacteria, Opitutae y Verrucomicrobiae.	<i>Verrucomicrobium</i>

**Fig 3. Filogenia de la microbiota gastrointestinal humana.** (Referencia: Mönckeberg f. y Corsini g. 2011).

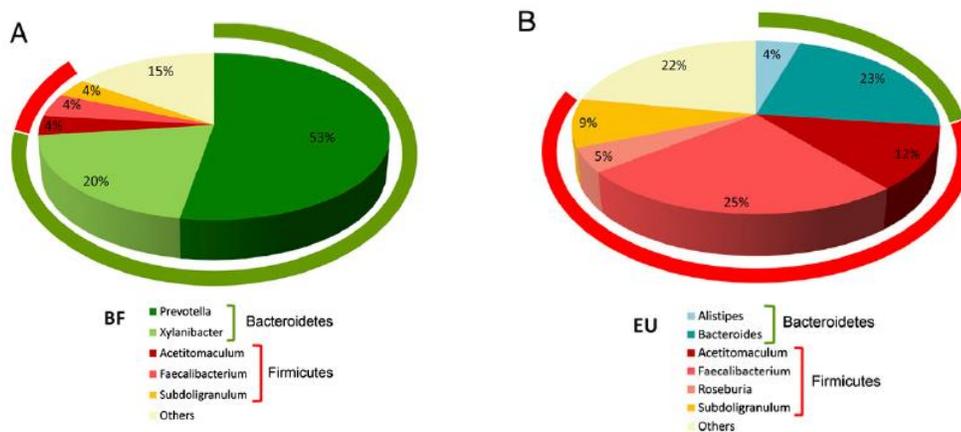
#### **1.4.4 Clasificación de la microbiota intestinal por enterotipos.**

Para simplificar la complejidad de la microbiota intestinal Arumugam y cols, sugirió que las comunidades microbianas del intestino humano pueden ser agrupadas en tres enterotipos dada la robustez que presentan estas comunidades bacterianas y está representado por estos géneros dominantes: Bacteroides, Prevotella y Ruminococcus. Estos enterotipos no se correlacionan con propiedades del hospedero como la nacionalidad, la edad, el sexo o el índice de masa corporal, por

lo que pueden desempeñar un papel como potenciales marcadores bacterianos diagnósticos <sup>(32)</sup>.

Asimismo, se ha demostrado que los enterotipos no difieren en riqueza y son estables al paso del tiempo hasta en un lapso de dos años y las funciones metabólicas que desempeñan son tan importantes que estudios de metagenómica evidencian su implicación en la biosíntesis de diferentes vitaminas tales como biotina, riboflavina, pantotenato y ascorbato, así como en la formación de tiamina y folato <sup>(32, 33)</sup>.

En trascendencia con lo anterior, es importante mencionar que estudios recientes indican que los enterotipos *Bacteroides* (enterotipo 1) y *Prevotella* (enterotipo 2), están asociados con el consumo a largo plazo de dietas altas en grasa y dietas con alto contenido de fibra respectivamente (Figura 4), atribuyendo a la dieta uno de los principales factores que contribuyen a la diversidad y a las adaptaciones sustanciales producidas en la microbiota del intestino humano <sup>(33, 34)</sup>. En este sentido el enterotipo *Bacteroides* particularmente podría influir en la incidencia de enfermedades asociadas a una dieta occidental.



**Fig 4. Comparación de la abundancia relativa de filos y géneros bacterianos en dos poblaciones de niños: africanos y europeos.** Los cambios de la composición de la microbiota intestinal es atribuida a las diferentes dietas entre regiones. Los enterotipos predominantes son los géneros *Bacteroides* y *Prevotella* (Referencia: De Filippo C et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Aug 17; 107(33):14691-6.

## 1.5 Microbiota y alteraciones

### 1.5.1 Cambios en la dieta y repercusión en la microbiota intestinal.

Existe una creciente preocupación respecto a los cambios en el estilo de vida de algunos países, particularmente en el consumo de dietas occidentales (con alto contenido en grasa y azúcar), porque han alterado la composición y la actividad metabólica de los microorganismos residentes en el intestino humano, y estos cambios inducidos por la dieta contribuyen al crecimiento epidemiológico de enfermedades crónicas, incluyendo obesidad <sup>(35)</sup>.

David LA y cols, reportó en el año 2014 que la dieta basada en carne y grasas aumentaba la abundancia de microorganismos como Bacteroides, Alistipes y Bilophila, y disminuía a los Firmicutes que metabolizan polisacáridos complejos consumidos en la dieta tales como Roseburia, Eubacterium rectale y Ruminococcus bromii <sup>(35)</sup>.

Por otro lado, De Filippo C y cols, reportó que los niños africanos de una villa en el país Burkina Faso, cuyo consumo dietético estaba basado en una dieta rica en fibra, presentó mayor enriquecimiento de Bacteroidetes y una disminución de Firmicutes. Aunque también observó una abundancia única de bacterias del género Prevotella y Xylanibacter que contienen un conjunto de genes bacterianos para hidrólisis de celulosa y xilano que no observó en niños europeos que consumían dietas altas en grasa, lo que sugiere cambios en la colonización bacteriana intestinal de acuerdo a la dieta <sup>(34, 35)</sup>.

También se ha demostrado que dietas altas en grasa consumida por humanos podría contribuir a niveles altos en plasma de LPS, facilitando la endotoxemia metabólica que es un factor implicado en la aparición y progresión de inflamación y enfermedades metabólicas <sup>(36)</sup>.

## **1.5.2 Disbiosis intestinal**

Los seres humanos viven en simbiosis con un ecosistema bacteriano estrechamente ligado llamado microbioma. Este influye en muchos aspectos de la salud humana, pero cuando este ecosistema microbiano se altera, la salud del hospedero sufre una condición llamada disbiosis <sup>(37)</sup>.

Las perturbaciones en las comunidades simbióticas bacterianas intestinales pueden tener un efecto negativo y comprometer seriamente funciones cruciales como la defensa contra la colonización de patógenos, la digestión de alimentos y el suministro de vitaminas y nutrimentos, además de estar fuertemente implicada a desordenes autoinmunes y susceptibilidad al cáncer <sup>(37)</sup>.

Las bacterias Gram-negativas producen una endotoxina llamada lipopolisacárido (LPS), que funge como una molécula proinflamatoria que se puede trasladar al torrente sanguíneo cuando la permeabilidad del intestino aumenta, promoviendo una alteración en las proteínas de unión estrecha del intestino tales como las OZ-1 y ocludinas, implicadas en la función de la barrera intestinal. Además, se ha visto que este efecto promueve endotoxemia metabólica, generada por la disbiosis intestinal y que puede ser un factor para el desarrollo de obesidad y de diabetes <sup>(36, 38)</sup>.

## **1.6 Mala nutrición y microbiota**

### **1.6.1. Mala nutrición y el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas**

#### **1.6.1.1 Desnutrición**

La mala nutrición incluye a la desnutrición y la obesidad/sobrepeso. La primera, se caracteriza por un retraso del crecimiento en relación a la edad, definido como menos de dos desviaciones estándar según lo estipulado por la OMS <sup>(39)</sup>. Existe un

27% de niños menores de 5 años de edad en países con ingresos bajos y medios que presentan esta condición, 170 millones en total; y aunque se estima que ha disminuido 35% en los últimos años en todo el mundo, estudios transversales demuestran que el retraso en el crecimiento en niños es una problemática que se asocia con mayor riesgo al desarrollo de obesidad central, aumento de grasa corporal, resistencia a la insulina e hipertensión en la vida futura <sup>(39)</sup>.

#### **1.6.1.2 Obesidad**

La obesidad está caracterizada por la acumulación excesiva de grasa corporal y las comorbilidades relacionadas a esta enfermedad incluyen, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares <sup>(40)</sup>. En el año 2005 se registraron 400 millones de casos en todo el mundo, y la estimación de casos para el año 2015 es de 700 millones de casos, no obstante esta tendencia podría continuar hasta el 2030 <sup>(41)</sup>. Son muchos los factores tanto ambientales como genéticos que contribuyen a esta enfermedad. Algunos individuos parecen más susceptibles que otros, esto en gran medida por la ubicación geográfica en la que habitan y probablemente la estimación de heredabilidad es partícipe desde un 40% a 70% <sup>(41)</sup>.

#### **1.6.3 Microbiota intestinal: Nuevo factor ambiental para explicar patologías**

Los avances en las herramientas para la investigación molecular han permitido comprender como las bacterias intestinales pueden influir en la fisiología del hospedero y en la regulación del metabolismo energético del mismo. Por lo que la microbiota intestinal se ha convertido en un posible factor ambiental explicativo del desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como diabetes tipo 2, así como de aquellas relacionadas con estados perjudiciales de la nutrición; incluyendo la obesidad y la desnutrición <sup>(42, 43)</sup>.

#### **1.6.4 Transición epidemiológica y nutricional en México**

Durante los últimos 30 años México ha sufrido varios cambios demográficos, económicos, ambientales y culturales que han tenido un impacto adverso en el estilo de vida y estado de salud <sup>(44)</sup>. Aproximadamente el 75 % de todas las muertes en México son causada por enfermedades no transmisibles. Las dietas occidentales con alto contenido energético y altas en grasas, se encuentran entre los principales factores que contribuyen a la obesidad, y dichas dietas se asocian con 28% de muertes de los mexicanos al año, con un total de 170.000 personas <sup>(44)</sup>.

Paradójicamente en esta etapa de la transición epidemiológica y nutricional en niños coexiste una epidemia de obesidad y sobrepeso (>30%), y al mismo tiempo, un incremento substancial de desnutrición crónica (13.1%) <sup>(45)</sup>. En una etapa de esta transición la población desnutrida tiende a la sobrealimentación, por lo que rápidamente generan un aumento de peso y acumulación de adiposidad central, aunque los mecanismos asociados con este proceso aún son desconocidos <sup>(45)</sup>.

#### **1.7 Introducción**

Reportes previos como el de Fredrik Backhed y cols, 2004; sugieren que la microbiota intestinal promueve la absorción de monosacáridos en el lumen intestinal, generando como resultado la inducción de la lipogénesis hepática *de novo* <sup>(8)</sup>. También se demostró que la microbiota suprime selectivamente en el epitelio intestinal al factor de adipocitos inducido por ayuno (FIAF), una angiopoyetina miembro perteneciente a una familia de proteínas, que a su vez inhibe a la LPL, y que dicha supresión promueve la deposición de triglicéridos en los adipocitos. Con estos hallazgos se propuso que la microbiota intestinal es un factor importante que afecta la obtención y almacenamiento de energía proveniente de la dieta del hospedero <sup>(8)</sup>.

En estudios como el realizado por Ridaura, V.K y col, (2013); se demostró a través del trasplante de materia fecal proveniente de gemelas monocigotas discordantes (una con obesidad y la otra delgada), a ratones libres de gérmenes; que el grupo de animales que recibió el trasplante de la donante con obesidad, desarrolló un aumento de la adiposidad comparados con aquellos que recibieron trasplantes de la donante delgada, lo que indica que las comunidades bacterianas modulan el metabolismo y ejercen un efecto en la composición corporal del fenotipo <sup>(46)</sup>.

Adicionalmente se ha encontrado una menor riqueza bacteriana de la microbiota intestinal en individuos con obesidad, así como una ganancia de peso en estos individuos al paso del tiempo <sup>(41)</sup>. Asimismo, Gordon y cols, (2005); encontró que existe una disminución del filo Bacteroidetes, así como un aumento del filo Firmicutes en ratones (*ob/ob*); y dilucidó que estos cambios en el ecosistema de la microbiota intestinal, podrían promover la adiposidad en este fenotipo<sup>(47)</sup>.

Consecuentemente este grupo de investigación encontró este mismo patrón en humanos, con una notable reducción en el filo de Bacteroidetes en los pacientes con obesidad, comparados con sujetos delgados. Interesantemente estos pacientes obesos perdieron peso sometiéndose a dos tipos de dietas bajas en calorías y aumentaron la población de Bacteroidetes; lo que indica que el fenotipo obeso posee una ecología microbiana intestinal particular que aún no ha sido esclarecida <sup>(48)</sup>.

En 2013 el grupo de investigación dirigido por Smith y cols, investigó el papel de la microbiota intestinal en 317 pares de niños gemelos de Malawi con kwashiorkor, una forma de desnutrición severa que es la consecuencia de la ingesta inadecuada de nutrientes. Este grupo de niños recibió un tratamiento terapéutico alimentario y obtuvo una maduración transitoria de las funciones metabólicas del microbioma estudiadas por metagenómica, que a su vez decreció cuando se les removió el tratamiento<sup>(49)</sup>.

También, en esta investigación se estudió a ratones receptores libres de gérmenes que fueron trasplantados con microbiota de los niños con kwashiorkor, produciéndoles una pérdida de peso notable, acompañada de perturbaciones en aminoácidos e hidratos de carbono, por lo que estos descubrimientos implican al microbioma intestinal inmaduro como un factor causal en este tipo de desnutrición severa <sup>(49)</sup>.

Preidis y cols en 2015, estudió en un modelo de ratones neonatos desnutridos y demostró que la cantidad de Bacteroidetes a nivel de filo presentaba menor abundancia, además determinó que este estado nutricional conlleva a un incremento de algunas especies bacterianas en el colon distal, así como también la disminución de otras <sup>(50)</sup>.

Cuando analizó la riqueza y la diversidad bacteriana, observó que presentaban pérdidas, e incluso demostró alteraciones en la expresión de algunos genes implicados en la extracción de energía proveniente de dietas no digerible (fibras); como los responsables de degradar glicanos y fitatos<sup>(50)</sup>.

## **2. Justificación**

Estudios transversales demuestran que México se encuentra en una transición epidemiológica y nutricional que deriva en la coexistencia de alta prevalencia de sobrepeso/obesidad y desnutrición crónica en la población infantil, sobre todo en las comunidades donde existe un grave rezago económico y social. Particularmente en Chimalhuacán, Estado de México estos padecimientos han alcanzado cifras alarmantes, siendo uno de los municipios más afectados en el país. La población infantil con desnutrición crónica en un país en desarrollo como lo es México, se caracteriza por tener mayor susceptibilidad a padecer enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2. Cambios en la microbiota intestinal han demostrado ser posibles factores implicados en el desarrollo de estas enfermedades metabólicas. Por lo que es necesario llevar a cabo estudios que caractericen el tipo y la abundancia de estas bacterias residentes en el intestino de individuos con desnutrición y obesidad para identificar patrones que sean útiles como biomarcadores bacterianos en la prevención de estas enfermedades relacionadas a la nutrición. En México existen pocos estudios de microbiota intestinal especialmente en niños que describan alteraciones o hallazgos importantes que coadyuven en acciones de intervención que disminuyan la mala nutrición.

### **3. Hipótesis**

La diversidad y la abundancia de la microbiota intestinal en escolares de Chimalhuacán con mala nutrición difieren respecto a los escolares sanos.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

- Describir la diversidad y la abundancia de la microbiota intestinal en escolares de Chimalhuacán con mala nutrición.

### **4.2. Objetivo específicos**

- Identificar la mala nutrición en la población de estudio.
- Relacionar variantes de microbiota intestinal con parámetros antropométricos y bioquímicos.
- Relacionar variantes de microbiota intestinal con parámetros de dieta.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Tipo de estudio

Estudio descriptivo, observacional analítico de casos y controles, no probabilístico. El esquema general de trabajo que se llevó a cabo en este estudio se muestra en la (Figura 5).

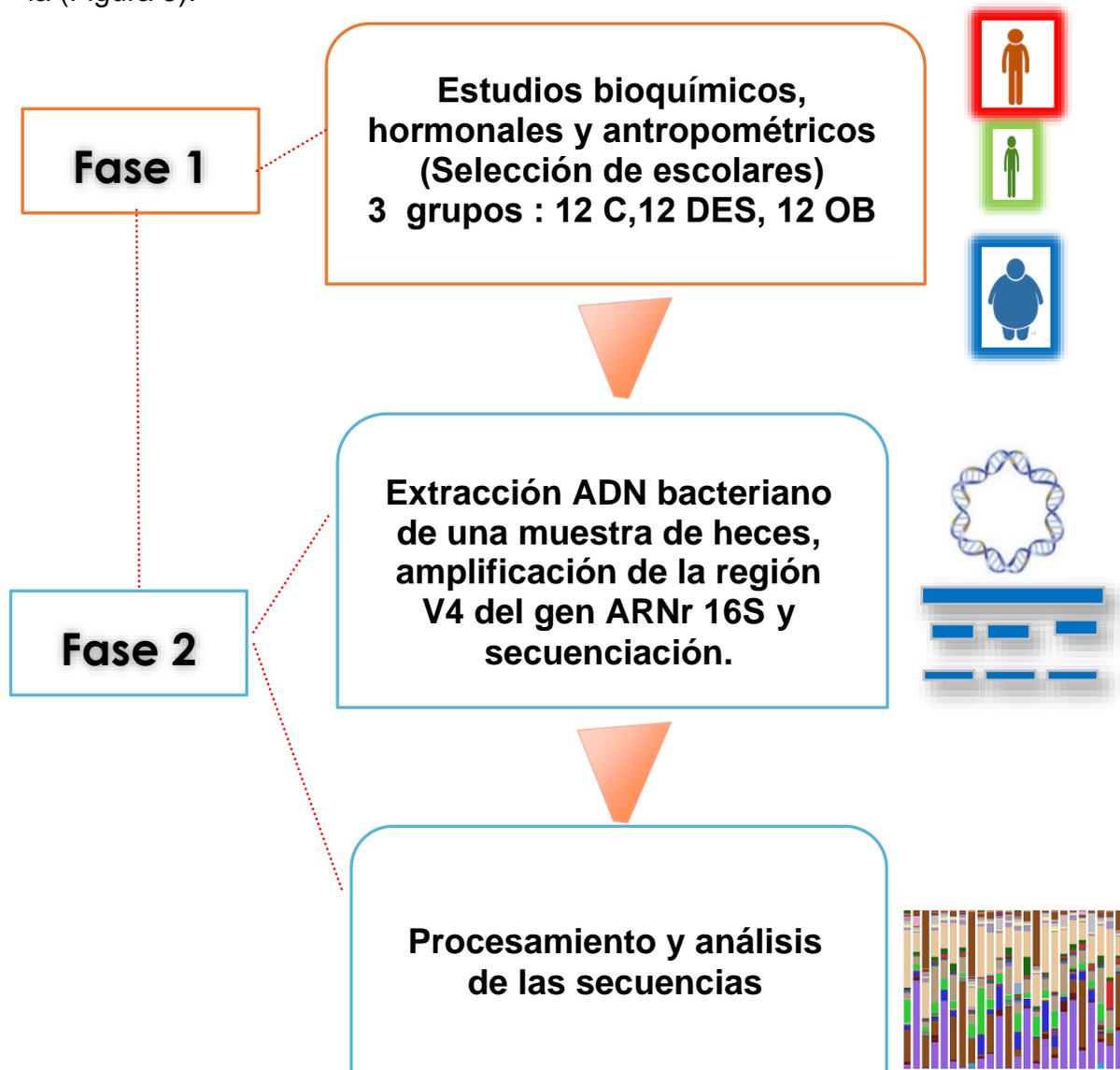


Fig 5. Esquema general de trabajo

## 5.2. Descripción del universo de trabajo

Se seleccionó un grupo de escolares provenientes de escuelas de educación primaria del municipio de Chimalhuacán Estado de México, de entre 9 -11 años de edad y que participó voluntariamente. El grupo de participantes firmó cartas de asentimiento informado (ANEXO 2). Asimismo, tutores de cada uno de los escolares firmó cartas de consentimiento (ANEXO 1). Se llevó a cabo la recolección de las muestras de heces para procesamiento del material genético bacteriano. Dicho protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Juárez de México con el número de registro: HJM 2315/14-C

## 5.3. Criterios de inclusión.

- **Grupo 1, grupo control.** Niños normopeso sin alteraciones bioquímicas
- **Grupo 2, grupo desnutrición.** Los niños con desnutrición crónica fueron seleccionados por el puntaje del Z- score menor a -2.0 (baja talla para edad), siguiendo los criterios de la OMS para el diagnóstico de desnutrición crónica.
- **Grupo 3, grupo obesidad.** Niños con obesidad central obteniendo el percentil  $\geq 75$  mediante tablas percentiles de referencia (Fernández, J. R, *The Journal of pediatrics*, 145(4), 439-444, 2004). Además se estratificó este grupo de estudio mediante la medición del pliegue tricipital con su respectivo percentil y la medición del pliegue subscapular; además de la medición de grasa corporal mediante impedancia eléctrica.
- La inclusión para todos los grupos incluye la firma de consentimiento y asentimiento informado

## 5.4. Criterios de exclusión.

- Uso de antibióticos 6 meses previos
- Niños con asma o enfermedades atópicas
- Niños con diarrea el último mes previo.

## **5.5. Criterios de eliminación.**

Muestras de heces que durante la recolección tuvieron contacto directo con orina y/o agua del excusado.

## **5.6. Tamaño de muestra.**

Se tuvo acceso a un total de 12 muestras por cada grupo de estudio, este modelo representa un modelo no probabilístico en un muestreo por conveniencia.

## **5.7. Desarrollo metodológico**

### **5.7.1 Análisis bioquímicos sanguíneos.**

Muestras sanguíneas fueron recolectadas después de un ayuno de 12 horas obtenidas mediante una punción intravenosa de vena cubital. La glucosa en suero fue determinada por el método de glucosa oxidasa. Así también se evaluaron los niveles en suero de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triglicéridos, HDL colesterol, LDL colesterol, VLDL colesterol. Además se midió la concentración de bilirrubinas total, directa e indirecta, proteínas totales, albúmina, globulina en el equipo Advia 1800 (Siemens, Atlanta, EEUU).

### **5.7.2. Determinación de niveles de insulina en suero.**

La concentración de insulina sérica se determinó mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia con un equipo Advia 1800 (Siemens, Atlanta, EEUU)

### **5.7.3. Determinación de niveles de leptina y adiponectina en suero.**

Se realizó la obtención de suero a partir de las muestras colectadas de sangre en ausencia de anticoagulante y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El suero obtenido se empleó para realizar la cuantificación de leptina y adiponectina por ensayo de ELISA utilizando los kits Human Leptin ELISA kit y Human adiponectin que tienen una sensibilidad de 0.5 ng/dL. Se realizaron curvas de concentración para la obtención de los resultados cuantitativos, se emplearon controles para control de calidad.

La técnica ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático basado en la captura de un antígeno presente en el suero por medio de un anticuerpo (anti-leptina, anti-adiponectina), inmovilizado en una fase sólida que reconoce un epítipo del antígeno y que además está unido a una enzima. La identificación y cuantificación del antígeno se hace evidente mediante la adición del sustrato de dicha enzima y su conversión a un producto colorido que puede ser detectado mediante espectrofotometría.

#### **5.7.4. Estudios antropométricos.**

La medición de peso, índice de masa corporal y el porcentaje de grasa se efectuó por medio de impedancia bioeléctrica con el analizador (TANITA BC 1500 V2.5.629.0®) con 0,1 kg de precisión. Conjuntamente se midió la cadera en posición recta midiendo entre la costilla inferior y la *cresta iliaca*. Se evaluó el peso para la edad, talla para edad y peso para talla a través del Z-score por el software Anthro Plus v1.0.4.

La talla se obtuvo mediante un estadiómetro utilizando intervalos de 0,1 cm. Los PS tricipital y subescapular fueron medidos mediante un plicómetro Harpenden a una presión constante de 10g/mm<sup>2</sup>. Las mediciones fueron hechas por el mismo investigador entrenado, utilizando técnicas debidamente estandarizadas. Estas mediciones fueron realizadas en triplicado, tomándose el promedio de las tres para efectos de cálculo.

#### **5.7.5. Análisis de la dieta.**

La información de la dieta fue obtenida a través de métodos semi-cuantitativos como lo son los cuestionarios de frecuencia de alimentos y recordatorios de 24 horas validados para población mexicana. La estimación de consumo de nutrimentos y energía fueron determinados usando el software *NutricKal*, y se calculó el total de energía consumida en kilocalorías, porcentaje de CHO, proteínas, lípidos, ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados con su respectivo gramaje por día. También se determinó el consumo de vitaminas y minerales.

#### **5.7.6. Procesamiento de heces.**

Se obtuvieron muestras de heces por la mañana antes del desayuno. Se recolectó en condiciones de esterilidad en frascos de polipropileno. La materia fecal se transportó al laboratorio e inmediatamente se separó en alícuotas de 200 mg, y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Se recolectó un total de 36 muestras de heces: 12 correspondió al grupo de niños con obesidad central, 12 normopeso sanos (controles) y 12 con desnutrición crónica.

#### **5.7.7. Extracción de DNA bacteriano de heces.**

Se extrajo DNA bacteriano de una alícuota de 200 mg de heces mediante el kit QIAamp de Qiagen que emplea perlas magnéticas. Se añadió a la muestra de heces 500 uL de tampón ASL para lisis y se homogenizó. Posteriormente se calentó 10 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  y se agregó una tableta inhibitex. Se centrifugó a 14 mil rpm durante 1 minuto y se obtuvo 200 uL del sobrenadante, posteriormente se añadió 15 uL de proteinasa K, mas 200 uL de tampón AL al sobrenadante. Después se

calentó 30 minutos a 70 °C. Se agregó 200 uL de etanol, se transportó la mezcla a la columna de centrifugación. Los pasos finales incluyeron lavados con tampones AW1 y AW2. Por último se realizó una resuspensión en 50 uL de buffer AE y se almacenó a - 20 °C.

### 5.7.8 Cuantificación de ADN

La concentración de ADN extraído de las muestras de heces se determinó en un espectrofotómetro a través del software “Nanodrop V3.8.1”.

### 5.7.9 Amplificación por PCR del gen ribosomal ARNr 16S

Se amplificó la región V3-V4 del gen ARNr 16S en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, EEUU) en las siguientes condiciones: 20 ciclos de 95 ° C durante 5 minutos, 95 °C durante 1 minuto, seguidos de 45 °C durante 1 minuto, 72 ° C durante 30 segundos y una extensión final a 72 ° C durante 10 minutos usando adaptadores universales de Illumina: P\_UForward(5’AATGATACGGCGACCACCGAGATCTCACTCTTCCCTACACGACGCTCTTC3’-*barcode*). Donde el código de barras es una secuencia de seis bases única para cada muestra.

P\_URreverse(5’CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC3’).

También se presentan las secuencias de la región V3-V4 en la tabla 1.

GEN	SECUENCIA DE LOS PRIMERS DE REGIÓN V3-V4
<b>ARNr 16S</b>	V3 FORWARD CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTACGGGAGGCAGCAG V4 REVERSE: GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACCAGGTATCTAAT

**Tabla 1.** Primers específicos de las regiones hipervariables V3-V4 del gen ribosomal ARNr 16S

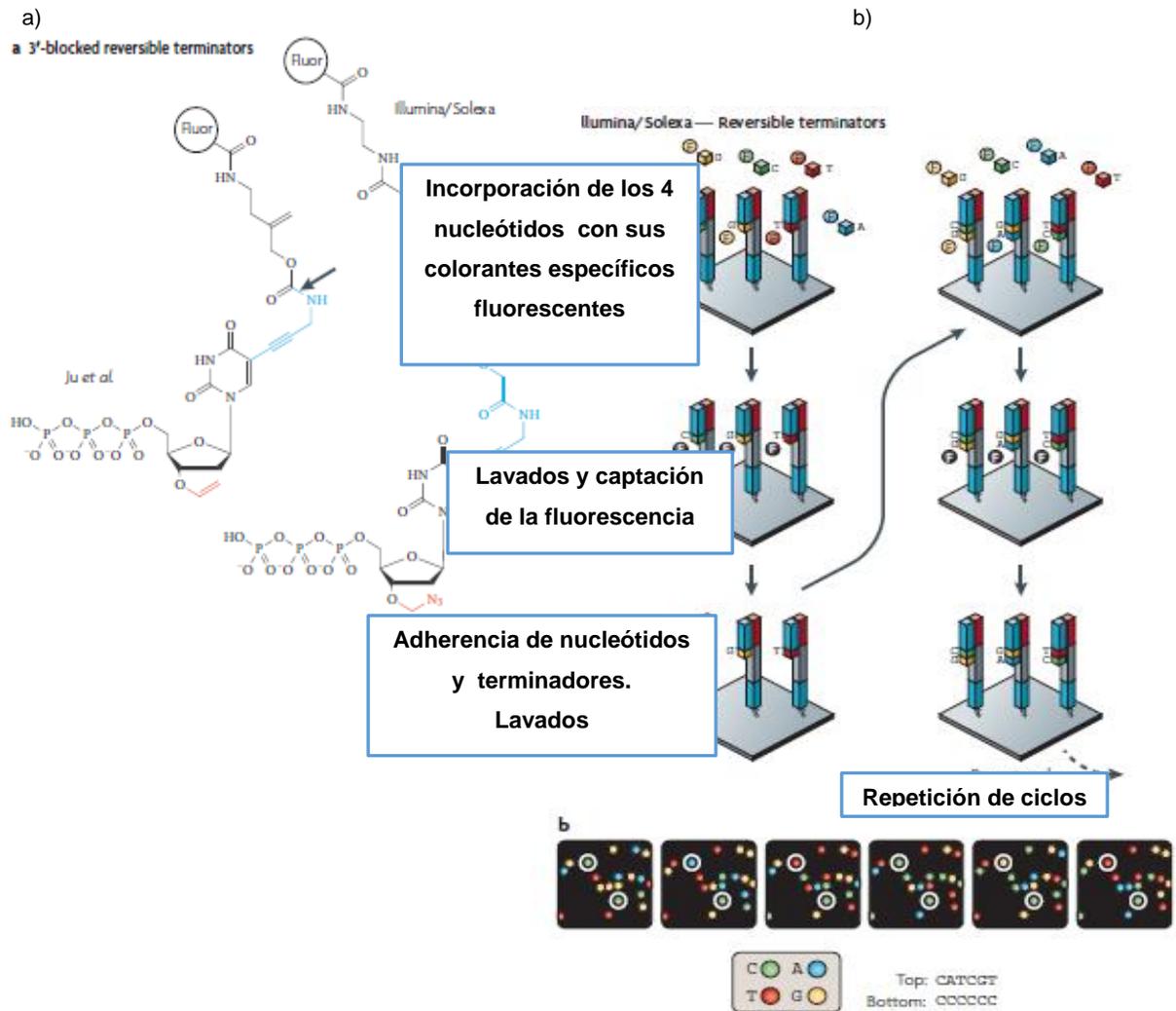
Tras la confirmación del adecuado tamaño de los productos en un gel de agarosa al 2%, se purificaron los amplicones usando el kit de purificación de DNA *QIAamp DNA Stool Minikit*, (Qiagen, Hilden, Germany, según las instrucciones del fabricante y posteriormente se cuantificaron utilizando un fluorómetro qubit 2.0 (Life Technologies Ltd.). Finalmente se creó una mezcla equimolar. La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiSeq, utilizando 2 x 250 pares de bases de longitud de lectura.

#### **5.7.9.1 Secuenciación en el sistema Miseq de Illumina.**

Se realizó la secuenciación masiva en paralelo se detalla a continuación en la figura 6. La clave en la secuenciación de nueva generación, es el uso del método cíclico TRC, que comprende la incorporación de cuatro nucleótidos con diferentes colorantes fluorescentes que fungen como terminadores reversibles 3' bloqueadores.

Estos nucleótidos también llamados dideoxynucleótidos, son modificados con un compuesto químico que bloquea 3', como el 3'-O-azidometil-dNTPs cuya estructura se especifica en la (Figura 8a). Este compuesto se une al oxígeno 3 de la desoxirribosa permitiendo la incorporación de la DNA polimerasa que unida al template o fase sólida lleva a cabo la mutagénesis aleatoria o directa, incorporando (por complementariedad de bases) un nucleótido marcado por fluorescencia durante la reacción de secuenciación. También son importantes para separar la unión del fluoróforo que se une al grupo fosfato, restaurando el grupo OH mediante el uso de un agente tris (2-carboxietil) fosfina e incorporando el terminador bloqueador 3'.

Después de la incorporación, estos son detectados por reflectancia fluorescente interna total mediante el uso de dos láseres, que determinan la identidad del nucleótido incorporado, registrándolo y visualizándolo en un monitor. Finalmente se producen lavados para descartar los nucleótidos no adheridos como se muestra en la (Figura 6b).



**Fig 6.** Método de terminadores cíclicos reversibles en la secuenciación de nueva generación. (Referencia: Michael L. Metzker. Sequencing technologies —the next generation Nature reviews. 2010)

### 5.7.9.2. Análisis estadístico y bioinformático

Los análisis fueron realizados mediante el programa R versión 3.3.0, Viena, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Los datos antropométricos, bioquímicos y hormonales se presentan en media  $\pm$  desviación estándar (DE) y/o percentiles según corresponda. El análisis de normalidad se realizó mediante el test de Shapiro-Wilk y se usó la prueba ANOVA de una vía o Kruskal Wallis según su el criterio de homocedasticidad, considerando una  $p < 0.05$  como significancia estadística.

El análisis de componentes principales se realizó mediante los paquetes estadísticos: (stats package) y dudi.pca (ade4 package). La asociación entre variables se determinó mediante test de Spearman. El nivel de significancia estadística se fijó en 5% y se empleó el paquete ("Corrplot") en el programa R versión 3.3.0.

La plataforma Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) versión 1.8.0, fue empleada para asignar las lecturas de la secuenciación a unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

Los códigos de barra fueron cortados, y todas las lecturas de baja calidad fueron removidas, el criterio de calidad será un score de 30. No se permitió *mismatches* en la secuencia del primer. Las secuencias obtenidas fueron agrupadas basadas en 0.97 de similitud utilizando UClust para generar las unidades taxonómicas operaciones (OTUs). Las secuencias fueron alineadas utilizando PyNAST y la base de datos Greengenes, para finalmente ensamblar el árbol filogenético.

Para conocer las diferencias entre los fenotipos, se utilizó; el índice de diversidad Shannon para determinar la diversidad  $\alpha$ , el índice Chao1 para estimar la riqueza, y los OTUS para especies observadas. Para los análisis de  $\alpha$  diversidad, se utilizó un ensayo t paramétrico a una profundidad del mayor número de secuencias encontradas en el estudio para la comparación entre tratamientos.

Para los análisis de la  $\beta$  diversidad se utilizó árboles filogenéticos creados a partir de los OTUs para la construcción de la matriz de distancias sin ponderaciones

(UniFrac). Para el caso de la  $\beta$  diversidad se utilizó el mayor número de secuencias encontradas en el estudio.

Las abundancias relativas bacterianas fueron analizadas mediante ANOVA con una prueba post-hoc.

Para medir la agrupación de géneros bacterianos entre los grupos de estudio se empleó el análisis de las coordenadas principales con el paquete estadístico (ade4 package) en R versión 3.3.0.

Se comparó e identificó la abundancia de los linajes bacterianos detectados en la secuenciación entre los fenotipos de mala nutrición vs control y se recurrió al análisis LefSe (análisis discriminante lineal [LDA] asociado al tamaño del efecto<sup>(51)</sup>), bajo la condición de  $\alpha = 0,05$ , con una puntuación LDA de al menos 2. Para el análisis biplot, se realizó un análisis multivariante con la herramienta ("FactoMineR") en R versión 3.3.0.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Evaluación de parámetros bioquímicos sanguíneos y hormonales entre grupos.**

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en diversos parámetros bioquímicos sanguíneos y hormonales entre los grupos de mala nutrición comparados con el control, tales como glucosa cuya concentración fue menor en el grupo de desnutrición (DES), comparado con (Control), pero mayor en el grupo de obesidad (OB) comparado con el grupo de desnutrición. Las concentraciones de triglicéridos fueron mayores en el grupo OB comparado con C y DES. Asimismo, el colesterol VLDL y ácido úrico fueron más elevados en grupo OB comparado con C. Correspondiente al valor de transaminasa ALT fue mayor en el grupo OB comparado con C y DES. En relación a los valores hormonales, insulina

fue mayor en el grupo OB respecto a DES y por último la leptina que es más abundante en el grupo DES y OB respecto al control (Tabla 2).

**Tabla 2- Determinaciones bioquímicas y hormonales estudiadas en población de escolares.**

	Grupo control	Grupo desnutrición	Grupo obesidad
n	12	12	12
Glucosa (mg/dL)	88.5(82.5-92.5)	79.0 <sup>a</sup> (76.5-85.0)	86.5 <sup>b</sup> (83.7-89.7)
Colesterol (mg/dL)	134.3(124.5-144.7)	121.8(109.5-131.0)	135.5(124.5-144.7)
Triglicéridos (mg/dL)	53.0 (46.0-70.0)	67 <sup>a</sup> (65.0-81.0)	91.0 <sup>a,b</sup> (64.0-112.5)
Colesterol HDL (mg/dL)	53.4±6.7	42.3±9.1	44.0±6.8
Colesterol LDL (mg/dL)	91.4±22.7	85.2±7.9	126.0±15.7
Colesterol VLDL (mg/dL)	12.0 (9.5-14.7)	13.0 (13.0-16.5)	17.0 <sup>a</sup> (13.7-20.7)
Nitrógeno uréico (mg/dL)	9.3±3.2	10.2±3.0	11.1±2.7
Urea (mg/dL)	20.0±6.7	21.8±6.5	24.0±5.8
Creatinina (mg/dL)	0.7±.06	0.8±.07	0.7±.05
Ácido úrico (mg/dL)	3.9(3.1-4.7)	4.9(4.1-5.2)	4.8 <sup>a</sup> (4.1-5.6)
Proteínas totales (g/dL)	7.3±.34	7.7±.34	7.8±.38
Albúmina (mg/dL)	3.9±0.07	4.0±.13	4.1±.09
Globulina (mg/dL)	3.4±.29	3.7±.29	3.6±.34
AST (U/L)	30.6±3.7	30.8±2.5	34.6±8.8
ALT (U/L)	17(11.7-19.5)	14(11.0-19.5)	25 <sup>a,b</sup> (16.0-38.2)
Insulina (μU/mL)	4.7(3.1-6.6)	4.4(2.2-5.9)	5.0 <sup>b</sup> (4.3-18.2)
Leptina (pg/mL)	106.2 (52.2-294.1)	212.7 <sup>a</sup> (144.4-326.0)	571.2 <sup>a,b</sup> (287.8.-850.5)
Adiponectina (ng/mL)	107.9±32.3	113.0±44.1	73.0±29.7
Prealbumina mg/mL	23.2±3.5	21.2±2.3	22.6±3.1
Transferrina mcg/dL	265.8±22.8	245.3±38.8	289.5±40.2
Hemoglobina (g/dL)	13.9±.65	14.4±1.4	14.8±.53
VCM (fL)	82.5±1.3	80.9±4.5	86.4±3.9

Datos presentados como media±de y mediana con percentiles (25-75) indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo control.

<sup>a</sup> Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo control (P\0.05)

<sup>b</sup> Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo desnutrición (P\0.05)

Prueba estadística: Kruskal–Wallis con prueba de Tukey

## 6.2 Evaluación de parámetros antropométricos entre grupos.

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en diversos parámetros antropométricos entre los grupos de mala nutrición y el control tales como; menor talla en el grupo DES respecto a los grupos C y OB. Además de valores inferiores de peso, circunferencia de cintura y percentil de cintura del grupo DES comparado con C.

Así también, se identificó valores mayores de peso, IMC, circunferencia de cintura, pliegue tricípital y subscapular y porcentaje de grasa corporal en el grupo OB comparado con los grupos C y DES (Tabla 3).

**Tabla 3. Determinaciones antropométricas estudiadas en la población de escolares.**

	<b>Grupo control</b>	<b>Grupo desnutrición</b>	<b>Grupo obesidad</b>
n	12	12	12
Edad (años)	10.2±0.4	10.0 ±1.2	9.6±0.8
Talla (cm)	140.1(134.3-147.7)	129.9 <sup>a</sup> (123.1-133.5)	132.5 <sup>b</sup> (127.6-139.3)
Peso (kg)	32.8(30.7-38.3)	28.1 <sup>a</sup> (23.8-32.9)	39.9 <sup>a,b</sup> (31.2-53.5)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	17.1±0.6	15.5±1.3	28.6 <sup>a,b</sup> ±3.1
Z-score IMC †	-0.02(-0.1,0.2)	-0.8 (-1.3,-0.3)	2.1 (2.2,2.3)
Z score-talla para edad †	-0.4(-0.82,-0.33)	-2.3 (-2.6,-2.0)	-0.3 (-1.1,-0.2)
Circunferencia cintura (cm)	60.7(58.0-64.5)	54.0 <sup>a</sup> (53.5-56.5)	72.5 <sup>a,b</sup> (67.0-82.0)
Percentil cintura	30.3(25-50)	14.2 <sup>a</sup> (10-25)	75 <sup>a,b</sup> (75-90)
Pliegue tricípital (cm)	12.0(58.0-64.5)	9.0 (53.5-56.5)	16.0 <sup>a,b</sup> (67.0-82.0)
Pliegue subescapular (cm)	11.5(8.2-15.7)	10.0 (6.0-14.0)	17.5 <sup>a,b</sup> (14.5-22.7)
Porcentaje de grasa (%)	12,7±3.0	10.9±3.7	24.1 <sup>a,b</sup> ±4.4

Datos presentados como media±de y mediana con percentiles (25-75) indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo control.

a Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo control (P\0.05)

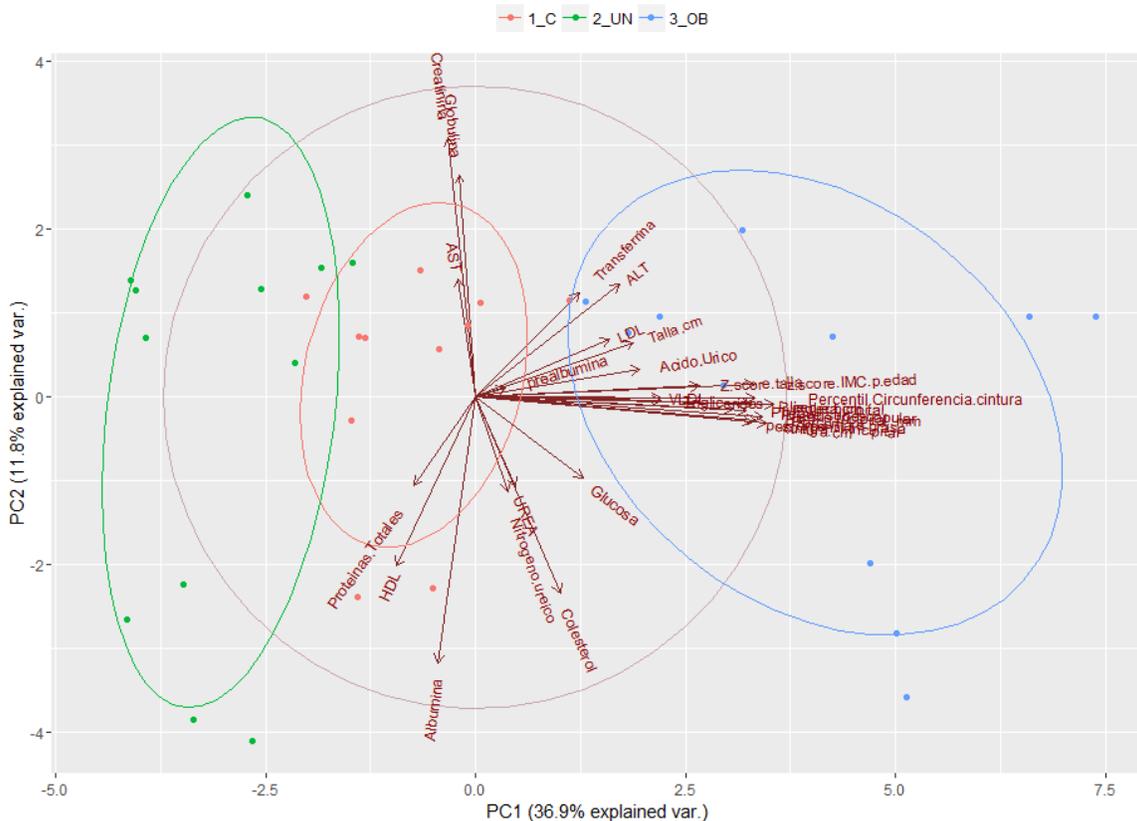
b Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo desnutrición (P\0.05)

† Corresponde al puntaje Z

Prueba estadística: Kruskal–Wallis con prueba de Tukey

### 6.3 Análisis de componentes principales con representación gráfica biplot de escolares seleccionados.

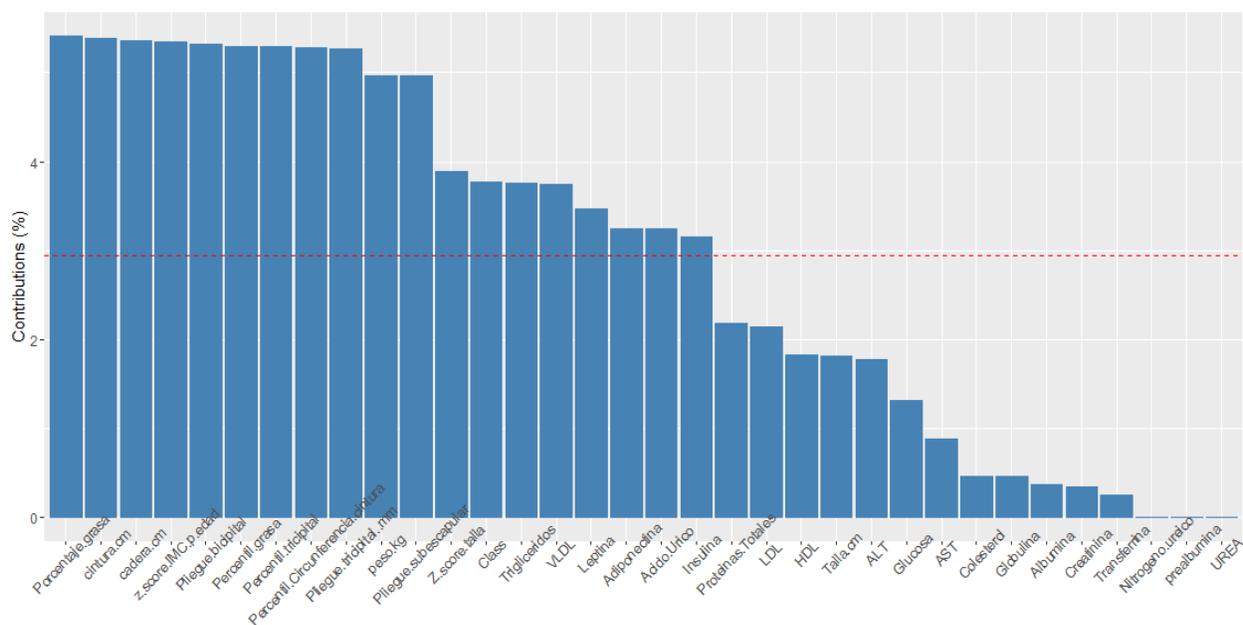
Se observó, una separación entre los 3 grupos estudiados (control, obesidad y desnutrición). Se formaron conglomerados de 12 puntos por cada grupo lo que indica claras diferencias entre los escolares. El componente 1, explica el (36.9%) de la diferencia de las varianzas y el componente 2, un (11.8%) de la diferencia de varianzas entre los grupos (Figura 7). Además la inspección mediante el gráfico biplot, demostró que la mayoría de las variables se concentran en el fenotipo obeso. Estas corresponden en su mayoría a medidas antropométricas mostradas en el gráfico de sedimentación (Figura 8). Es importante recalcar que estas variables que aportó este análisis, se realizó para llevar a cabo correlaciones posteriores con los miembros bacterianos denominados enterotipos.



**Figura 7. Análisis de componentes principales con biplot.** La escala mayor a 0.75 en color rojo representa una mayor jerarquía de las variables. Dim 1 y Dim 2 representan los factores de un análisis multivariante que explican la variación total de los datos. El porcentaje de variabilidad explicada por cada dimensión es de 53.2% para el primer eje y 15.1% para el segundo.

### 6.3.1 Gráfico de sedimentación de las variables analizadas en el PCA

La mayor contribución porcentual de la diferencia de varianzas estuvo dada en su mayoría por parámetros antropométricos, aunque también estuvieron incluidos otros parámetros bioquímicos y hormonales, siendo el porcentaje de grasa, cintura, cadera, puntaje Z de IMC para edad, pliegues tricípital y subscapular, percentiles de grasa y circunferencia de cintura, peso, triglicéridos, leptina, adiponectina y ácido úrico aquellas variables más importantes que establecen la diferencia entre los grupos de estudio visualizada en el análisis de componentes principales (Figura 8).



**Fig 8. Gráfico de sedimentación.** Las primeras 18 barras en azules representan los componentes o variables más importantes del PCA. El eje de las Y, representa el porcentaje que explica cada una de las variables en el análisis multivariado. Línea punteada (rojo), delimita los parámetros más sobresalientes y relega aquellas variables sin relevancia en el modelo.

## **6.4 Análisis de dieta.**

### **6.4.1 Análisis de macronutrientos.**

Se evaluó el consumo calórico y de macronutrientos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de energía, que fue mayor en el grupo OB, comparado contra el grupo DES. Aunque este último consumió mayor porcentaje de CHO comparado con C y OB (Tabla 4).

El porcentaje de grasa consumido en gramos fue mayor en el grupo OB y C comparado con el grupo DES. Otras diferencias estadísticas se muestran en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, cuyo consumo en gramos fue mayor en el grupo OB, respecto al grupo DES únicamente.

El consumo de proteínas fue mayor en gramaje en el grupo OB con 96.4gr comparado con 69.1 gr y 53.3 gr en los grupos C y DES respectivamente (Tabla 4).

### **6.4.2 Análisis de micronutrientos**

En el análisis de micronutrientos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de vitamina A cuyo consumo fue de 1543  $\mu\text{g}$  en el grupo OB, *versus* 367 y 398 de los grupos C y DES ordenadamente (Tabla 5).

También el consumo de sodio fue mayor en el grupo OB con 2211 mg comparado con 1839 en el grupo C y 1138 mg por parte del grupo DES (Tabla 5).

**Tabla 4. Evaluación de la energía y macronutrientes de los escolares de Chimalhuacán seleccionados para el estudio de microbiota intestinal**

	Grupo control	Grupo desnutrición	Grupo obesidad
Energía (Kcal)	1812(1353.7-2386.5)	1398(922.0-1613.0)	2566 <sup>b</sup> (1644.5-2939.5)
Carbohidratos (gr)	231.6±96.9	209.0 ±57.0	280.3 ±107.3
Carbohidratos (% de energía)	48.5±10.3	61.1 <sup>a</sup> ±5.4	47.7 <sup>b</sup> ±10.6
Proteína (gr)	69.1±25.3	53.3±18.5	96.5 <sup>b</sup> ±41.6
Proteína (% de energía)	15.1±3.8	17.2±3.7	16.6±4.1
Total de grasa (gr)	72.0.1±21.4	33.0 <sup>a</sup> ±15.3	94.2 <sup>b</sup> ±40.6
Grasa (% de energía)	36.1±8.1	21.4 <sup>a</sup> ±3.3	35.8 <sup>b</sup> ±6.8
Ac. grasos saturados (gr)	19.8±4.9	12.7±6.1	25.6 <sup>b</sup> ±10.8
Ac. grasos saturados (% de energía)	11.0±5.4	8.4±2.7	10.2±2.8
Ac. grasos monoinsaturados (gr)	18.0±8.7	9.5±7.8	31.0 <sup>b</sup> ±20.7
Ac. grasos monoinsaturado (% de energía)	9.5±4.0	6.4±3.9	11.5±5.1
Ac. grasos poliinsaturados (gr)	6.2±3.4	4.0±2.3	13.6 <sup>b</sup> ±11.1
Ac. grasos poliinsaturados (% de energía)	3.5±2.2	2.7±1.6	5.0±3.0
Total de azúcar (gr)	35.7(9.5-57.2)	46.1(15.2-49.6)	42.5(22.9-76.3)
Total de Fibra (gr)	9.1(6.8-13.5)	9.1(6.0-31.0)	27.2(10.5-31.9)
Líquidos (mL)	1425.5(988.0-1862.9)	1077.2(780.8-1373.7)	1149.2(923.6-1374.8)

Datos presentados como media±de y mediana con percentiles (25-75). <sup>a</sup> Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo control (P<0.05); <sup>b</sup> Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo desnutrición (P<0.05).

Prueba estadística: Kruskal–Wallis con prueba de Tukey para variables y Bonferroni para comparaciones de proporciones.

**Tabla 5. Evaluación de micronutrientes de los escolares de Chimalhuacán seleccionados para el estudio de microbiota intestinal**

	Grupo control	Grupo desnutrición	Grupo obesidad
<b>Vitaminas</b>			
Vitamina A (µg)	367(257-407.7)	398(311-503)	1543 <sup>a,b</sup> (678-1872.2)
Tiamina (mg)	0.9±0.4	1.0±0.5	1.4±0.6
Rivoflavina (mg)	1.2±0.3	1.0±0.6	1.6±0.5
Niacina (mg)	10.3(8.5-12.7)	9.7(7.6-11.1)	14.6(7.5-17.6)
Vitamina B-6 (mg)	0.6±0.4	0.8±0.3	1.1±0.6
Ácido fólico (µg)	130(57.2-164.4)	85(30.6-145.5)	150(45.8-292.2)
Vitamina B-12 (µg)	2.0±0.6	2.3±1.1	2.1±0.7
Vitamina B5 (mg)	2.4±0.9	2.4±2.1	2.5±0.6
Vitamina C (mg)	19.6(4.4-58.2)	30.2(11.0-75.4)	52.8(16.0-98.3)
<b>Minerales</b>			
Calcio (mg)	852.5±348.1	725.4±351.7	914.1±390.4
Hierro (mg)	10.0±5.0	10.4±4.8	14.8±7.1
Magnesio (mg)	197.5(160.7-418.0)	227(121.0-648.0)	277(178.7-587.7)
Fosforo (mg)	745(537.7-899.5)	799(131.0-1604.0)	924(578.2-946.7)
Sodio (mg)	1839±781.5	1138.4±514.1	2211.2 <sup>b</sup> ±970.5
Zinc (mg)	4.4±1.8	5.7±3.2	6.0±2.7

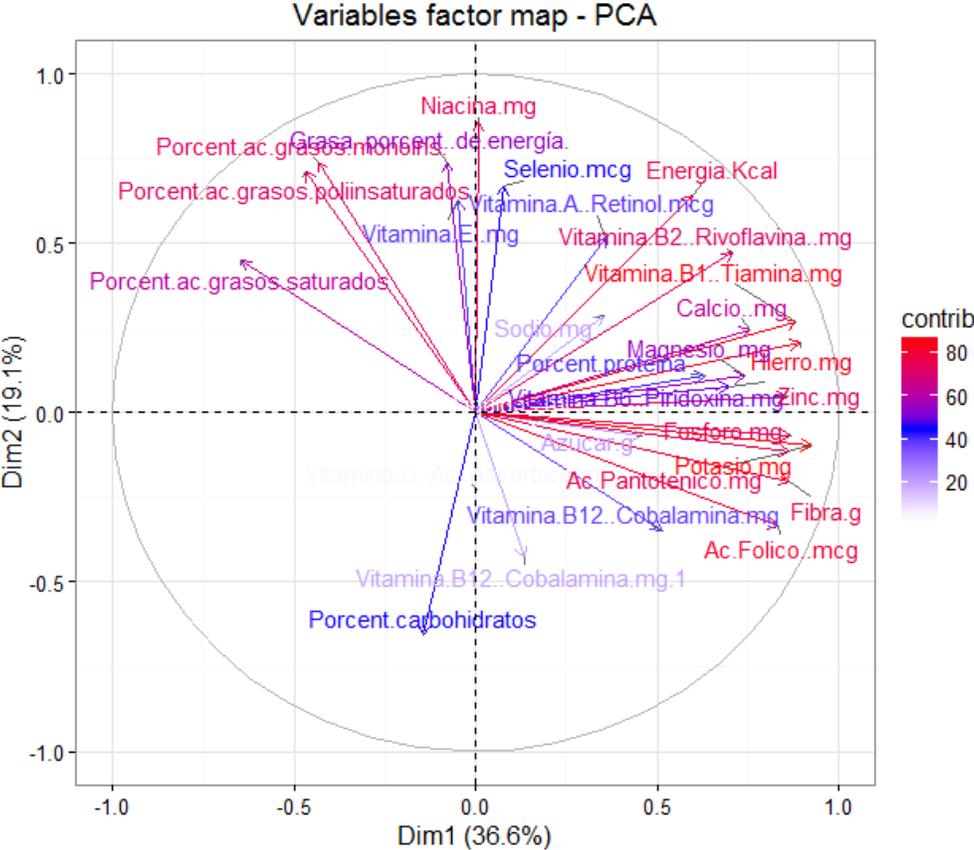
Datos presentados como media±de y mediana con percentiles (25-75). <sup>a</sup> Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo control (P<0.05); <sup>b</sup> Indica diferencias estadísticamente significativas vs grupo desnutrición (P<0.05)

#### 6.4.3. Gráfico biplot de los macronutrientes y micronutrientes.

En el análisis biplot bidimensional (Dim1 y Dim2), las variables de macro y micronutrientes que permitieron explicar más del 58% del porcentaje de la varianza total del conjunto de datos, para su posterior correlación con enterotipos bacterianos fueron: (%) de CHO, (%) de ácidos grasos saturados, (%) de ácidos

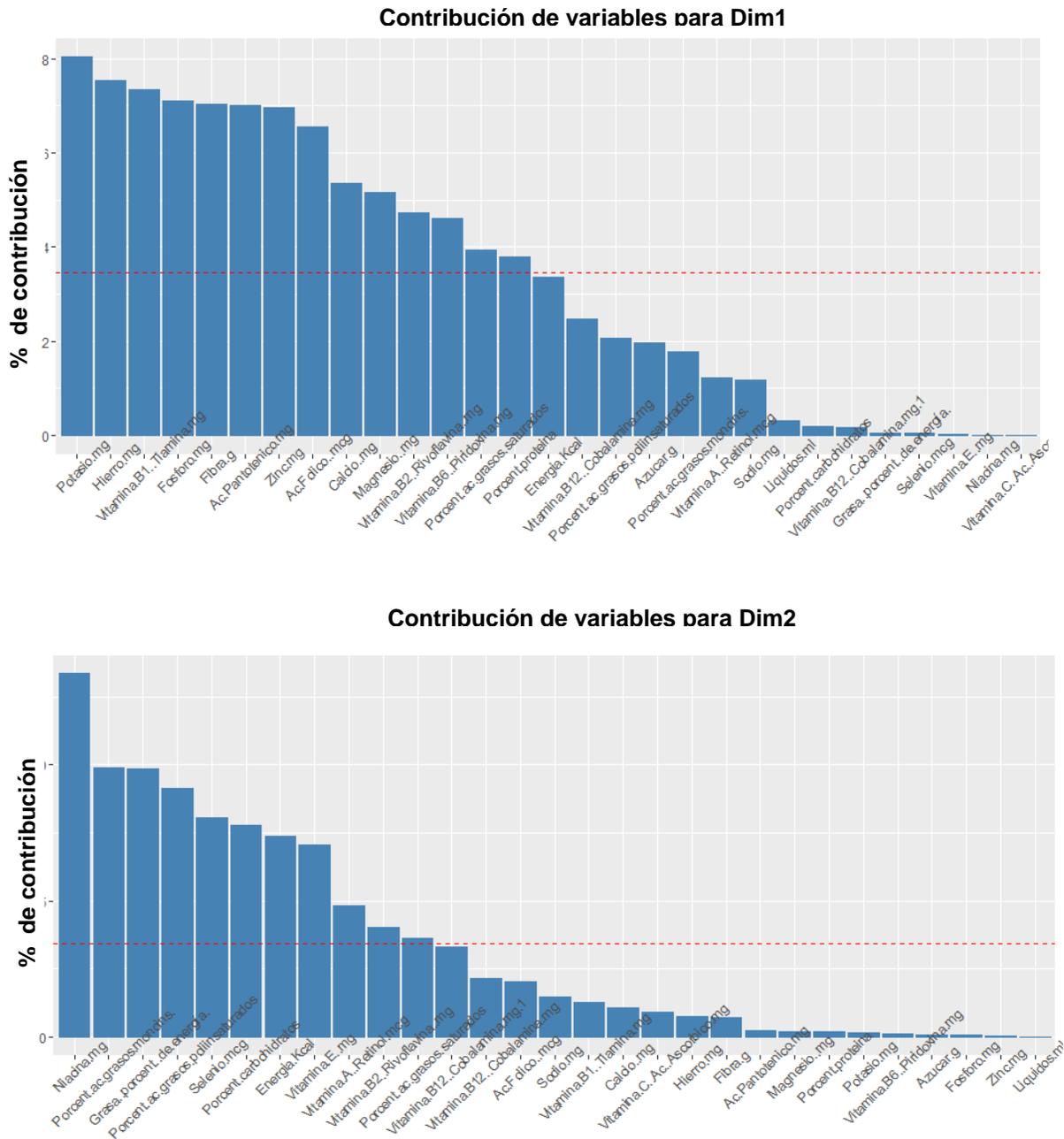
grasos monoinsaturados, (%) ácidos grasos poliinsaturados, kilocalorías, vitamina B1, hierro, potasio, ácido fólico, fibra, selenio y ácido pantoténico. Estas variables se pueden apreciar detalladamente en el gráfico de sedimentación de la (Figura 10).

Los perfiles de respuesta de la mayoría de los micronutrientes son diferentes a las grasas, CHO y energía. Los primeros se agruparon mediante vectores en los cuadrantes inferior y superior derecho. En tanto que los parámetros de grasa se agruparon en el cuadrante superior izquierdo y CHO en el cuadrante inferior izquierdo (Figura 9).



**Fig 9.** Biplot de contribución. La escala mayor a 80 en color rojo representa un mayor porcentaje que explica la variación total de los datos en el análisis multivariante. El porcentaje de variabilidad explicada por cada dimensión es de 36.6 % para la primera dimensión y 19.1 % para la segunda dimensión.

## 6.4.4 Gráfico de sedimentación de las variables analizadas en el biplot



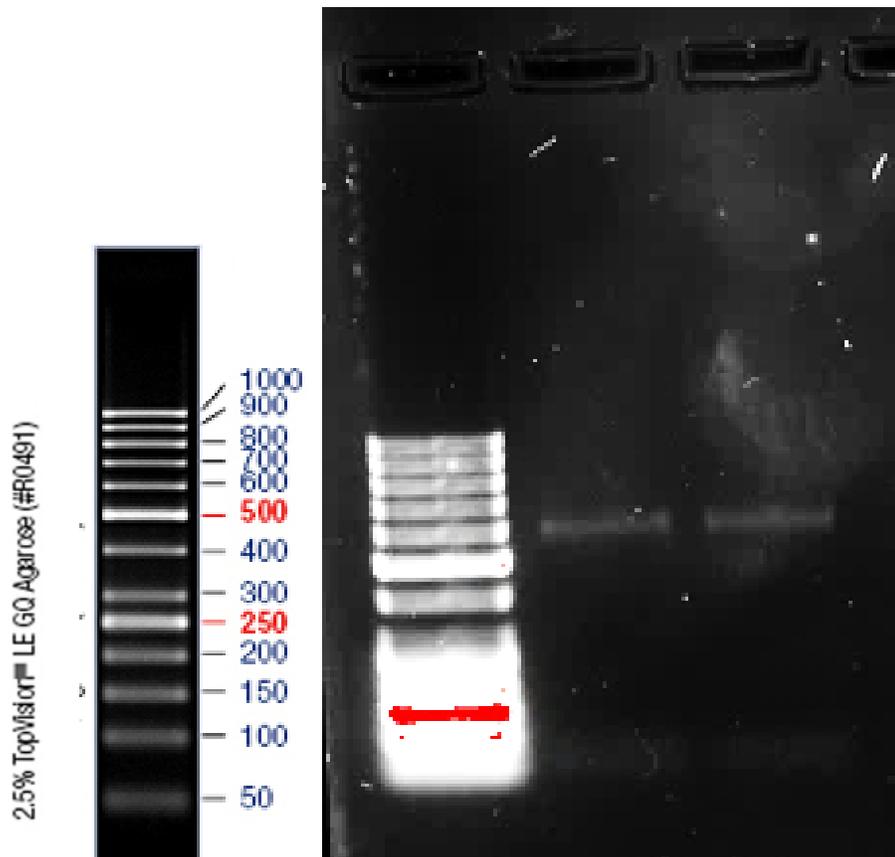
**Fig 10.** Gráfico de sedimentación. Las primeras barras en azules, hasta donde el descenso se estabiliza (línea roja), representan las de mayor jerarquía en el análisis multivariante (Biplot). El eje de las Y, representa el porcentaje que explica cada una de las variables.

## 6.5 Amplificación de los productos por PCR

En la (Figura 11), se observan los productos de PCR que resultaron de la amplificación de las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S, que posee 450 pares de bases, no obstante con los adaptadores universales de Illumina y los códigos de barras, el producto obtenido fue de 600 pares de bases que era lo esperado.

### GeneRuler™ 50bp DNA Ladder

O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder,  
ready-to-use

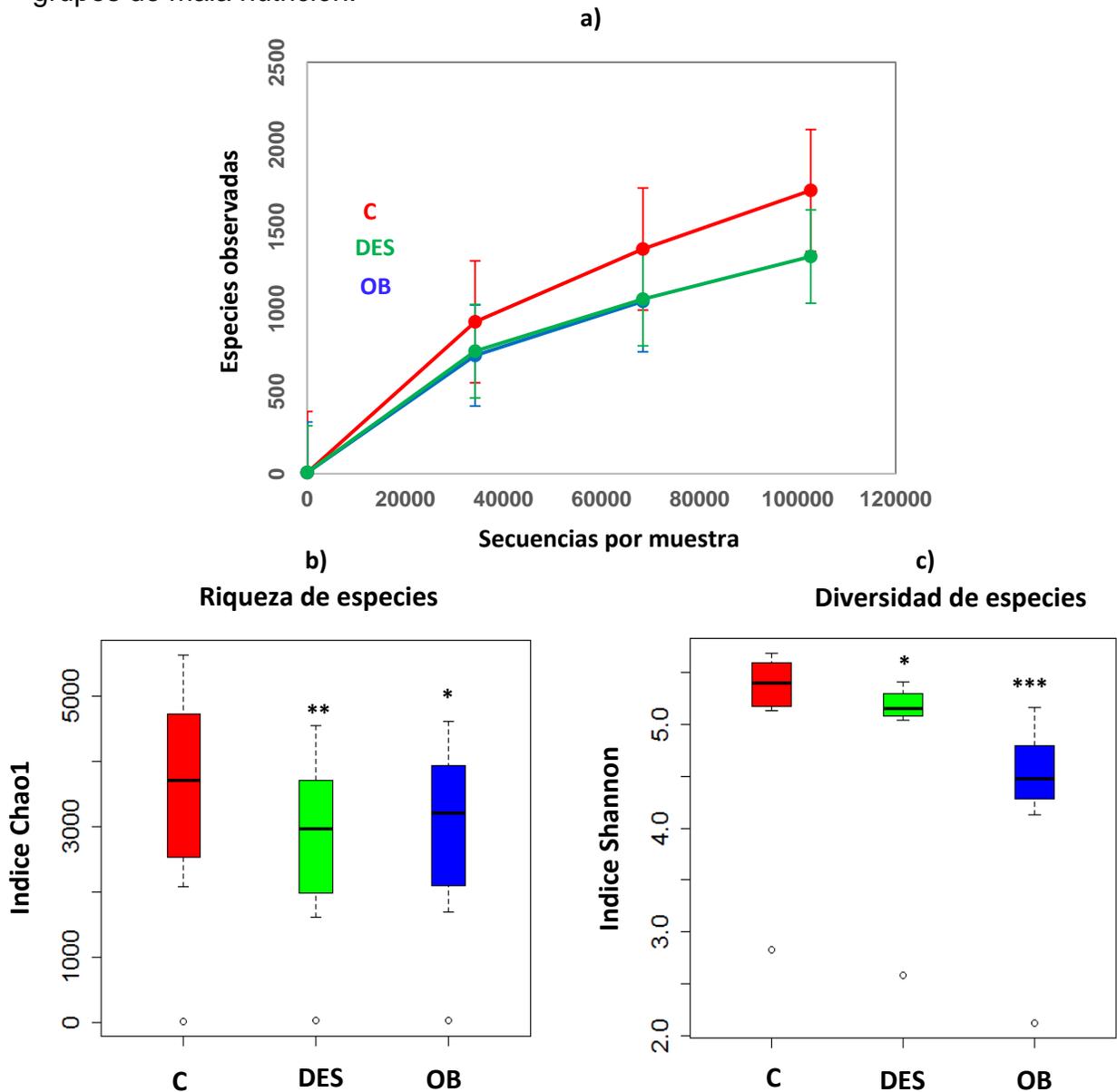


**Fig 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos obtenidos por PCR. Teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador con luz UV. (M)=marcador de peso molecular.

## 6.6. ESTUDIO DE MICROBIOTA INTESTINAL

### 6.6.1 Diversidad alfa

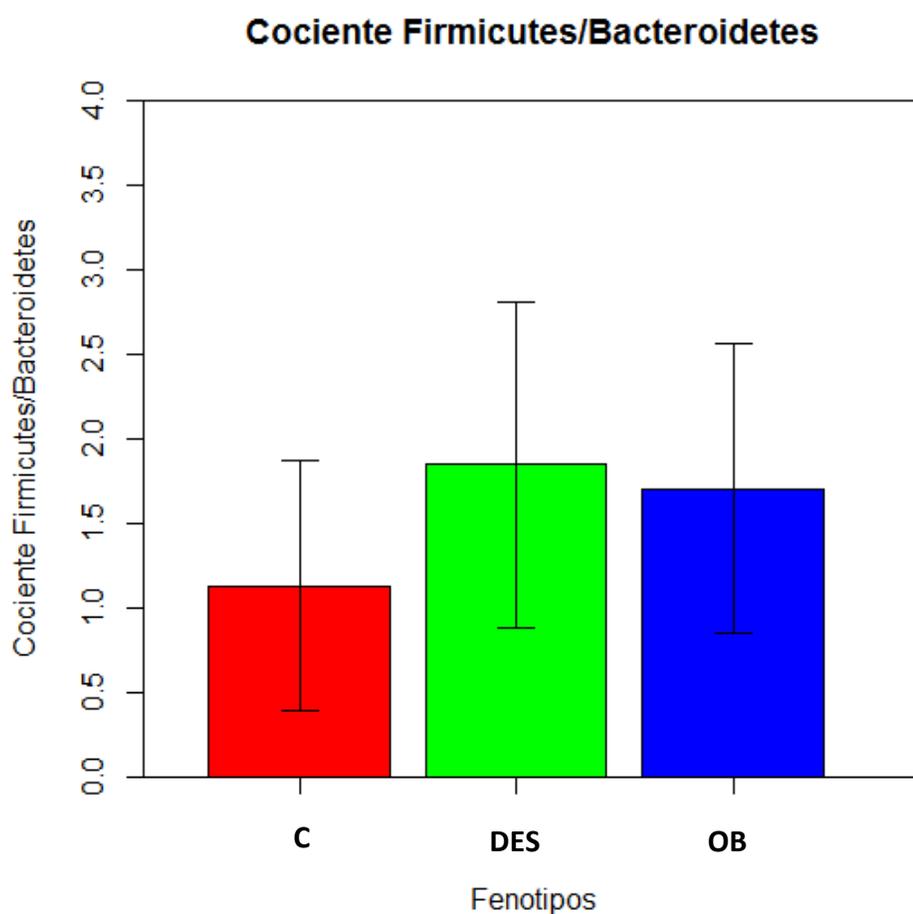
Se detectó un promedio de 1004 especies bacterianas en el grupo C, 783 en el grupo DES y 591 en el grupo OB (Figura 12a). La alfa diversidad indicó que el grupo control mostró mayor riqueza (Figura 12b), y diversidad (Figura 12c), respecto a los grupos de mala nutrición.



**Fig. 12** (a) Curvas de alfa rarefaction representa el número de especies observadas en los tres grupos de estudio. El eje Y indica el promedio del número de OTUS en cada grupo. Las barras denotan la desviación estándar. b) Caja de bigotes para comparación de Riqueza (Índice Chao1) entre los tres grupos de estudio c) Diversidad de especies (índice Shannon). \* denota  $P < 0.05$  vs control; \*\* denota  $P < 0.01$  vs control. \*\*\* denota  $P < 0.001$  vs control. Prueba estadística: ANOVA una vía con Tukey

### 6.6.2. Análisis del cociente Firmicutes/Bacteroidetes

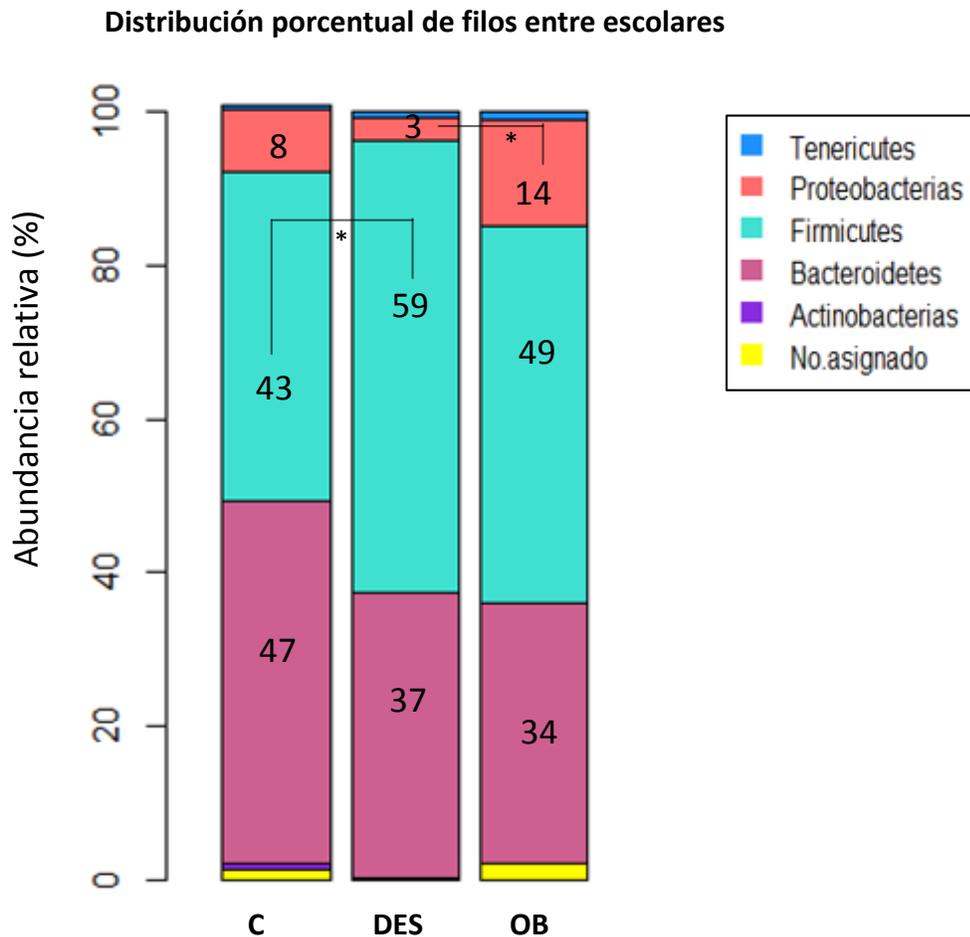
No existió diferencia estadísticamente significativa en el cociente Firmicutes/bacteroidetes entre los grupos de estudio, sin embargo el grupo de desnutrición alcanzó una mayor relación en este parámetro con  $1.8 \pm 0.9$ , seguido del grupo de obesidad  $1.7 \pm 0.8$  y por último el grupo control que presentó un menor cociente  $1.1 \pm 0.7$  (Figura 13).



**Fig 13.** Cociente Firmicutes /Bacteroidetes entre grupos C, DES y OB. Se muestra la media por cada grupo. Las barras representan el error estándar. Prueba estadística: ANOVA una vía con Tukey.

### 6.6.3 Descripción de la microbiota intestinal a nivel de (filo)

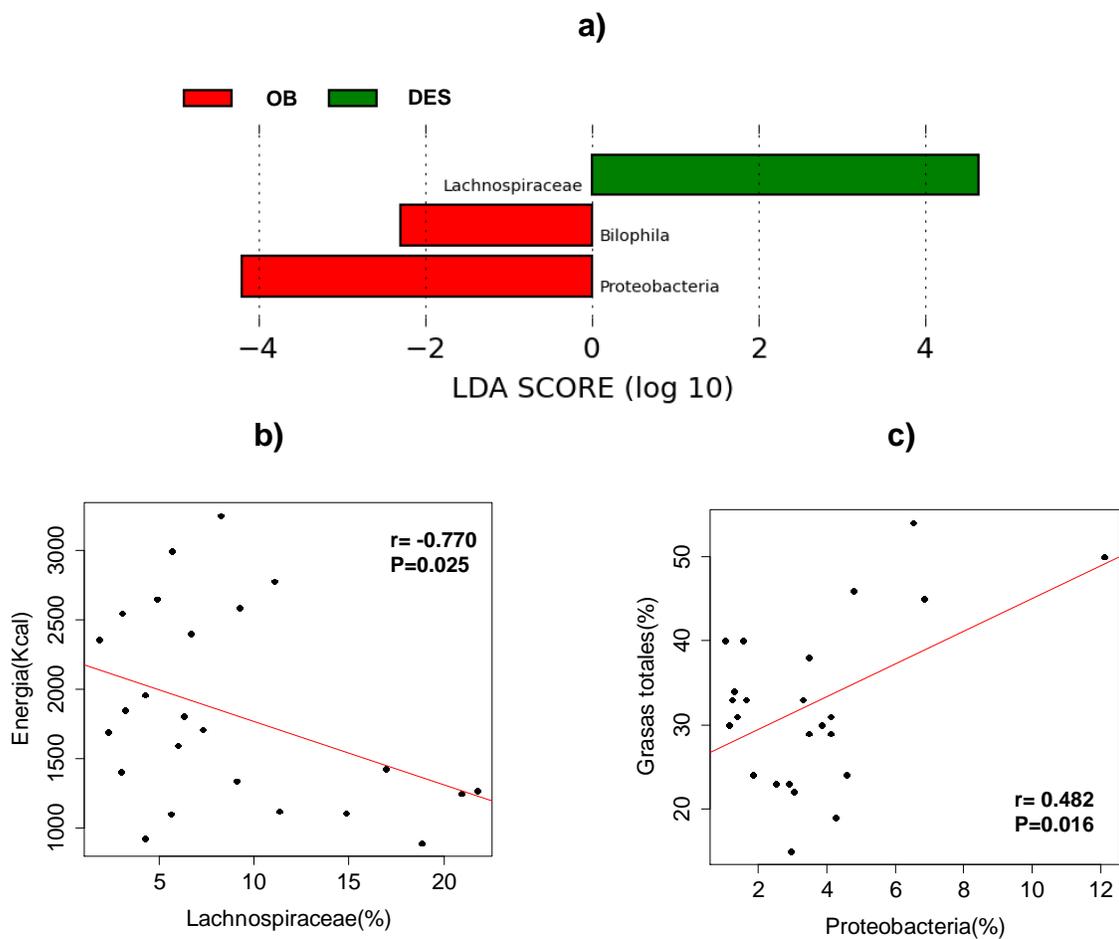
A nivel de filo se presentó mayor predominio de Firmicutes en el grupo DES (59%), respecto con 43% del C ( $p=0.028$ ). Por otra parte el porcentaje de Bacteroidetes fue mayor en el grupo control (47%) comparado con niños del grupo de desnutrición y obesidad (37% y 34% respectivamente). Respecto al filo de Proteobacterias; el grupo de obesidad presentó mayor distribución con (14%) que el grupo de desnutrición (3%) ( $p=0.002$ ). La única diferencia estadísticamente significativa que se encontró fue por una mayor abundancia relativa de Firmicutes en el grupo de desnutrición comparado con el grupo control (Figura 14).



**Fig 14.** Distribución porcentual de filios bacterianos de microbiota intestinal de escolares de Chimalhuacán. C vs DES \* $P=0.028$  para Firmicutes. DES vs OB \* $P=0.002$  para Proteobacterias. Prueba estadística: ANOVA una vía con Tukey

#### 6.6.4 Análisis discriminante lineal de poblaciones bacterianas entre fenotipos

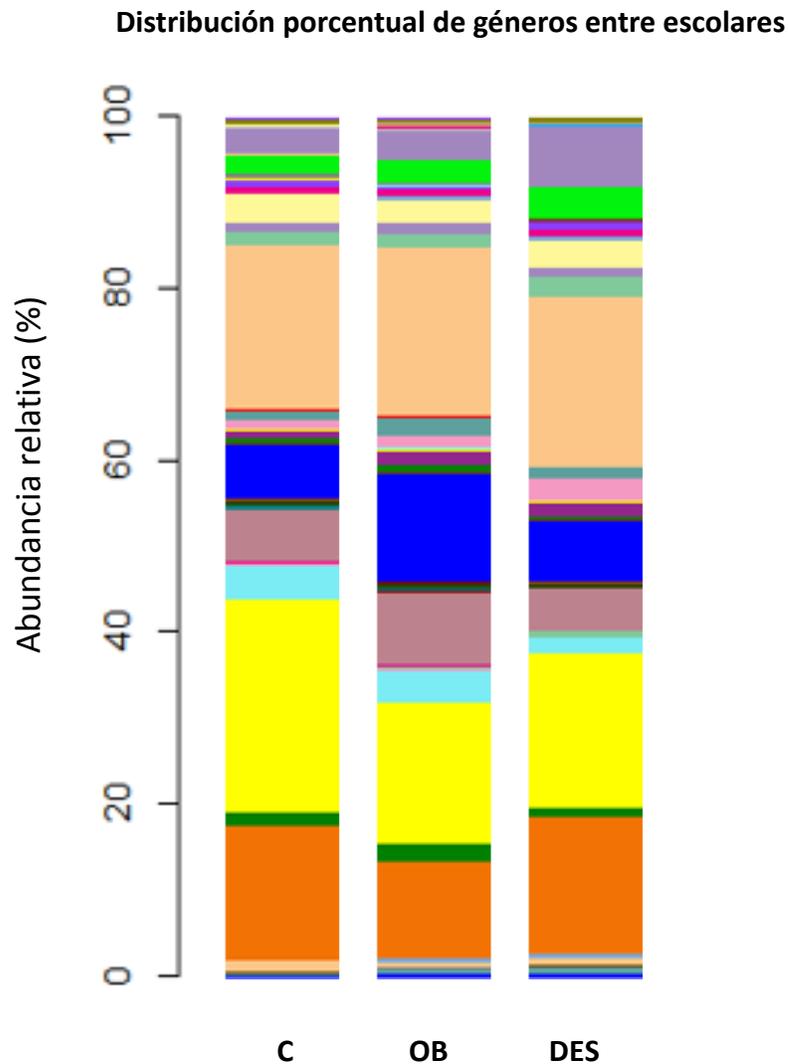
En el presente estudio, observamos que el grupo de obesidad tuvo mayor abundancia de Proteobacterias que correlaciona positivamente con el consumo total de grasas ( $r=0.482$ ,  $P=0.016$ ) (Figura 15 a y c). Para el caso del grupo de desnutrición observamos que presentan mayor abundancia de Lachnospiraceae que correlaciona negativamente con el consumo de energía ( $r= -0.77$ ,  $P=0.02$ ) (Figura 15 a y b).



**Fig 15.** Representación diferencial de linajes bacterianos por LefSe entre grupos desnutrición (verde) y obesidad (rojo) con valores superiores a 2 en el análisis discriminante. La correlación de la abundancia de Lachnospiraceae consumo de energía en el inciso b. La correlación de la abundancia de Proteobacteria con el consumo total de grasas en el inciso c. Correlación de Spearman

### 6.6.5 Descripción de la microbiota intestinal a nivel de género

Los resultados mostraron mayor abundancia del género bacteriano *Prevotella* en el grupo control (41 %), respecto a 29 % del grupo con obesidad central y 17 % del grupo con desnutrición. Por otra parte el género bacteriano *Bacteroides* fue mayor en el grupo de obesidad (16 %) comparado con niños normopeso y desnutrición crónica (15.6 % y 11 % respectivamente). Por otro lado, se observó mayor frecuencia del género *Succinivibrio* del grupo de obesidad con 6.9 % comparado con 3.1% y 3.5% del grupo control y desnutrición respectivamente (Figura 16).



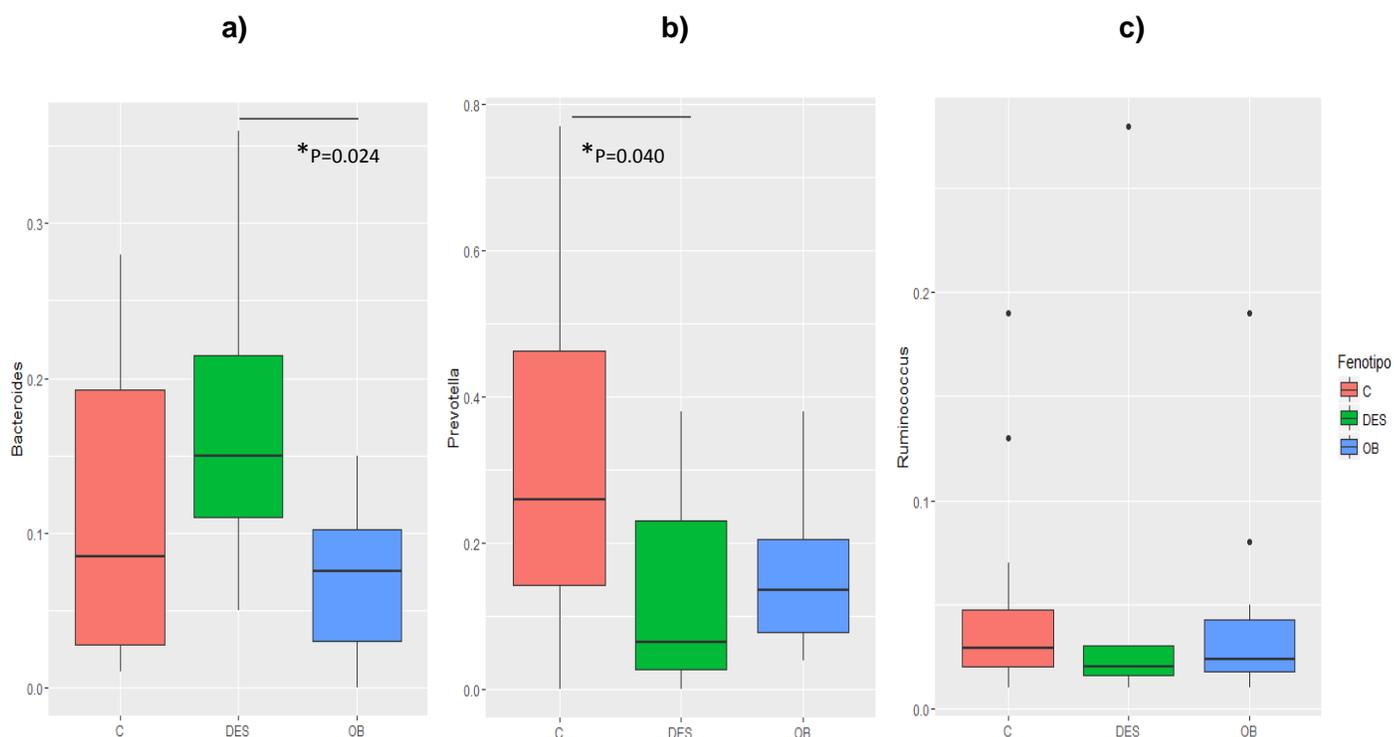
**Fig 16.** Distribución de géneros bacterianos de microbiota intestinal de escolares de Chimalhuacán.

	<b>C</b>	<b>OB</b>	<b>DES</b>
Bacteroidetes  Butyricimonas	0.2%	0.1%	0.1%
Bacteroidetes  Odoribacter	0.1%	0.1%	0.1%
Bacteroidetes  Paraprevotella	0.1%	0.5%	0.4%
Bacteroidetes  Bacteroides	14.6%	10.9%	16.3%
Bacteroidetes  Parabacteroides	1.6%	1.1%	2.2%
Bacteroidetes  Prevotella	24.7%	17.0%	12.2%
Firmicutes  Lactobacillus	0.2%	0.0%	0.0%
Firmicutes  Clostridia	6.0%	4.9%	8.4%
Firmicutes  Clostridium	0.1%	0.1%	0.1%
Firmicutes  Lachnospiraceae	6.3%	7.0%	12.6%
Firmicutes  Anaerostipes	0.1%	0.1%	0.1%
Firmicutes  Blautia	0.4%	0.4%	0.6%
Firmicutes  Coprococcus	1.0%	1.5%	1.6%
Firmicutes  Dorea	0.2%	0.3%	0.3%
Firmicutes  Lachnobacterium	0.0%	0.0%	0.2%
Firmicutes  Lachnospira	0.9%	2.5%	1.4%
Firmicutes  Roseburia	1.2%	1.3%	2.1%
Firmicutes  Faecalibacterium	1.5%	2.3%	1.4%
Firmicutes  Oscillospira	1.2%	1.2%	1.4%
Firmicutes  Ruminococcus	3.3%	3.2%	2.5%
Firmicutes  Dialister	0.7%	0.8%	0.6%
Firmicutes  Mitsuokella	0.1%	0.1%	0.0%
Firmicutes  Erysipelotrichaceae	0.1%	0.1%	0.1%
Firmicutes  Eubacterium	0.1%	0.1%	0.1%
Proteobacteria  Sutterella	2.1%	3.6%	2.5%
Proteobacteria  Desulfovibrio	0.1%	0.1%	0.1%
Proteobacteria  Succinivibrio	3.1%	6.9%	3.5%
Proteobacteria  Enterobacteriaceae	0.2%	0.0%	0.1%
Proteobacteria  Klebsiella	0.0%	0.1%	0.2%
Proteobacteria  Haemophilus	0.1%	0.2%	0.2%

**Fig 16.** Distribución de géneros bacterianos de microbiota intestinal de escolares de Chimalhuacán.

### 6.6.6 Comparación de enterotipos entre grupos

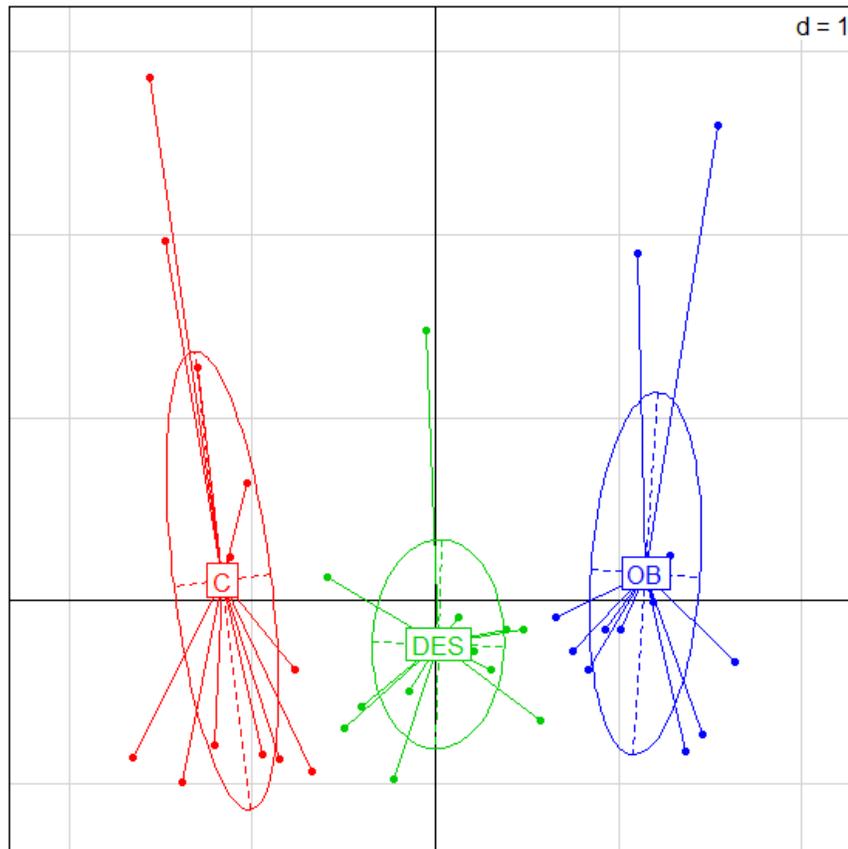
Se realizó un análisis comparativo de enterotipos y se encontró que el enterotipo 1 (Bacteroides) tuvo mayor cantidad en el grupo DES, comparado con OB ( $P=0.024$ ). Además el enterotipo 2 (Prevotella) presentó mayor abundancia relativa en el grupo C, respecto de los grupos DES y OB ( $P=0.040$ ) (Figura 17).



**Fig 17.** Comparación de las frecuencia relativa de secuencias de enterotipo 1(Bacteroides), enterotipo 2 (Prevotella) y enterotipo 3 (Ruminococcus) entre los grupos de estudio. Los resultados comparativos de las frecuencias relativas de enterotipos se visualizaron como diagramas de caja y bigotes que muestran: la mediana y el rango intercuartil (las cajas contienen 50 % de todos los valores). Los bigotes (que representan los percentiles 25 y 75) y los puntos de datos extremos. \* Denota diferencia estadísticamente significativa en  $p < 0,05$ . Prueba estadística: ANOVA una vía con Tukey

### 6.6.7 Análisis de coordenadas principales de microbiota intestinal a nivel de género

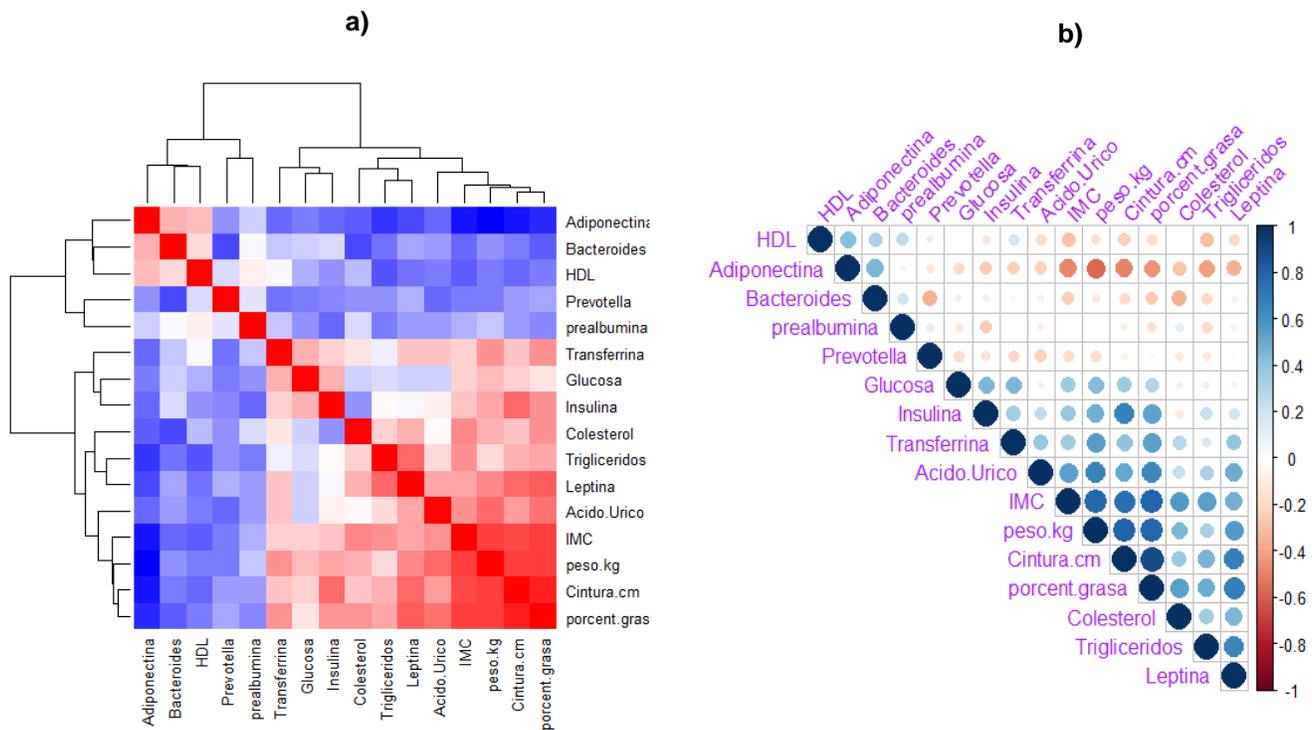
El análisis de coordenadas principales mostró la diferencia de distancias del perfil de abundancia relativa de todos los géneros bacterianos.



**Fig 18.** Análisis de coordenadas principales. Los círculos muestran el agrupamiento de los fenotipos estudiados en función de los géneros bacterianos. Cada punto representa una muestra secuenciada agrupada en su respectivo grupo de estudio. C= Control, DES= Desnutrición, OB=Obesidad.

### 6.6.8 Correlación entre enterotipos y parámetros bioquímicos sanguíneos y hormonales.

Mediante un mapa de calor y una gráfica de correlación de Spearman, se correlacionan los enterotipos, con las variables de mayor importancia obtenidas del análisis multivariante de los parámetros bioquímicos, hormonales y antropométricos que se presentaron en las (Figura 8 y 10), respectivamente. No se observaron correlaciones estadísticamente significativas en este análisis (Figura 20).



**Fig 19.** Correlación de enterotipos con parámetros sanguíneos y hormonas. (a)= control - (b)=desnutrición -(c)=obesidad. A) Se presenta un mapa de calor, correlaciones positivas en rojo, correlaciones de variables negativas en azul. B) Se presenta un corrplot con correlaciones de spearman, en rojo se presentan las correlaciones positivas y las correlaciones de variables negativas en azul.

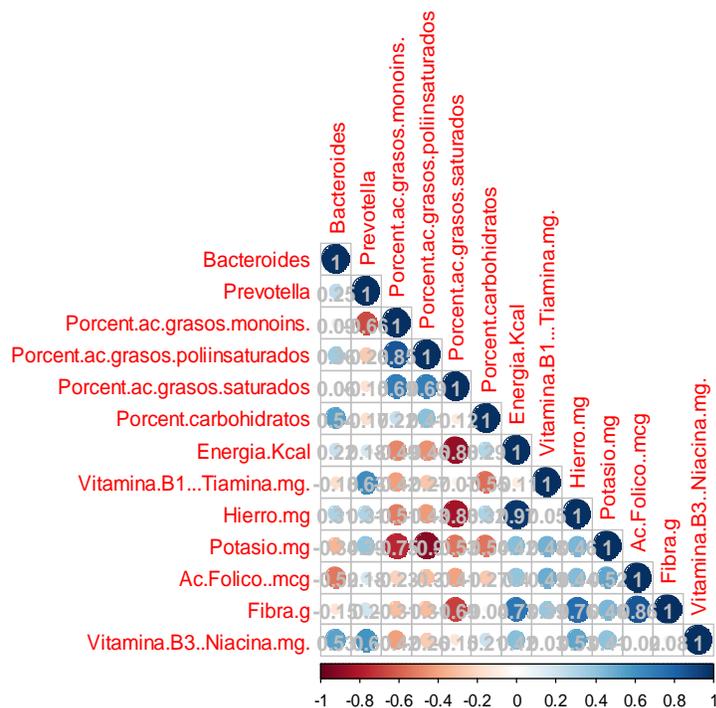
### 6.6.9 Correlaciones entre enterotipos y macronutrientos

En el grupo control, se observaron correlaciones positivas entre Bacteroides con (%) de ac. grasos poliinsaturados=0.36 % carbohidratos = 0.54 (Figura 20a).

En el grupo DES se observaron correlaciones positivas entre Bacteroides con (%) de ac. grasos monoinsaturados =0.69, (%) de ac. grasos saturados=0.72, (%) carbohidratos = 0.8 (Figura 20b).

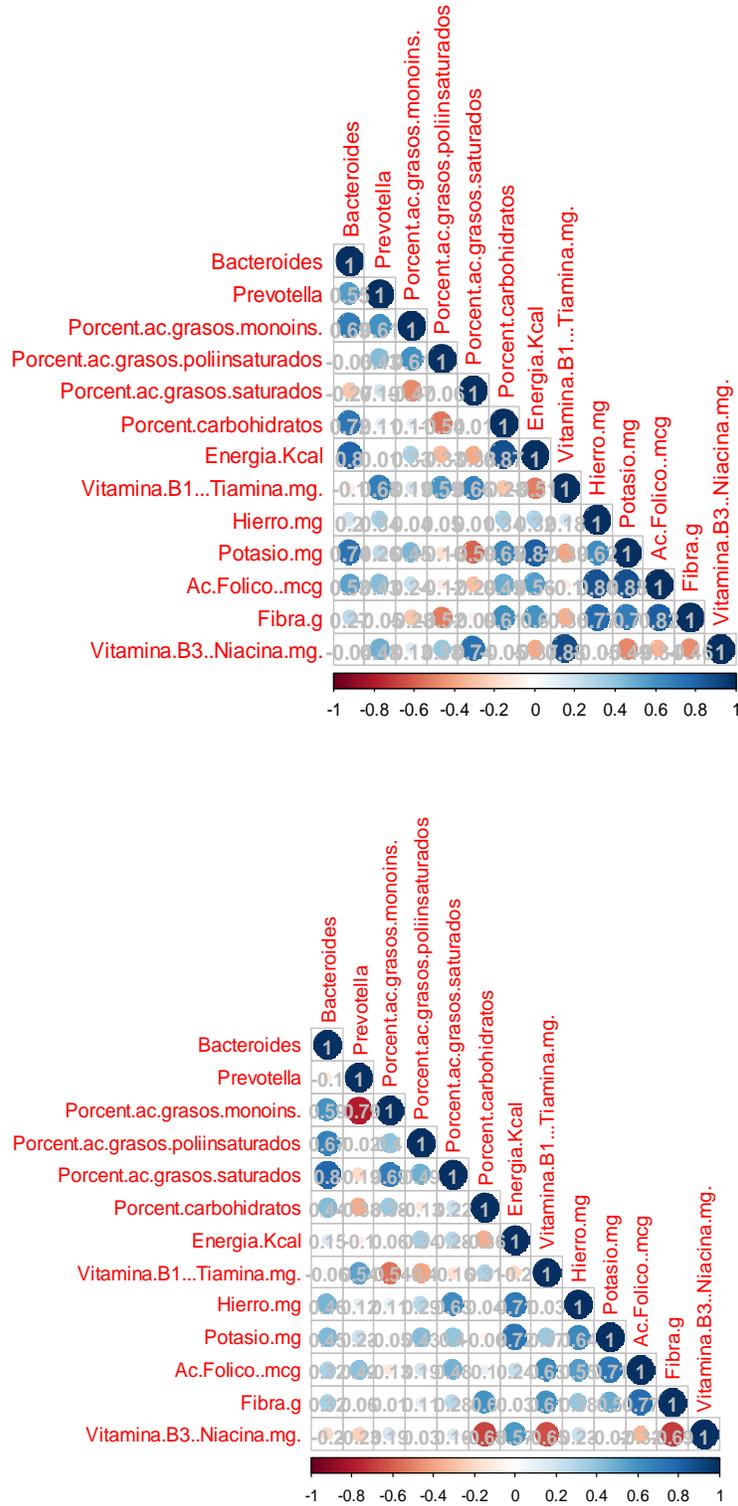
En el grupo de OB se observaron correlaciones positivas entre Bacteroides con (%) ac. grasos monoinsaturados= 0.59 (%) de ac. grasos poliinsaturados=0.67 (%) ac. grasos saturados=0.8 (Figura 20c).

Para el enterotipo 2, se encontró una correlación positiva de la vitamina B1 con el grupo C =0.63, DES =0.68 y OB=0.53 (Figura 20 a,b,c).



**Fig 20.** Correlaciones de enterotipos con parámetros de macro y micronutrientos. (a)= control - (b)=desnutrición - (c)=obesidad. Se presenta un mapa corrplot, correlaciones positivas en rojo, correlaciones de variables negativas en azul.

b)

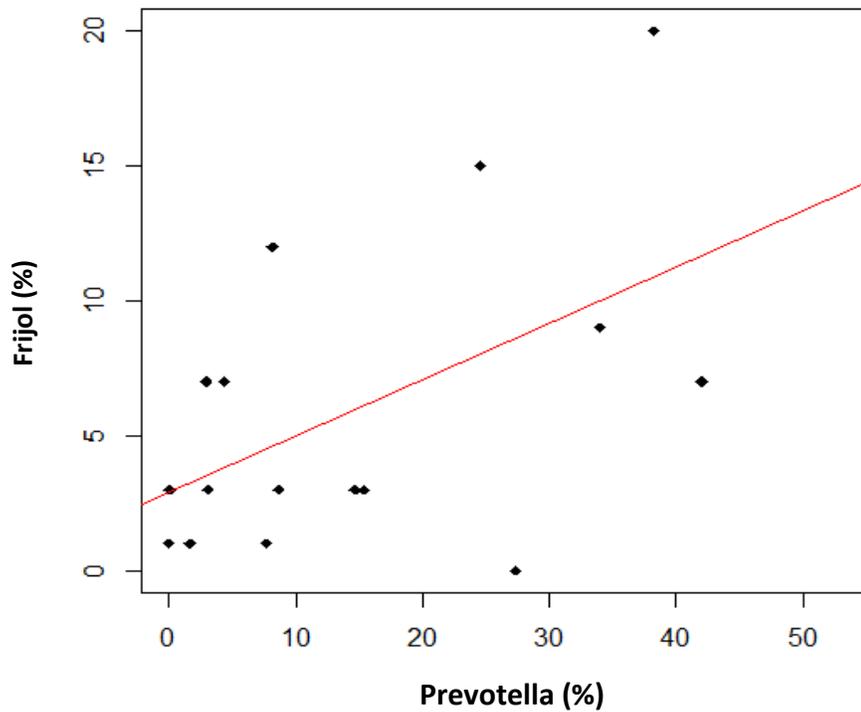


**Fig 20.** Correlaciones de enterotipos con parámetros de macro y micronutrientes. (a)= control - (b)=desnutrición - (c)=obesidad. Se presenta un mapa corplot, correlaciones positivas en rojo, correlaciones de variables negativas en azul.

### 6.6.9.1 Correlación de familias bacterianas con la dieta

Se evaluó la relación del enterotipo 2 (prevotella) con la cantidad de frijol consumido y se encontró una correlación positiva entre ambas variables ( $r=0.53$ ,  $P=0.03$ ).

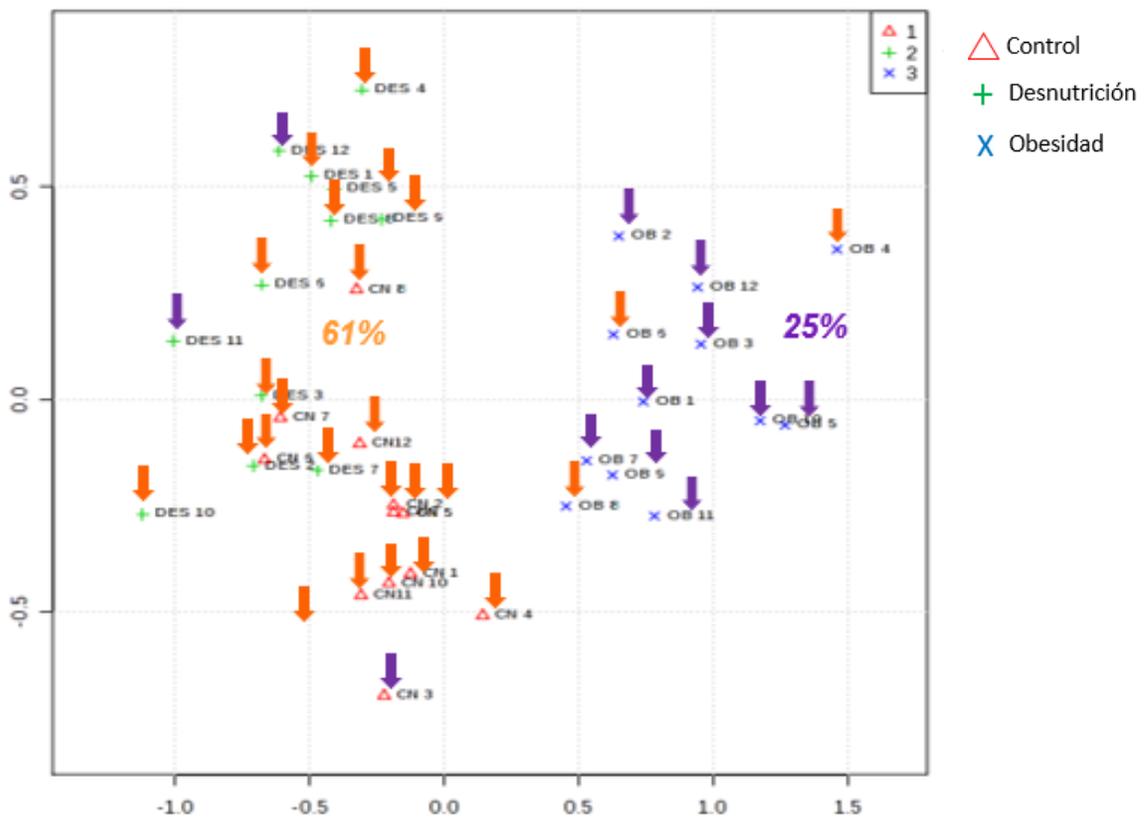
a)



**Fig 21.** Correlación entre consumo de frijol y prevotella. Correlación de Spearman: (a) cambios en % de Prevotella y consumo de frijol;  $r=0.53$ ,  $P=0.03$ .

## 6.7 Tipo de nacimiento respecto la microbiota intestinal

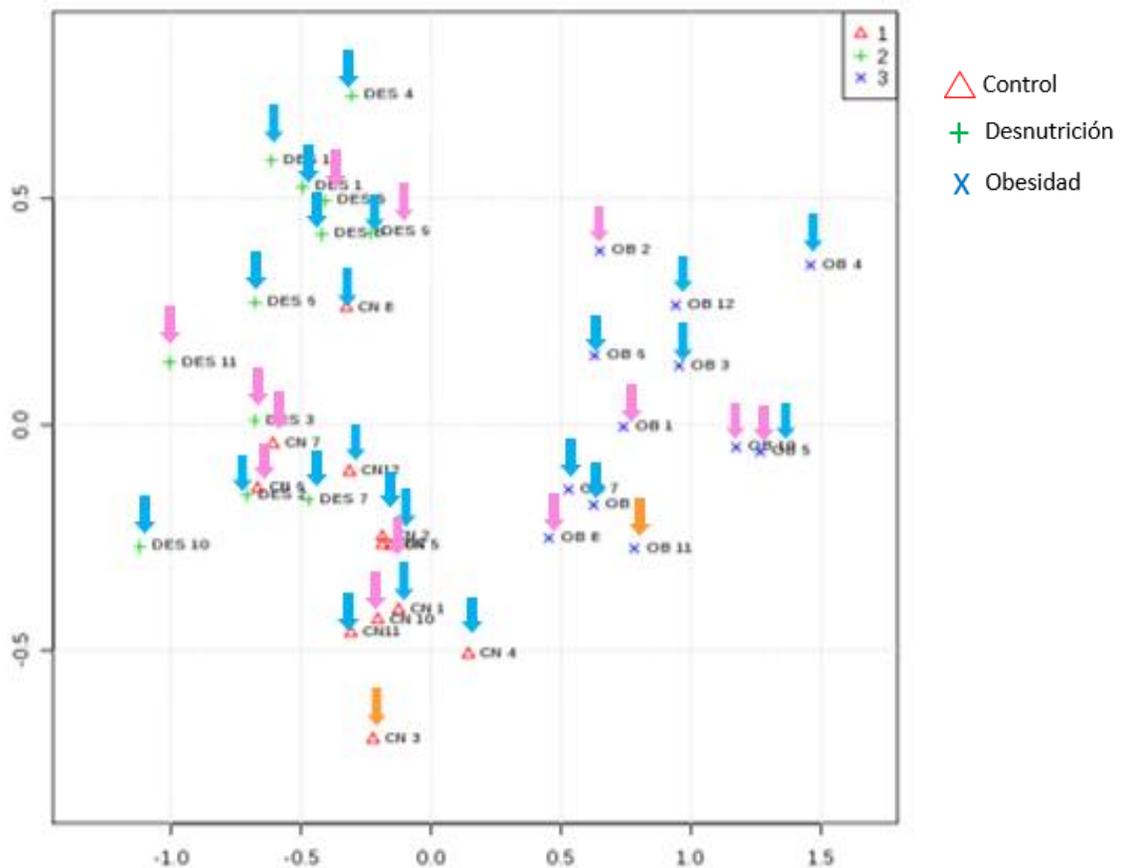
Se realizó un análisis de componentes principales para estudiar las agrupaciones de los fenotipos y evaluar las frecuencias encontradas respecto del tipo de nacimiento del escolar. Encontramos que de los 36 escolares 12 nacieron por cesárea, esto representa un 33.3% sin embargo el 25% de esta cifra, representa a la agrupación del fenotipo OB. Así también se observó que el 66.6% de los escolares nació por parto normal, que representa un 61% del total que corresponden en su mayoría a los fenotipos DES y C (Figura 22).



**Fig 22.** Análisis de componentes principales. Las flechas color naranja indican al escolar que nació por parto normal. Las flechas color púrpura indican al escolar que nació por cesárea CN= Control, DES= Desnutrición, OB=Obesidad

## 6.8 Tipo de lactancia y microbiota intestinal

Se realizó un análisis de componentes principales para estudiar las agrupaciones de los fenotipos y evaluar las frecuencias encontradas del tipo de lactancia recibida los primeros 6 meses de vida. Encontramos que de los 36 escolares 22 recibieron lactancia materna exclusiva, esto representa un 61.2%. El 33.3% combinó lactancia materna y fórmula. Así también se observó que solo el 5.5% de los escolares consumió únicamente fórmula. En este análisis no se encontró una agrupación específica para cada tipo de lactancia (Figura 23).



**Fig 23.** Análisis de componentes principales. Las flechas color azul indican si el escolar consumió leche materna los primeros 6 meses. Las flechas color rosa indican al escolar que consumió lactancia combinada. Las flechas color naranja indican al escolar que consumió fórmula. C= Control, DES= Desnutrición, OB=Obesidad.

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el tipo de la microbiota intestinal y su relación con los fenotipos de obesidad y desnutrición crónica en escolares del municipio de Chimalhuacán en el Estado de México, considerado que este es un municipio con un rezago económico y social además de ser un mosaico poblacional donde coexiste la obesidad y la desnutrición infantil, factores que predisponen a padecer enfermedades crónicas y degenerativas en la vida adulta.

Es indiscutible que la microbiota intestinal pasó a ser un conjunto de bacterias que viven en simbiosis con su hospedero de manera simple y desapercibida, para convertirse en un verdadero órgano metabólico que cumple un papel importante en la obtención de energía a partir de la dieta, con funciones metabólicas, inmunológicas y cognitivas del hospedero. La descripción de la microbiota durante la niñez es indispensable para la detección oportuna de alteraciones metabólicas

Respecto a lo anterior, uno de los hallazgos más importantes encontrado en nuestro estudio fue la diversidad alfa, en la cual observamos existió menor riqueza y diversidad bacteriana en el intestino de aquellos fenotipos con obesidad y desnutrición. También, se observó un menor promedio de especies bacterianas en obesidad y desnutrición comparado con el grupo control. Este mismo descubrimiento fue descrito por Preidis GA y *cols.*, 2015, en ratones neonatos con desnutrición, cuya riqueza y abundancia de microbiota fue menor y el impacto de esta pérdida representó la menor expresión de genes implicados en la extracción de energía a partir de polisacáridos no digeribles <sup>(50)</sup>. Estudios anteriores han indicado que los individuos con una riqueza bacteriana intestinal baja se caracterizan por presentar más adiposidad general, resistencia a la insulina y ganancia de peso a lo largo del tiempo <sup>(41)</sup>.

Esta alteración en la composición bacteriana intestinal hallada en este estudio, toma importancia ya que en un estudio realizado por Subramanian S y cols., 2014, se informó que estas alteraciones pueden ser un factor causal en la desnutrición severa y que la microbiota inmadura puede contribuir a comorbilidades y secuelas, incluyendo el riesgo de enfermedades diarreicas, baja talla, y anormalidades cognitivas todo esto documentado en niños con kwashiorkor de Bangladesh, que poseían un microbioma inmaduro, y presentaban variación en su composición y en metabolitos intermediarios de vías metabólicas de CHO y aminoácidos <sup>(52)</sup>.

En los últimos años se ha dilucidado que la colonización de la microbiota intestinal participa en la programación del desarrollo cerebral, afectando la sinapsis neuronal, el control motor, además de estar implicados en procesos de ansiedad o comportamiento, como lo señaló Diaz Heijtz y cols., 2011 <sup>(53)</sup>, que observó un patrón deficiente de aprendizaje en ratones libres de gérmenes comparado con ratones convencionales. Por lo que, sugerimos que no sólo es la falta de alimento y el deficiente consumo de nutrimentos lo que conlleva a las deficiencias del aprendizaje en niños desnutridos sino que es factible que la aparente disbiosis que observamos también represente un nuevo factor a considerar como blanco terapéutico para mejorar las condiciones intelectuales de estos escolares. Por otra parte existen estudios que señalan que los daños cognitivos y de aprendizaje pueden persistir en aquellos adultos que padecieron desnutrición en su infancia y pueden tener efectos negativos a largo plazo, aún cuando existió rehabilitación nutricional y mejoras en las condiciones socioeconómicas <sup>(54)</sup>.

Respecto a la abundancia relativa de filos se encontró una mayor presencia de Firmicutes en los grupos de desnutrición y obesidad. Mahowald MA y cols; 2009, catalogó a los Firmicutes y Bacteroidetes como los filos dominantes en el intestino humano <sup>(31)</sup>. Ruth E. Ley y cols; 2006, describió que la proporción relativa de Bacteroidetes se reduce en las personas obesas en comparación con las personas delgadas, y que esta proporción aumenta en pacientes que perdían peso por la restricción de CHO y restricción de dietas con grasa <sup>(48)</sup>.

Los Bacteroidetes poseen un gran repertorio de genes implicados en la adquisición y el metabolismo de polisacáridos, incluso más que los Firmicutes. En este sentido, se encontró que la abundancia relativa de Bacteroidetes en el grupo con obesidad disminuyó, mientras que esta fue mayor en el grupo control, lo que podría representar una respuesta adaptativa mediada por el huésped para limitar la absorción de almacenamiento de energía (por ejemplo, reducción de la capacidad para fermentar polisacáridos) <sup>(48)</sup>. Los Bacteroidetes también degradan CHO, tales como N-glicanos que se encuentran en las mucinas. Nuestros resultados mostraron que el grupo de personas desnutridas tuvo menos abundancia de Bacteroidetes en comparación con los controles. En concordancia con este hallazgo, ratones recién nacidos desnutridos, mostraron menor proporción de Bacteroidetes, que fue acompañado por las pérdidas en múltiples genes bacterianos, incluyendo N-glicanos, que puede conferir la menor extracción de la energía a partir de polisacáridos no digeribles o fibra de la dieta <sup>(50)</sup>.

Respecto al cociente F/B, trabajos previos como en el de De Filippo y cols; 2010, han señalado la importancia de esta relación como potencial biomarcador en obesidad, ya que analizó a niños cuya dieta con un alto contenido de grasas, azúcares, almidón y baja en fibra (5.6 g/d), observando un aumento en esta relación F/B, que fue el doble comparado con el cociente de niños del país Burkina Faso en Africa, cuyo consumo de dieta occidental era nulo y consumían dietas basadas en fibra (10.0 g/d) <sup>(34)</sup>. Igualmente, recientes estudios como el de Ruth E. Ley y cols; 2005, reportan que existe un incremento de este cociente F/B en ratones (C57BL/6) *ob/ob* <sup>(47)</sup>. En nuestro trabajo, se observó un cociente aumentado en el fenotipo de obesidad respecto al grupo control, pero también la relación F/B en escolares con desnutrición fue mayor que la de los grupos de obesidad y control. Estudios como el de De Fillipo y cols; 2010, señalan que el aumento en el cociente F/B puede estar asociado a dietas altas en calorías por lo que este aumento del cociente en el grupo de desnutrición puede estar impulsado por la alta ingesta de CHO que se observó en el análisis de dieta.

El incremento observado en nuestro estudio del filo Firmicutes en el grupo de desnutrición comparado con los grupo control y obesidad no se ha reportado previamente, y aunque persiste la controversia sobre un incremento de Firmicutes en el desarrollo de la obesidad en los seres humanos y en modelos animales; investigaciones como la de Hildebrandt, M.A y cols; 2009, demuestran que existe un aumento de Firmicutes y Proteobacterias por el consumo de una dieta alta en grasa independientemente de la presencia o ausencia de la obesidad <sup>(55)</sup>.

Interesantemente, en nuestro estudio se detectó la presencia abundante de Proteobacterias en el fenotipo obeso. Investigaciones previas muestran asociaciones significantivas entre el predominio de este filo bacteriano y disbiosis intestinal y en enfermedades metabólicas, por lo que la alta abundancia de Proteobacterias puede fungir como un marcador potencial de riesgo de enfermedades Shin NR y cols; 2015 <sup>(56)</sup>.

En el análisis discriminante lineal (LDA), constatamos que existe mayor presencia de la familia Lachnospiraceae del orden de los Clostridiales del filo de los Firmicutes en el grupo de desnutrición que fue superior a un puntaje de 4. Miembros de esta familia bacteriana constituyen uno de los mayores grupos taxonómicos de la microbiota intestinal humana que degradan polisacáridos complejos para convertirlos en ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y ácido butírico, que pueden ser utilizados como energía por el hospedero. Recientemente, L. V. Blanton y cols; 2016, descubrió que bacterias específicas pertenecientes a la familia Lachnospiraceae ayudan a mejorar la maquinaria metabólica para promover la síntesis proteica en ratones libres de gérmenes que previamente recibieron donación de heces de niños de Malawi con desnutrición y que poseían una microbiota inmadura <sup>(57)</sup>. Nuestros datos apuntan a que la presencia abundante de Firmicutes, específicamente de la familia Lachnospiraceae en los niños desnutridos, además de correlacionar negativamente con el consumo de energía (kcal), podrían hacer viable una extracción excesiva de energía a partir de la dieta en este fenotipo. Si bien esto puede ser un mecanismo de protección y sostén de procesos

metabólicos en el que interactúan las bacterias con su hospedero para conservar la homeostasis de energía, también podría deberse a un proceso adaptativo sustancial que protege al infante ante la deficiencia de sustratos alimenticios que puede comprometer a los nichos ecológicos bacterianos.

Por otro lado, estudios previos como el de Conor J. Meehan, y cols; 2014, relacionan a la familia Lachnospiraceae con la obesidad a consecuencia de una producción excesiva de ácidos grasos de cadena corta en un fenómeno denominado *harvest* o extracción colónica energética exacerbada. A pesar de que no es clara la afectación directa de esta familia bacteriana en procesos de obesidad y trastornos del metabolismo en humanos, estudios en ratones libres de gérmenes *ob/ob* colonizados con algunas especies concernientes a Lachnospiraceae influyeron el desarrollo de obesidad y diabetes en estos animales Kameyama K y cols; 2014<sup>(58)</sup>. Otros estudios como el de Chol y cols; 2012, demostraron en un modelo de ratón (*C57BL/6J*) propenso a desarrollar obesidad, que el linaje bacteriano Lachnospiraceae participa activamente en la extracción de calorías mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta, provenientes de hidratos de carbono complejos<sup>(20)</sup>.

Si consideramos que estas bacterias podrían estar ligadas a disfunciones metabólicas, su colonización temprana en los niños con desnutrición puede representar también un riesgo a largo plazo, ya que es conocido que un infante desnutrido, tiene susceptibilidad en su vida futura a padecer obesidad, Sawaya AL y cols; 2003<sup>(59)</sup>. Por lo que no se puede descartar que exista una relación estrecha entre la desnutrición y los cambios que se observaron de su microbiota, con la presencia abundante de estas bacterias como un proceso previo al desarrollo de la obesidad.

Indudablemente la microbiota desde la infancia está caracterizada por ser versátil y presentar modificaciones frente a los cambios de dietas altas en CHO y grasas, antibióticos, exposiciones ambientales, tipo de nacimiento, la edad o algunas enfermedades; manteniendo una plasticidad en su conformación y posiblemente

puede ser adaptable ante procesos que podrían romper con la simbiosis que mantiene con su hospedero como lo es un estado de desnutrición, pero que puede ser contraproducente a largo plazo en este fenotipo.

Por otro lado, Arumugam y cols; 2011 reportó a los enterotipos como potenciales biomarcadores microbianos ya que no difieren en abundancia ni en función con características propias del hospedero como el sexo, la edad, índice de masa corporal y nacionalidad, siendo los géneros bacterianos más abundantes y representativos que residen en el intestino humano <sup>(32)</sup>. En nuestra investigación, correlacionamos diferentes parámetros sanguíneos y antropométricos con los enterotipos, pero no encontramos correlación con estas variables.

Al analizar la abundancia de los enterotipos descubrimos que los escolares del grupo control poseen mayor abundancia relativa del enterotipo 2 (Prevotella), respecto a los grupos con obesidad y desnutrición. Este enterotipo se ha asociado con dietas altas en fibra a largo plazo y curiosamente en nuestra investigación observamos que Prevotella correlacionó positivamente con el consumo de frijol, que es uno de los alimentos mayormente consumidos, en la población mexicana y con más del 60% de consumo entre todos los escolares seleccionados.

Respecto al enterotipo 1, se observó que fue más abundante en el grupo con desnutrición respecto a los grupos control y obesidad. Dicho enterotipo, ha sido asociado en diversos estudios con un mayor consumo de dietas altas en grasas y CHO a largo plazo De Fillippo y cols; 2010<sup>(34)</sup>. Nuestros resultados mostraron una correlación positiva entre este enterotipo y el consumo de ácidos grasos saturados, monosaturados, y de energía. A pesar de la aparente disbiosis intestinal en nuestros grupos de estudio (obesidad y desnutrición); este enterotipo en específico, podría ser un biomarcador útil para identificar un patrón de alimentación occidental que representa un riesgo para la salud, y es probable que al utilizarlo en niños, se prevengan los daños que dicha dieta puede causar a largo plazo.

La mayoría de los escolares con obesidad en nuestro estudio fueron los nacidos por cesárea y es indiscutible que existe una asociación entre la obesidad central y el tipo de nacimiento por cesárea <sup>(60)</sup> tal como lo recalcó Mesquita D, y cols, en 2012,

Nuestro trabajo es el primero que demuestra la presencia de alteraciones en la composición, riqueza y diversidad de especies bacterianas en este órgano metabólico en ambos fenotipos (desnutrición y obesidad), mediante el uso de nuevas herramientas tecnológicas como la secuenciación masiva de tercera generación.

## 8. CONCLUSIONES

- Los escolares con mala nutrición (obesidad y desnutrición) tienen una aparente disbiosis intestinal caracterizada por una menor riqueza y diversidad bacteriana en el intestino.
- Los niños desnutridos poseen mayor abundancia relativa del filo de los Firmicutes y miembros bacterianos pertenecientes a la familia Lachnospiracea
- Los niños con obesidad poseen mayor abundancia relativa de Proteobacteria y Bilophila
- La presencia abundante de Firmicutes de la familia Lachnospiraceae podrían marcar un punto de inflexión entre la desnutrición y el riesgo a la obesidad en niños con desnutrición moderada en edad escolar.
- Los enterotipos más representativos 1 (Bacteroides) y 2 (Prevotella) pueden ser potenciales biomarcadores bacterianos que podrían utilizarse para identificar la exposición dietética que conduce al riesgo de enfermedades como obesidad.

## 9. PERSPECTIVAS

Llevar a cabo estudios de intervención dietética con formulados especiales que ya están siendo implementadas por nuestro grupo de trabajo en primarias del municipio, y evaluar su efecto sobre las alteraciones en la microbiota intestinal observadas en la mala nutrición, así como continuar con trabajos de metagenómica para aseverar aquellos metabolitos de las bacterias de interés, que incursionan en el metabolismo del hospedero.

Para establecer el tipo de relación que existe entre la abundancia de Firmicutes en niños con desnutrición, sería interesante indagar el efecto posterior de una intervención alimentaria sobre los linajes bacterianos pertenecientes a Lachnospiraceae, que bien podrían ser considerados marcadores temprano de riesgo a obesidad en niños con desnutrición en edad escolar.

## 10. REFERENCIAS

1. Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*. 2014;38(5):996-1047.
2. Stewart EJ. Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology*. 2012;194(16):4151-60.
3. Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(1):208-36.
4. Kane AV, Dinh DM, Ward HD. Childhood malnutrition and the intestinal microbiome. *Pediatric research*. 2015;77(1-2):256-62.
5. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(10):908-34.
6. Lee JC, Gutell RR. A comparison of the crystal structures of eukaryotic and bacterial SSU ribosomal RNAs reveals common structural features in the hypervariable regions. *PloS one*. 2012;7(5):e38203.
7. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*. 2016;17(1):135.

8. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15718-23.
9. Rubin BE, Sanders JG, Hampton-Marcell J, Owens SM, Gilbert JA, Moreau CS. DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. *MicrobiologyOpen*. 2014;3(6):910-21.
10. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JL. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
11. Khan MT, Nieuwdorp M, Backhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell metabolism*. 2014;20(5):753-60.
12. Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends in genetics : TIG*. 2013;29(1):51-8.
13. Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current microbiology*. 2005;51(4):270-4.
14. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature medicine*. 2016;22(3):250-3.
15. Rodriguez JM. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in nutrition*. 2014;5(6):779-84.

16. Donovan SM, Wang M, Li M, Friedberg I, Schwartz SL, Chapkin RS. Host-microbe interactions in the neonatal intestine: role of human milk oligosaccharides. *Advances in nutrition*. 2012;3(3):450S-5S.
17. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:104.
18. Barquera S, Peterson KE, Must A, Rogers BL, Flores M, Houser R, et al. Coexistence of maternal central adiposity and child stunting in Mexico. *International journal of obesity*. 2007;31(4):601-7.
19. Panda S, El khader I, Casellas F, Lopez Vivancos J, Garcia Cors M, Santiago A, et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PloS one*. 2014;9(4):e95476.
20. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methe BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012;488(7413):621-6.
21. Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *International journal of obesity*. 2013;37(2):216-23.
22. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(10):577-91.
23. Morowitz MJ, Carlisle EM, Alverdy JC. Contributions of intestinal bacteria to nutrition and metabolism in the critically ill. *The Surgical clinics of North America*. 2011;91(4):771-85, viii.

24. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature communications*. 2013;4:1829.
25. Hong YH, Nishimura Y, Hishikawa D, Tsuzuki H, Miyahara H, Gotoh C, et al. Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*. 2005;146(12):5092-9.
26. Sun Y, O'Riordan MX. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain Fatty acids. *Advances in applied microbiology*. 2013;85:93-118.
27. Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ, Jr., Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PloS one*. 2012;7(4):e35240.
28. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011;474(7351):327-36.
29. Ghosh TS, Gupta SS, Bhattacharya T, Yadav D, Barik A, Chowdhury A, et al. Gut microbiomes of Indian children of varying nutritional status. *PloS one*. 2014;9(4):e95547.
30. Mazmanian SK, Kasper DL. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(11):849-58.
31. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(14):5859-64.

32. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
33. Lim MY, Rho M, Song YM, Lee K, Sung J, Ko G. Stability of gut enterotypes in Korean monozygotic twins and their association with biomarkers and diet. *Scientific reports*. 2014;4:7348.
34. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14691-6.
35. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559-63.
36. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut microbes*. 2012;3(4):279-88.
37. Larsen PE, Dai Y. Metabolome of human gut microbiome is predictive of host dysbiosis. *GigaScience*. 2015;4:42.
38. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut microbes*. 2012;3(4):279-88.
39. Guerrant RL, DeBoer MD, Moore SR, Scharf RJ, Lima AA. The impoverished gut--a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(4):220-9.

40. Dugas LR, Fuller M, Gilbert J, Layden BT. The obese gut microbiome across the epidemiologic transition. *Emerging themes in epidemiology*. 2016;13:2.
41. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500(7464):541-6.
42. Allin KH, Nielsen T, Pedersen O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2015;172(4):R167-77.
43. Tilg H, Moschen AR. Malnutrition and microbiota--a new relationship? *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(5):261-2.
44. Aceves-Martins M, Llauro E, Tarro L, Sola R, Giralt M. Obesity-promoting factors in Mexican children and adolescents: challenges and opportunities. *Global health action*. 2016;9:29625.
45. Kroker-Lobos MF, Pedroza-Tobias A, Pedraza LS, Rivera JA. The double burden of undernutrition and excess body weight in Mexico. *The American journal of clinical nutrition*. 2014;100(6):1652S-8S.
46. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;341(6150):1241214.
47. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):11070-5.

48. Ley Ruth E, Turnbaugh Peter J, Klein Samuel, and Gordon Jeffrey I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, pp. 1022-1023, 2006.
49. Smith MI, Yatsunenko T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*. 2013;339(6119):548-54.
50. Preidis GA, Ajami NJ, Wong MC, Bessard BC, Conner ME, Petrosino JF. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(10):1050-7.
51. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*. 2011;12(6):R60.
52. Subramanian S, Huq S, Yatsunenko T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*. 2014;510(7505):417-21.
53. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, Fitzmaurice G, Eaglesfield GD, Waber DP. Infant malnutrition is associated with persisting attention deficits in middle adulthood. *The Journal of nutrition*. 2012;142(4):788-94.
54. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(7):3047-52.

55. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-24 e1-2.
56. Shin, N. R., Whon, T. W. & Bae, J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* **33**, 496–503 (2015).
57. L. V. Blanton, M. R. Charbonneau, T. Salih, M. J. Barratt, S. Venkatesh, O. Ilkaveya, S. Subramanian, M. J. Manary, I. Trehan, J. M. Jorgensen, Y.-m. Fan, B. Henrissat, S. A. Leyn, D. A. Rodionov, A. L. Osterman, K. M. Maleta, C. B. Newgard, P. Ashorn, K. G. Dewey, J. I. Gordon. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science*, 2016; 351 (6275): aad3311 DOI: 10.1126/science.aad3311.
58. Kameyama K, Itoh K. Intestinal colonization by a Lachnospiraceae bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice. *Microbes and environments / JSME*. 2014;29(4):427-30.
59. Sawaya AL, Martins P, Hoffman D, Roberts SB. The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: A case study of Brazil. *Nutr. Rev.* 2003;61:168–175.
60. Mesquita DN, Goldani MZ, Kac G, Silva AA, Bettioli H. Cesarean section is associated with increased peripheral and central adiposity in young adulthood: cohort study. *PLoS ONE* 2013; 8:e66827.
61. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad federativa, Estado de México. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2013.

## 11. ANEXOS.

### Anexo 1. Carta de consentimiento informado



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO  
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR

#### **CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:**

“Descripción de la microbiota intestinal en escolares de Chimalhuacán con mala nutrición”  
Chimalhuacán, Estado de México., a \_\_\_\_\_

A QUIEN CORRESPONDA:

El (la) que suscribe \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_ años,  
acepto la participación en forma libre y voluntaria de mi hijo  
(a) \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ años; en el estudio

“Descripción de la microbiota intestinal en escolares de Chimalhuacán con mala nutrición”  
Chimalhuacán, Estado de México”, cuyo propósito es conocer el estado de salud y nutrición de los  
escolares del municipio; para lo cual se tomará la presión arterial, talla, peso, circunferencia de  
cintura y cadera, así como una muestra de sangre (5 ml) para evaluar sus concentraciones de  
colesterol, colesterol-HDL, triglicéridos, glucosa, insulina y hemoglobina. Se realizará un estudio de  
heces (recolectando la muestra como lo dice el instructivo). Además responderé un cuestionario  
por escrito sobre los hábitos alimenticios de mi hijo Tengo conocimiento que este estudio se lleva a  
cabo por parte de una colaboración entre la Facultad de Química de la UNAM, el Hospital Juárez de  
México y los servicios de Salud del Municipio de Chimalhuacán, Estado de México. Se me ha  
informado de la importancia del estudio, así como de los objetivos del mismo y de la forma en que  
se tomará la muestra de sangre. Dándome la oportunidad para hacer preguntas libremente y  
estando satisfecho (a) de la información y respuestas.

Firma de los padres del participante \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Firma del investigador: \_\_\_\_\_

Testigo1: \_\_\_\_\_

Testigo2: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Carta de asentimiento informado



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO  
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR  
**ASENTIMIENTO POR ESCRITO**

Obtención de sangre para su procesamiento, almacenamiento y obtención de heces (popó) para el estudio: “Descripción de la microbiota intestinal en escolares de Chimalhuacán con mala nutrición”

YO, (nombre y apellidos) \_\_\_\_\_

Declaro que:

- 1.- He leído o me han leído la hoja de información y he entendido todo lo que ponen en ella.
- 2.- Me han contestado todas las dudas que tenía sobre el estudio.
- 3.- Yo sé que puedo decidir no participar en este estudio y que no pasa nada.
- 4.- Yo sé que si decido participar me sacarán sangre y que esto me puede doler un poco.
- 5.- Yo sé que si cuando empiece el estudio tengo alguna duda, puedo preguntar las veces que lo necesite.
- 6.- Yo sé que cuando empiece el estudio, en cualquier momento puedo decir que ya no quiero seguir participando y nadie me regañará por eso.
- 7.- Yo sé que si decido dejar el estudio puedo pedir que mi sangre se elimine del banco de muestras.
- 8.- He decidido participar en el estudio

\_\_\_\_\_  
Firma del niño/a

¿Los padres o tutores han firmado el consentimiento informado?

Sí  No



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA  
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO  
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR  
**ASENTIMIENTO POR ESCRITO**

Mi nombre es Eder Orlando Méndez Salazar de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y mi trabajo consiste en ayudar a los investigadores y a las personas que trabajan en la UNAM a conocer mejor las enfermedades como la desnutrición y la obesidad, para encontrar mejores tratamientos y medidas de prevención para los niños.

Para conocer mejor las enfermedades como la mala nutrición, y así encontrar mejores tratamientos y medidas de prevención para los niños, necesitamos sangre y heces (popó) de niños como tú para poder investigar con ellas. Por este motivo quiero saber si te gustaría participare en el estudio. Ya hemos hablado con tus padres/ tutores y ellos saben que te estamos preguntando si quieres participar.

Si decides participar en este estudio:

1.- Tu popó será utilizada para hacer investigaciones y con este estudio los investigadores intentarán conocer mejor la enfermedad la mala nutrición, buscar nuevos tratamientos y medidas de prevención.

Si cuando empieces a participar en el estudio tienes alguna duda puedes preguntarme todo lo que quieras saber.

Aunque ahora decidas participar, si más adelante no quieres continuar puedes dejarlo cuando tú quieras y nadie se enojará contigo.

Si decides que no quieres participar en el estudio no pasa nada y nadie se va a enojar ni te va a regañar por ello.

Si decides participar en el estudio y firmar esta hoja, yo la guardaré junto con el resto de la información que tengo sobre ti.

### Anexo 3. Aprobación del comité de ética



**HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO**  
**DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA**  
**ACEPTACION DE PROTOCOLO/TESIS DE INVESTIGACION**



México D. F., a 11 de MARZO de 2014.

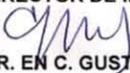
M. EN C. GUADALUPE ORTIZ LOPEZ  
LAB. ENDOCRINOLOGIA MOLECULAR  
**PRESENTE**

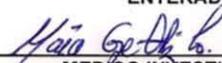
Por medio de este conducto le informo que los Comités de ÉTICA,  
INVESTIGACION y BIOSEGURIDAD evaluaron su Protocolo/Tesis:

EVALUACION DEL ESTADO NUTRICIONAL EN NIÑOS DE CHIMALHUACAN: ABORDAJE ANTROPOMETRICO, BIOQUIMICO Y MOLECULAR.

y de acuerdo a los investigadores revisores dictaminaron **Aceptarlo**, asignándole el número de registro: HJM 2315/14-C.

Por lo tanto se autoriza su realización y deberá renovarse su vigencia en 2015.

**ATENTAMENTE**  
**DIRECTOR DE INVESTIGACION**  
  
**DR. EN C. GUSTAVO ACOSTA ALTAMIRANO**

**ENTERADO**  
  
**MEDICO INVESTIGADOR**  
**INVESTIGADOR RESPONSABLE/TUTOR**

**Notas:**  
1.- Esto me comprometo a informar trimestralmente del avance del proyecto en el Área de Registro de Protocolos y Seguimiento de la Dirección de Investigación y Enseñanza.  
2.- A partir de la fecha de aprobación del protocolo los investigadores tienen dos años para publicar resultados en revistas de nivel III.

c.c.p. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

GAA/RMN

HJM-DIE-FOR-014-AP