



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDOS  
GRASOS OMEGA-3 SOBRE EL PERFIL DE LA  
MICROBIOTA INTESTINAL EN ADOLESCENTES  
OBESOS MEXICANOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA  
LUIS EDUARDO LLANOS MORENO**

**MÉXICO, CDMX**

**AÑO 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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

**VOCAL:** M. en C. LUCÍA CORNEJO BARRERA

**SECRETARIO:** Dr. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

**1er. SUPLENTE:** M. en C. MARTHA GILES GÓMEZ

**2° SUPLENTE:** M. en C. TANIA GÓMEZ SIERRA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD PERIFÉRICA DE INVESTIGACIÓN EN GENÓMICA DE POBLACIONES APLICADA A LA SALUD.**

**ASESOR DEL TEMA: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**

(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO: BLANCA ESTELA LÓPEZ CONTREAS**

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S): LUIS EDUARDO LLANOS MORENO**

(nombre y firma)

# ÍNDICE

Contenido	Página
Abreviaturas de términos.....	1
RESUMEN.....	3
<b>1. OBESIDAD.....</b>	<b>5</b>
1.1 Prevalencia de la obesidad.....	6
1.1.1 Obesidad en población adolescente.....	6
1.2 Causas de la obesidad.....	7
1.2.1 Factores genéticos.....	8
1.2.2 Factores ambientales.....	8
1.3 Complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad.....	9
<b>2. PARTICIPACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 EN LA OBESIDAD.....</b>	<b>12</b>
2.1 Ácidos grasos omega-3.....	12
2.2 Fuentes de ácidos grasos omega-3.....	13
2.3 Efecto de los ácidos grasos omega-3 en la obesidad .....	14
2.4 Estudios de intervención con ácidos grasos omega-3.....	16
<b>3. MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON LA OBESIDAD Y LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA3.....</b>	<b>17</b>
3.1 Microbiota intestinal.....	17
3.2 Microbiota intestinal y obesidad.....	17
3.3 Efecto de la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal .....	20
3.4 Microbiota intestinal y ácidos grasos omega-3.....	21
1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Población de estudio.....	24

4.2	Diseño del estudio.....	25
4.2.1	Antropometría.....	25
4.2.2	Parámetros bioquímicos.....	25
4.2.3	Muestra de materia fecal.....	26
4.3	Intervención dietaria.....	26
4.3.1	Composición del suplemento.....	27
4.4	Extracción de ADN bacteriano.....	28
4.4.1	Calidad e integridad del ADN.....	29
4.5	Amplificación del gen 16s.....	29
4.6	Secuenciación masiva para el estudio del gen 16s del ARNr.....	31
4.6.1	Pirosecuenciación.....	32
4.7	Análisis bioinformático.....	35
4.8	Análisis estadístico.....	35
4.	RESULTADOS.....	36
5.	DISCUSIÓN.....	44
6.	CONCLUSIONES.....	46
7.	PERSPECTIVAS.....	47
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	49

## ABREVIATURAS DE TÉRMINOS

- **ADN.**- ácido desoxirribonucleico
- **AGCC.**- ácidos grasos de cadena corta
- **ALA.**- ácido alfa linolénico
- **ALT.**- alanina aminotransferasa
- **ARN.**- ácido ribonucleico
- **AST.**- aspartato aminotransferasa
- **CDC.**- Centers for Disease Control and Prevention
- **DHA.**- ácido docosahexaenoico
- **EPA.**- ácido eicosapentaenoico
- **FTO.**- *fat mass and obesity-associated protein*
- **GF.**- *germ free*
- **GGT.**- gama glutamil transpeptidasa
- **GPR.**-
- **HDL.**- lipoproteína de alta densidad

- **IMC** .- índice de masa corporal
- **LDL**.- lipoproteína de baja densidad
- **LPS**.- lipopolisacárido
- **MC4R**.- receptor melanocortin 4
- **PCR**.- reacción en cadena de la polimerasa
- **PPAR**.- receptor activador de peroxisomas
- **PPY**.-
- **SREBP**.- proteína de unión a elemento regulador del estero
- **TAG** .- triacilgliceroles
- **VLDL**.- lipoproteína de muy baja densidad

## **RESUMEN**

**Introducción.-** La obesidad es una enfermedad compleja considerada una pandemia y un problema de salud pública en México. La prevalencia de sobrepeso y obesidad en adolescentes es de 35%. La obesidad en edad infantil y adolescencia incrementa la posibilidad de presentarla en la edad adulta por lo que su tratamiento y prevención es de gran importancia. Además, la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar otras enfermedades como diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad coronaria, entre otras. Se ha observado que los ácidos grasos omega-3 participan en la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa, así como en la regulación de los procesos inflamatorios. Por tal motivo, se utilizan en la prevención y tratamiento de la obesidad y de sus complicaciones metabólicas.

Estudios recientes sugieren que los efectos de los ácidos grasos omega-3 son regulados por cambios en la microbiota intestinal. Se ha observado que los omega-3 aumentan la abundancia de géneros protectores contra la inflamación y disminuyen la presencia de bacterias asociadas con la endotoxemia metabólica, protegiendo así, el desarrollo de complicaciones metabólicas asociadas con la obesidad. Con base en estos antecedentes, nuestro interés fue evaluar si la suplementación diaria con ácidos grasos omega-3 genera cambios sobre la composición de la microbiota intestinal de adolescentes obesos, y si estos cambios están asociados con los parámetros bioquímicos de los sujetos en estudio.

**Materiales y métodos.-** En este estudio participaron 16 sujetos, de los cuales 8 finalizaron una intervención por 3 meses con un suplemento comercial de ácidos grasos omega-3 (1.2 g/día) y 8 con un placebo (1.0 g/día de aceite de girasol). Todos los participantes proporcionaron una muestra de materia fecal al inicio y al final de la intervención, así como

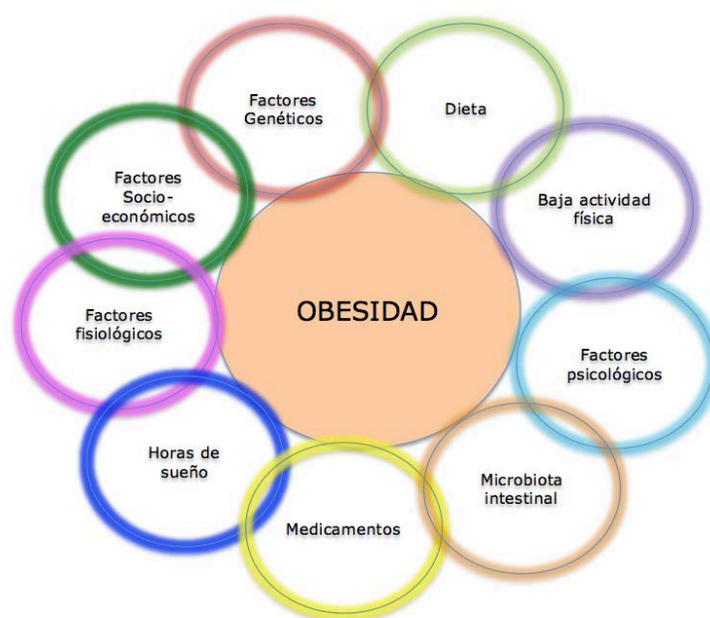
muestras de sangre periférica para la determinación de parámetros bioquímicos. De las muestras fecales se extrajo ADN y se amplificó un fragmento del gen 16s ribosomal que contiene las regiones hipervariables V3-V9. Posteriormente, los amplicones fueron secuenciados. La clasificación taxonómica se realizó con el programa QIIME. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa SPSS V 15.0.

**Resultados.-** Los sujetos que consumieron el suplemento de omega-3 presentaron una reducción significativa en los niveles séricos de alanina transaminasa ( $P=0.012$ ). Al evaluar los cambios en la microbiota intestinal no se observaron diferencias significativas a ningún nivel taxonómico, desde fila hasta género, tras finalizar la suplementación.

**CONCLUSIONES.-** La suplementación con ácidos grasos omega-3 no generó cambios en la composición de la microbiota intestinal de los participantes. Sin embargo, sí se observó una reducción en los niveles de alanina transaminasa. Por ello, podemos inferir que los cambios en dicho metabolito no estuvieron asociados con la composición de las bacterias intestinales. Este estudio utilizó un tamaño de muestra limitado, sin embargo, permitió estandarizar el protocolo experimental para la pirosecuenciación, así como el diseño de la intervención que permitirá al laboratorio generar nuevos proyectos o ampliar el presente estudio.

## 1. OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad compleja asociada con un desequilibrio entre el gasto energético y el consumo calórico. Es decir, se consume más energía de la que se gasta. Dicha energía es acumulada en forma de grasa y en consecuencia las células del tejido adiposo aumentan tanto en tamaño (hipertrofia) como en número (hiperplasia) (Jo *et al.*, 2009). Esta patología es considerada una enfermedad multifactorial, debido a que en su desarrollo intervienen factores genéticos, ambientales y socioeconómicos (Figura 1) (Bray, 1999; Bouchard, 2008; Chan y Woo, 2010).



### **Figura 1.- Factores involucrados en el desarrollo de la obesidad.**

La obesidad está asociada con diversos factores tales como la genética del individuo, la dieta, la actividad física, las horas de sueño entre otros. El conjunto de estos factores hacen que la obesidad sea considerada una enfermedad compleja.

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

La prevalencia de la obesidad ha aumentado de manera importante a nivel mundial por lo que es considerada un problema de salud pública. Esta patología es un factor de riesgo para presentar otros padecimientos, tales como diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedad coronaria, síndrome metabólico y algunos tipos de cáncer (Calle *et al.*, 2003).

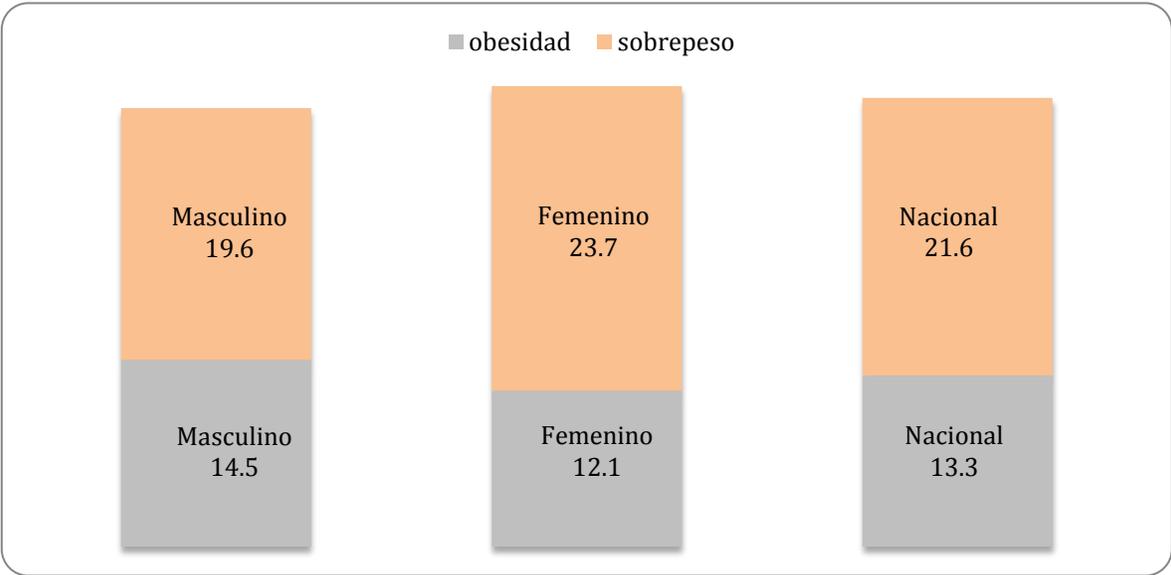
Con base en la información de la Organización Mundial de la Salud alrededor de 600 millones de personas adultas en el mundo padecen obesidad (OMS, 2016), los cuales representan un gasto del 2 al 6% del presupuesto destinado al sector salud de varias naciones. Estos costos se ven reflejados en tratamientos médicos, campañas en medios masivos y política fiscal (Swinburn *et al.*, 2011).

Durante los últimos 40 años, el perfil epidemiológico de la obesidad en México ha cambiado de manera importante. Los problemas de salud con mayor prevalencia antes de 1980 eran las enfermedades infecciosas y las relacionadas a la desnutrición (Rivera *et al.*, 2015). Sin embargo, a partir de esa década se incrementaron de manera alarmante las enfermedades relacionadas a la obesidad. En consecuencia, México ocupa el primer lugar en obesidad infantil y el segundo en obesidad en población adulta, según cifras de la OMS para el año 2013.

### **1.1.1 Obesidad en población adolescente.**

Los datos recabados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del año 2012, informaron que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en población adolescente (12 a 19 años) se triplicó de 1988 a

2012 en nuestro país. Actualmente, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad es de 35% (Figura 2) (Gutiérrez-Delgado *et al.*, 2012). Es decir que 3 de cada 10 adolescentes presenta sobrepeso u obesidad. El control de esta patología en la adolescencia es altamente relevante debido a que aumenta la probabilidad de presentar obesidad y sus co-morbilidades en la etapa adulta (Lifshitz 2008).



**Figura 2.- Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adolescentes de 12 a 19 años en México. Adaptado de: ENSANUT 2012.**

**1.2 Causas de la obesidad.**

Como ya se mencionó, la obesidad es una patología compleja y con múltiples factores que incrementan el riesgo de presentarla. Estos factores se engloban en dos tipos: factores genéticos y factores ambientales.

### **1.2.1 Factores genéticos.**

Estudios en gemelos han permitido determinar que la genética juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad. Estos estudios han observado que el peso corporal y la adiposidad presentan una mayor concordancia entre gemelos monocigóticos en comparación con gemelos dicigóticos, lo que sugiere la participación de la genética en la regulación de dichas variables (Bouchard, 2008). Otro tipo de estudios que establecen la asociación entre la genética y el fenotipo de la obesidad son los estudios en familias, los cuales han observado una agregación importante de individuos que padecen esta patología dentro de un mismo núcleo familiar (Feinleib *et al.*, 1977; Stunkard *et al.*, 1986; Santos *et al.*, 2005; Chaput *et al.*, 2014). Se han realizado diversos estudios para calcular la heredabilidad de la obesidad y se ha llegado a un valor mínimo de 0.40 y un valor máximo de 0.70, es decir que la variación del peso corporal puede ser explicado en al menos un 40% por el componente genético (Bell *et al.*, 2005; Maes, *et al.*, 1997).

### **1.2.2 Factores ambientales**

Dentro de los factores ambientales obesogénicos destacan los siguientes (Hill y Peters 1998):

- El aumento de la disponibilidad de los alimentos. Hoy en día se tiene un mayor acceso a los alimentos, por lo que es más frecuente consumir más cantidad de ellos.
- La alta densidad energética en la dieta. La industrialización de los alimentos ha generado productos con mayor cantidad de nutrimentos altamente energéticos como las grasas y los azúcares

simples, lo que conlleva a un consumo de más energía en menos cantidad de alimento.

- La disminución de la actividad física. Los avances en tecnología y transporte han llevado el estilo de vida hacia el sedentarismo y un bajo gasto energético. Como consecuencia la cantidad de energía consumida es mayor que la utilizada y se convierte en un factor de riesgo para presentar obesidad.

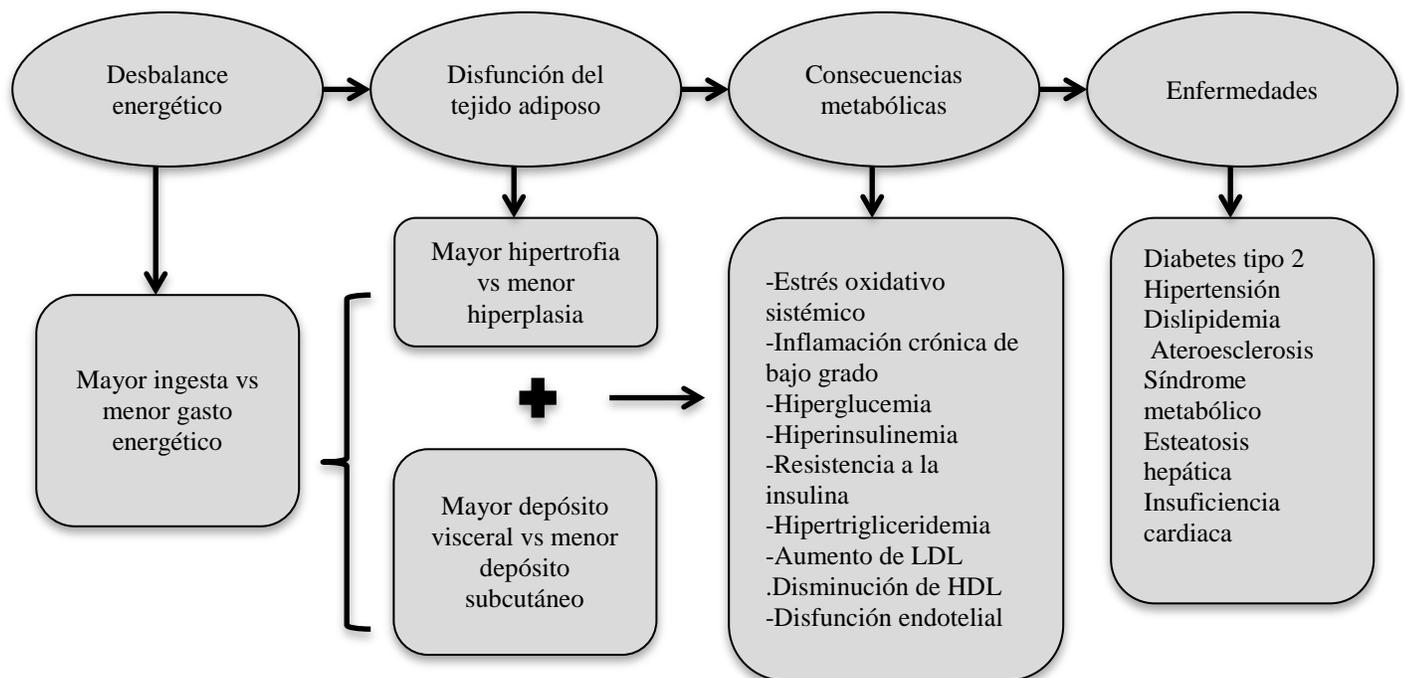
Neel *et al.*, 1962 propusieron una teoría llamada "genotipo ahorrador" que explica el desarrollo de la obesidad a partir de la interacción entre la genética humana y el ambiente. Esta teoría establece que los genes del ser humano se adaptaron para aprovechar de manera eficiente el consumo energético. Esta adaptación permitió sobrevivir a la escasez alimentaria en periodos largos de ayuno y a la demanda energética que implicaba la caza y la recolección. Sin embargo, con el aumento de la disponibilidad de los alimentos y la disminución del gasto energético, la naturaleza "ahorradora" de nuestro genoma favoreció la conservación de la energía no utilizada en forma de depósitos de grasa corporal, propiciando el padecimiento de obesidad.

### **1.3 Complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad**

El exceso de depósitos de grasa puede ser almacenado en dos tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo visceral. Ambos tienen diferencias metabólicas importantes, el tejido adiposo subcutáneo se caracteriza por tener mayor capacidad de absorción de ácidos grasos libres, mayor sensibilidad a la insulina y se compone de células con mayor capacidad de diferenciación. En contraste, el tejido adiposo visceral presenta mayores niveles de expresión de citocinas

proinflamatorias, mayor producción de radicales libres, menor capacidad de absorción de ácidos grasos libres y se compone de células con menor capacidad de diferenciación. Se ha observado que en la obesidad el tejido adiposo visceral aumenta al rebasar la capacidad del tejido adiposo subcutáneo de almacenar más depósitos de grasa. Además, los adipocitos presentan hipertrofia, lo que puede llegar a alterar la funcionalidad de las células (Flores-Lázaro *et al.*, 2011).

El tejido adiposo con alteraciones funcionales puede liberar ácidos grasos libres y adipocinas hacia el hígado y otros tejidos a través del torrente sanguíneo, generando acumulación de lípidos en ellos (lipotoxicidad). Estas alteraciones aumentan la actividad inflamatoria y el estrés oxidativo, desencadenando una disfunción sistémica que conlleva a la hiperglucemia, dislipidemia y resistencia a la insulina (Figura 3) (Bays *et al.*, 2008b; De Ferranti *et al.*, 2008; Després *et al.*, 2008).



**Figura 3.- Consecuencias metabólicas de la obesidad. Tomado de Flores, 2011.** El desbalance energético de la obesidad altera las funciones del tejido adiposo. Esta disfunción genera complicaciones metabólicas que aumentan el riesgo de presentar enfermedades como

DMT2, aterosclerosis, esteatosis hepática entre otros. 10

Esta disfuncionalidad sistémica puede conllevar a la presencia de síndrome metabólico. Esta condición es un conjunto de factores de riesgo que predisponen a desarrollar co-morbilidades asociadas a la obesidad, como la DT2 y la enfermedad coronaria.

El síndrome metabólico es diagnosticado cuando se presentan tres de cinco factores de riesgo que se enumeran a continuación (National Cholesterol Education Program, 2001):

1. Acumulación de grasa abdominal incrementando así la circunferencia de cintura (obesidad).
2. Niveles altos de triglicéridos en sangre (hipertrigliceridemia).
3. Niveles bajos de colesterol HDL en sangre (hipoalfalipoproteinemia).
4. Tensión arterial alta (hipertensión).
5. Niveles altos de glucosa sérica en ayuno (hiperglucemia).

Los puntos de corte de estos factores dependen de la edad de la población. Para el caso de población infantil y adolescente existen distintos puntos de corte sugeridos en la literatura. Uno de ellos son los propuestos por De Ferranti *et al.*, 2004 los cuales se ilustran en la Tabla 1.

**Tabla 1.- Criterios de De Ferranti para el diagnóstico de síndrome metabólico en niños y adolescentes**

Complicación	Punto de corte (De Ferranti)
Circunferencia de cintura (obesidad)	Percentil >75*
Hipertensión	Percentil >90**
Hiperglucemia	≥110 mg/dL
Hipertrigliceridemia	≥100 mg/dL
Hipolipoproteinemia HDL	< 50 mg/dL

\*El percentil está calculado por edad y género. \*\*El percentil está calculado por edad, género y talla.

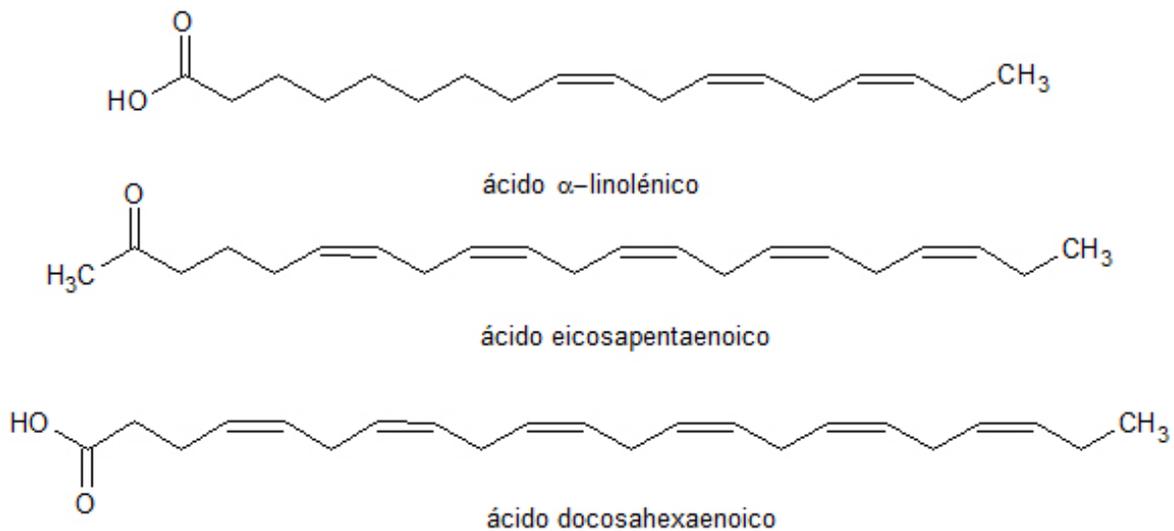
El crecimiento de los índices de mortalidad por enfermedades asociadas con la obesidad, han dado pauta hacia el desarrollo de diversas estrategias para combatir sus daños. Desde finales del siglo pasado se ha estudiado con gran interés el papel de los ácidos grasos omega-3 en el control de la obesidad y sus complicaciones metabólicas. Se ha observado que estos ácidos grasos participan en la regulación del proceso de inflamación, metabolismo de lípidos, tensión arterial y metabolismo de glucosa (Bays *et al.*, 2008a; Cabo *et al.*, 2012; Leslie *et al.*, 2015).

## **2. PARTICIPACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 EN LA OBESIDAD**

### **2.1 Ácidos grasos omega-3**

Los ácidos grasos son cadenas monocarboxílicas de naturaleza alifática que en su mayoría se componen de un número par de átomos de carbono. Éstos pueden ser clasificados según la cantidad de dobles enlaces que contenga la cadena de carbono en: ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

Los ácidos grasos omega-3 son poliinsaturados, y presentan un doble enlace en el tercer carbono contando a partir del grupo metilo terminal. Los ácidos grasos omega-3 más importantes debido a su actividad biológica son el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), el ácido docosohexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (Figura 4).



**Figura 4.- Estructura del ALA, EPA y DHA**

Estos ácidos grasos son componentes importantes de las membranas celulares y son precursores de moléculas que participan en la señalización celular, en la regulación de la expresión de genes y en la regulación del proceso de inflamación (Simopoulos, 2002; Hou et al., 2015; Vallée *et al.*, 2016). Se consideran ácidos grasos indispensables debido a que no pueden ser sintetizados por nuestro organismo. Por lo tanto, la fuente principal de estos nutrimentos es a través de la dieta. De acuerdo con la *American Heart Association*, la recomendación de consumo de DHA + EPA es de 0.5 a 1.8 g/día (Kris-Etherton *et al.*, 2001).

## **2.2 Fuentes de ácidos grasos omega 3.**

Los ácidos grasos omega-3 son líquidos a temperatura ambiente por ser poliinsaturados. El ALA es el precursor de otros ácidos grasos omega-3 y se encuentra principalmente en alimentos de origen vegetal como la chía, la linaza, las nueces, el aceite de canola y el aceite de soya. En el caso del DHA y el EPA pueden encontrarse principalmente en el aceite de pescado y de bacalao (Bézard, 1994).

Tanto el DHA como el EPA pueden ser sintetizados endógenamente por una enzima llamada  $\Delta 6$ -desaturasa a partir de ALA pero como se mencionó, el proceso de síntesis es ineficiente debido a que el ALA compite con otros sustratos de 18 carbonos como el ácido linoléico para su conversión (Bézard, 1994) por ello, la fuente más importante de estos dos ácidos grasos omega-3 es a partir de la dieta.

### **2.3 Efecto de los ácidos grasos omega 3 en la obesidad y sus complicaciones.**

Se ha observado que el consumo de ácidos grasos omega-3 está relacionado con el mejoramiento de complicaciones metabólicas asociadas con la obesidad. Los mecanismos por los cuales suceden estos mejoramientos son a través de la regulación de la función celular en tres niveles:

1.-Los ácidos grasos omega-3 DHA y EPA se incorporan a la membrana lipídica de las células. Los dobles enlaces de estos ácidos grasos le proporcionan mayor fluidez a la membrana, permitiendo así el correcto funcionamiento de las proteínas de membrana que actúan como receptores, transportadores o enzimas de membrana (Kidd, 2007).

2.-Los ácidos grasos omega-3 regulan la expresión de genes asociados con la obesidad. Los eicosanoides provenientes de el EPA, así como concentraciones micromolares de ácidos grasos omega-3 son activadores del factor de transcripción PPAR $\alpha$ , el cual favorece la entrada de ácidos grasos tanto en la mitocondria como en los peroxisomas, aumentando así la oxidación lipídica (Gani, 2008; Kaplins'kyř *et al.*, 2009).

A su vez, los ácidos grasos omega-3 son reguladores negativos de la lipogénesis. Estos ácidos grasos inhiben la actividad de las proteínas de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBP). SREBP tiene tres isoformas, SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 siendo las dos últimas las más abundantes. Su función es aumentar la transcripción de más de 30 genes utilizados en la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos en presencia de esteroides (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2012).

Como se mencionó, una de las consecuencias de la obesidad es el aumento de citocinas proinflamatorias que alteran la función del tejido adiposo y propician la resistencia a la insulina. El consumo de ácidos grasos omega-3 activa el factor de transcripción PPAR $\gamma$ , el cual está implicado en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros. Esta diferenciación genera una mayor cantidad de receptores para la insulina, por lo tanto, disminuye la resistencia a esta hormona (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005).

3.- Los ácidos grasos omega-3 regulan el proceso de inflamación. El consumo de ácidos grasos omega-3 está asociado a la disminución de metabolitos proinflamatorios provenientes del metabolismo de los ácidos grasos omega-6 y al aumento de eicosanoides (resolvinas y protectinas) que regulan negativamente la cascada de inflamación (Calder, 2015).

## **2.4 Estudios de intervención con ácidos grasos omega-3.**

Se han realizado estudios de intervención con ácidos grasos omega-3 para observar si éstos conllevan a mejoramientos metabólicos en los pacientes. La mayoría de estos trabajos utilizan cápsulas de aceite de pescado como fuente de ácidos grasos omega-3.

Se ha observado que el consumo de aceite de pescado rico en DHA y EPA mejora la sensibilidad a la insulina y reduce marcadores de inflamación en sujetos con sobrepeso (Mori, 2004) y en sujetos obesos con síndrome metabólico (Lorente-Cebrián *et al.*, 2013). De igual forma, varios estudios de intervención con ácidos grasos omega-3 han reportado que las concentraciones séricas de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) disminuyen en sujetos con síndrome metabólico (Nestel *et al.*, 2002; López-Alvarenga *et al.*, 2010). En el caso de las lipoproteínas, los resultados son muy variados. Algunas intervenciones han observado aumentos importantes en las concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en sujetos con hipertrigliceridemia (Mori, 2004; Micallef y Garg, 2008). Sin embargo, otros autores han reportado que las HDL aumentan pero no de manera significativa en sujetos con hipertrigliceridemia y en sujetos diabéticos (Kelley *et al.*, 2007; Hartweg *et al.*, 2008), después de una intervención con aceite de pescado rico en ácidos grasos omega-3. Los efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre parámetros bioquímicos parecen ser dependientes de diversas variables como la dosis ingerida, el índice de masa corporal, el género, la edad y la actividad física. (Glauber *et al.*, 1988; Mostad *et al.*, 2006; Moertl *et al.*, 2011)

Estudios en roedores han observado que los ácidos grasos omega-3 tienen la capacidad de modificar la composición de la microbiota

intestinal. Además, se ha sugerido que los efectos de los omega-3 pudieran estar regulados por estos microorganismos (Caesar *et al.*, 2015; Kaliannan *et al.*, 2015).

### **3. MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON LA OBESIDAD Y LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3.**

#### **3.1 Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal de un individuo se refiere a la población de bacterias, hongos, arqueas, virus y protozoarios que habitan y colonizan la región intestinal (Sekirov *et al.*, 2010). El intestino humano es habitado por más de mil especies de bacterias, las cuales están representadas principalmente por cuatro filas: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria (Eckburg *et al.*, 2005), donde los dos primeros corresponden al 90% de la población bacteriana total.

La microbiota intestinal es considerada un "órgano funcional" debido a que lleva a cabo funciones importantes para el hospedero como: metabolismo de nutrimentos, protección contra patógenos y regulación de la integridad del intestino (Devillard *et al.*, 2007; Cani *et al.*, 2009; Takeuchi *et al.*, 2010).

#### **3.2 Microbiota intestinal y obesidad**

Se ha propuesto que la microbiota intestinal tiene un papel importante en el desarrollo de obesidad y sus complicaciones metabólicas. Estudios recientes han utilizado roedores con sistema digestivo estéril para estudiar la causalidad de la microbiota intestinal en el fenotipo de la obesidad. Estos roedores son llamados gnotobióticos (GF por las siglas

en inglés de *Germ free*). A continuación se enumeran los hallazgos más importantes de estos estudios.

1.- Los ratones GF alimentados con una dieta alta en grasa no desarrollan obesidad ni resistencia a la insulina, a diferencia de un ratón convencional que sí cuenta con microbiota intestinal y es alimentado con la misma dieta (Bäckhed *et al.*, 2007).

2.- Se observó un incremento significativo de grasa corporal y resistencia a la insulina en roedores GF inoculados con microbiota intestinal de roedores convencionales obesos (Turnbaugh *et al.*, 2006, 2008).

3.- Se realizó un trasplante de microbiota intestinal de gemelos discordantes (uno obeso y uno delgado) en roedores GF. Se observó que el roedor inoculado con la microbiota del gemelo obeso desarrolló mayor adiposidad y masa corporal que el roedor inoculado con la microbiota del gemelo delgado (Ridaura *et al.*, 2013).

Los primeros estudios que se realizaron en humanos, buscaron establecer diferencias entre la composición de la microbiota intestinal de sujetos delgados y sujetos obesos. Estos estudios observaron que los sujetos obesos presentaban una mayor proporción de Firmicutes y una menor proporción de Bacteroidetes en comparación con los sujetos delgados (Bervoets *et al.* 2013; Ley *et al.*, 2006) Sin embargo, estas diferencias no son observables en todos los estudios (Duncan *et al.*, 2008; Jumpertz *et al.*, 2011; Mejía-León *et al.*, 2014 ).

Se han propuesto diversos mecanismos que sugieren la participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y sus

complicaciones metabólicas. A continuación se describen brevemente algunos de estos mecanismos:

- **Incremento de la capacidad de absorción de energía de los alimentos.** La microbiota intestinal produce monosacáridos y AGCC a partir de los hidratos de carbono no digeribles por el hospedero. Estos nutrimentos representan una fuente extra de energía. Además, los AGCC son activadores de GPR41 y GPR43, las cuales son proteínas G asociadas con la producción de PPY. Esta hormona péptica disminuye la motilidad intestinal y en consecuencia, aumenta la absorción de nutrimentos (Erejuwa *et al.*, 2014).
- **Regulación del metabolismo de lípidos.** La microbiota intestinal inhibe la producción del factor adiposo inducido por ayuno (FIAF por sus siglas en inglés). La inhibición de FIAF incrementa la actividad de la lipoproteinlipasa, aumentando así, el almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos (Bäckhed *et al.*, 2007).
- **Endotoxemia metabólica.** El lipopolisacárido (LPS) es una molécula pro-inflamatoria presente en la membrana externa de bacterias Gram negativas (Manco *et al.*, 2010). El aumento de los niveles séricos de esta molécula está asociado con dietas altas en grasa tanto en humanos como en roedores (Amar *et al.*, 2008; Cani *et al.*, 2006). El LPS activa la cascada de inflamación a través de los receptores TLR4 de los macrófagos. Dicho proceso deteriora la función de las células  $\beta$ -pancreáticas, lo cual genera resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Cani *et al.*, 2006).

### **3.3 Efecto de la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal.**

La composición de la microbiota intestinal puede ser modificada por diversos factores tales como: el modo de nacimiento, lactancia, el uso de antibióticos y los componentes de la dieta (Jandhyala *et al.*, 2015).

La dieta es uno de los factores más estudiados que se asocian con la composición de la microbiota intestinal. A continuación se mencionan algunas de las conclusiones más importantes de dichos estudios:

- 1.** La microbiota intestinal humana responde rápidamente a cambios significativos en la dieta. David *et al.*, 2014 analizaron la composición de la microbiota intestinal de diez voluntarios a los cuales se les cambió la dieta durante tres periodos. El primer período consistió en cinco días con una dieta basada en alimentos de origen vegetal exclusivamente. Después, los participantes regresaron a sus dietas habituales durante cinco días. Finalmente los participantes iniciaron un periodo de cinco días con una dieta basada en alimentos de origen animal. Los resultados mostraron que la composición de la microbiota intestinal variaba considerablemente tras transcurrir 48 horas después de cada cambio de dieta.
- 2.** A pesar de estas variaciones dinámicas asociadas con cambios drásticos en la dieta, los hábitos alimenticios de los individuos son elementos dominantes en la determinación de la composición de la microbiota intestinal (Sonnenburg y Bäckhed 2016). Un estudio realizado por De Filippo *et al.*, 2010, analizó la composición de la microbiota intestinal de niños de dos poblaciones: una aldea

africana y una ciudad europea. La alimentación de la aldea africana se basa principalmente en el consumo de hidratos de carbono complejos mientras que la población europea tiene una dieta rica en proteínas de origen animal y grasas saturadas. Los hallazgos mostraron una mayor abundancia del género *Prevotella* y *Xylanobacter* en la población africana y una mayor proporción del género *Bacteroides* y la familia Enterobacteraceae en la población europea.

3. Un cambio particular en la dieta puede tener efectos variables entre individuos. Cotillard *et al.*, 2013 estudiaron el efecto de una dieta alta en fibra y reducida en energía sobre la diversidad de la microbiota intestinal. Para tal fin midieron el contenido de genes microbianos en muestras fecales antes y después de la intervención. Los resultados mostraron un aumento importante en la diversidad microbiana de los sujetos que comenzaron el estudio con valores más bajos en dicha variable. Por el contrario, los sujetos que empezaron con una mayor diversidad no mostraron cambios en la misma tras finalizar la intervención dietaria.

### **3.4 Microbiota intestinal y ácidos grasos omega-3**

Existen pocos estudios que evalúan el papel directo de los ácidos grasos omega-3 sobre la composición de la microbiota intestinal. Kaliannan *et al.*, evaluaron dos grupos de roedores con una dieta alta en omega-6: un grupo silvestre y un grupo de roedores transgénicos fat-1. Estos últimos expresan un gen que tiene la capacidad de producir ácidos grasos omega-3 a partir de ácidos grasos omega-6 (Kaliannan, et al 2015). A continuación se describen brevemente sus resultados.

- Los roedores silvestres presentaron mayores niveles de marcadores de inflamación y endotoxemia en comparación con los ratones fat-1.
- Las diferencias en estos marcadores se pierden tras eliminar la microbiota intestinal con una mezcla de antibióticos de alto espectro.
- Se observó una mayor abundancia de la familia Enterobacteraceae en el grupo silvestre. En el caso de los ratones fat-1, éstos presentaron una mayor abundancia del género *Bifidobacterium*.
- Al alimentar a los roedores silvestres con una dieta alta en omega-3, los marcadores de inflamación y endotoxemia, así como el perfil de la microbiota intestinal se asemejaron a los observados en los roedores fat-1.

Otro estudio realizado en roedores evaluó los efectos de una dieta alta en grasa saturada y otra alta en omega-3 sobre marcadores de inflamación del tejido adiposo (Caesar *et al.*, 2015). Este estudio observó mayores niveles de marcadores de inflamación en los roedores alimentados con grasa saturada. Al trasplantar la materia fecal de los roedores alimentados con omega-3 en roedores alimentados con grasa saturada, los resultados mostraron una reducción en los marcadores de inflamación y en la adiposidad; lo cual demostró el papel de la microbiota intestinal establecida por el consumo de ácidos grasos omega-3, en la regulación de la inflamación del tejido adiposo. Al analizar el perfil de la microbiota intestinal se reportó que el aceite de pescado rico en ácidos grasos omega-3 favorecía el crecimiento de *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Estas bacterias son consideradas antiinflamatorias debido a que están asociadas con la

regulación de la permeabilidad del intestino y/o a la producción de metabolitos que regulan el proceso de inflamación (Caesar *et al.*, 2015).

Estos estudios muestran que el consumo de ácidos grasos omega-3 puede modificar la composición de la microbiota intestinal y sugieren que la microbiota intestinal juega un papel en la regulación de los efectos que tienen los ácidos grasos omega-3 en el hospedero.

## **II JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**

La obesidad es un problema de salud pública tanto a nivel nacional como a nivel mundial, representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades como diabetes, enfermedad coronaria; así como algunos tipos de cáncer, entre otras. Diversos estudios han reportado que los ácidos grasos omega-3 tienen un impacto benéfico en el control de la obesidad, debido a que participan en la regulación del metabolismo de lípidos, glucosa y de los procesos de inflamación. Investigaciones recientes sugieren también que la composición de la microbiota intestinal muestra asociación con la obesidad y sus complicaciones metabólicas, y que ésta es regulada a su vez, por nutrimentos de la dieta como los ácidos grasos omega-3. Este trabajo busca evaluar si el consumo de ácidos grasos omega-3 modifica la composición de la microbiota intestinal de un grupo de adolescentes mexicanos con obesidad. Los resultados generarán conocimiento que apoye el desarrollo de nuevos estudios que contemplen a la microbiota intestinal como una variable importante en las intervenciones dietarias, para reducir las complicaciones metabólicas asociadas con la obesidad.

**III OBJETIVO:** Evaluar los cambios en el perfil de la microbiota intestinal en adolescentes obesos que recibieron un suplemento con ácidos grasos omega-3 durante 3 meses.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar las características bioquímicas y antropométricas de la población de estudio antes y después de la intervención.
- Determinar la composición de la microbiota intestinal de los participantes del estudio antes y después de la intervención.
- Analizar la asociación entre el cambio en las variables metabólicas y la composición de la microbiota intestinal.

## **IV MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Población de estudio**

El estudio se llevó a cabo en adolescentes obesos mexicanos con edades de entre 12 a 18 años. Para evaluar la presencia de obesidad se utilizaron los criterios de la CDC, 2010: percentil de IMC  $\geq 95$ . Se contó con el consentimiento informado firmado por los padres o tutores y el asentimiento de los menores de edad.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Alergia al pescado.
- Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.
- Tratamiento farmacológico de tipo antiinflamatorio.
- Enfermedades crónicas inflamatorias.
- Uso de antibióticos o consumo de probióticos durante el estudio o 3 meses previos al estudio.
- Enfermedades gastrointestinales durante el estudio.

## **4.2 Diseño del estudio**

El presente trabajo cuenta con las siguientes características: es un ensayo clínico controlado, longitudinal, aleatorizado y doble ciego. El estudio se dividió en dos etapas: la fase de intervención y la fase experimental. La intervención dietaria se diseñó y realizó por personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición en el Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund" del Centro Médico Nacional Siglo XXI. La realización de la fase experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad Periférica de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud de la Facultad de Química en el Instituto Nacional de Medicina Genómica.

### **4.2.1 Antropometría**

Las variables antropométricas fueron medidas por personal capacitado del Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund" del Centro Médico Nacional Siglo XXI. La talla, el peso corporal, la circunferencia de cintura y de cadera fueron medidos según los protocolos de Lohman, 1986 con equipos estandarizados con las normas internacionales de calidad.

### **4.2.2 Parámetros bioquímicos**

A los participantes se les tomó una muestra de sangre periférica en ayuno de 12 horas. Esta muestra fue almacenada en un tubo con un gel separador para determinar sus parámetros bioquímicos en suero. Los parámetros medidos fueron: niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, C-HDL, C-LDL, VLDL y de transaminasas hepáticas ALT, AST y GGT. Las determinaciones se realizaron en el laboratorio clínico del

Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund" del Centro Médico Nacional Siglo XXI de acuerdo con los protocolos internacionales.

#### **4.2.3 Muestra de materia fecal**

A los participantes se les proporcionó un kit de recolección que contenía un recipiente y un abatelenguas de plástico estériles, una bolsa de plástico, etiquetas de identificación y una bolsa tipo *ziploc* con un instructivo. Se evitó el contacto de la materia fecal con el agua del inodoro por medio de la bolsa de plástico. Posteriormente el participante tomó una muestra del tamaño de una nuez con el abatelenguas y se colocó en el recipiente. Esta muestra fue tomada y refrigerada con un día de anticipación a su cita con el personal de salud. Las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para extraer el ADN bacteriano posteriormente.

La toma de muestra de sangre, de materia fecal y la antropometría, se realizó al inicio del estudio (tiempo basal) y después de tres meses de suplementación (tiempo final).

#### **4.3 INTERVENCIÓN DIETARIA**

Los pacientes se distribuyeron en dos grupos de manera aleatoria utilizando el programa de *Mahmood Aaghaui Rbdom Allocation (software for parallel group randomized trials, BMC Medical Research Methodology 2004)*. El primer grupo fue suplementado con 1.2 g/día de aceite de pescado encapsulado de la marca Merck (compuesto principalmente por los ácidos grasos omega-3 EPA y DHA). El segundo grupo recibió el placebo que consta de 1.0 g/día de aceite de girasol. Ambos grupos consumieron dos cápsulas diarias de su respectivo

tratamiento durante tres meses. Para controlar el consumo del suplemento se citó a los participantes en días aleatorios para llevar a cabo un conteo de cápsulas.

Para controlar la cantidad de ácidos grasos omega-3 ingeridos se pidió a los participantes no incluir algún otro suplemento que pudiera ser una fuente adicional de ácidos grasos poliinsaturados, además se les proporcionó una lista de alimentos con alto contenido de ácidos grasos omega-3 que debían evitar. Una vez transcurridos los tres meses de intervención se volvió a citar a los participantes para realizarles antropometría y tomar una segunda muestra de sangre periférica y de materia fecal.

#### **4.3.1 Composición del suplemento**

El suplemento de ácidos grasos omega-3 es un producto comercial de nombre Pulse 600 de la marca Merk. La dosis diaria de EPA y DHA fue de 400 mg y 200 mg respectivamente. A continuación se muestra la información nutrimental del suplemento (Tabla 2).

**Tabla 2.- Composición del suplemento de ácidos grasos omega-3.**

Nutrimento	mg/cápsula
Grasas totales de las cuales:	1000
Grasa saturada	150.0
Grasas poliinsaturadas de las cuales:	800.0
Ácido eicosapentaenoico	400.0
Ácido docosohexaenoico	200.0
Grasa monoinsaturada	50.0
Colesterol	0.24
Proteínas	250
Hidratos de carbono	0.0
Sodio	0.0

#### **4.4 Extracción de ADN bacteriano.**

La extracción de ADN bacteriano se llevó a cabo con el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit de QIAGEN®. A continuación se describe brevemente la metodología. Las muestras se mantuvieron en hielo seco para evitar favorecer el crecimiento de algunas bacterias resistentes a bajas temperaturas. Se tomó un fragmento de muestra de 0.18g a 0.23g, y se colocó en un microtubo. Se le agregaron 200 µL de amortiguador InhibitEX que contiene detergentes que lisan las membranas celulares y se agitó vigorosamente hasta homogeneizar totalmente la muestra. Posteriormente, se incubó a 95°C por 5 minutos para lisar las paredes celulares de las bacterias Gram negativas.

A continuación se centrifugó y se tomó el sobrenadante para añadir 15 µL de proteinasa K y 200 µL de amortiguador AL. Después se incubó la mezcla a 70°C durante 10 minutos para eliminar la mayor cantidad de

proteína posible. Una vez terminada la incubación, se añadieron 200  $\mu$ L de etanol grado biología molecular para precipitar el ADN, se agitó para homogenizar y se colocó en un tubo que contiene una columna de sílica para separar el ADN. A continuación se centrifugó a 13000 rpm, y se conservó la columna de sílica. Después se realizaron dos lavados con los amortiguadores AW1 Y AW2 para eliminar impurezas. Finalmente se agregaron 200  $\mu$ L de amortiguador ATE que atrapa el ADN de la columna de sílica, quedando esta vez en el filtrado. El ADN extraído se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

#### **4.4.1 Calidad e integridad del ADN**

Para determinar la concentración de ADN extraído y su calidad, se utilizó un análisis espectrofotométrico a 280 nm para evaluar posible contaminación por proteína, y a 230 nm, para contaminantes de naturaleza fenólica. Para tal fin se utilizó un equipo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific®. La integridad del ADN se analizó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris-HCL 0.9 M, pH=7, ácido acético,  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2mM). El fluoróforo utilizado fue EvaGREEN® de la marca Jena Bioscience®, así como el marcador de peso molecular de 100 pb. Para revelar el gel se utilizó el fotodocumentador Universal Hood III de Bio-Rad Laboratories®.

#### **4.5 Amplificación del gen 16s.**

Para amplificar el gen 16s se realizó una PCR de punto final en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Para la reacción se utilizaron los reactivos Platinum® PCR SuperMix High Fidelity de Invitrogen. El Master Mix contiene DNA polimerasa; Tris- $\text{SO}_4$

66 mM pH= 8.9; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 19.8 mM; MgSO<sub>4</sub> 2.4 mM y 220 µL de DNTPs.

El objetivo de esta primera reacción de PCR fue amplificar un fragmento del gen 16s que abarca las regiones hipervariables V3-V9, y la adición de un código de barras a cada muestra para posteriormente identificar su procedencia. Estos códigos de barras se diseñaron en el oligonucleótido Forward (F), por lo que contamos con 2 oligos F diferentes para cada individuo, uno para el tiempo basal y otro para el tiempo final. Tabla 3 (ANEXO). La composición de cada reacción se muestra en la Tabla 4. Las condiciones para la reacción de PCR se encuentran en la tabla 5. La etapa de alineamiento se realizó en 25 ciclos en la primer PCR y en 5 ciclos en la segunda PCR.

**Tabla 4.- Componentes de la reacción de PCR**

Master Mix	22.5 µL
Oligonucleótido <i>Forward</i> [10 µM]	0.5 µL
Oligonucleótido <i>Reverse</i> [10 µM]	0.5 µL
ADN [ 50 ng/µL]	2.0 µL

**Tabla 5.- Condiciones de la reacción de PCR**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización	94	3:30
Alineamiento	56	0:30
Elongación	68	6:30

Para determinar la integridad y el tamaño del fragmento se realizó una electroforesis con las condiciones descritas anteriormente. Los amplicones fueron purificados con perlas magnéticas de la marca AMPure XP de Beckman Coulter®. Estas perlas magnéticas fijaron el ADN el cual pasó por diferentes fases de lavado. A continuación se midió la concentración de ADN por análisis fluorométrico en QUBIT® para conocer la concentración de amplicón de cada muestra. Después se preparó una mezcla equimolar que incluyó todas las muestras para realizar una segunda PCR.

La segunda PCR tuvo como objetivo agregar a los amplicones un adaptador necesario para la PCR en emulsión de la pirosecuenciación. Al igual que la primer PCR, se verificó la integridad y el tamaño de los amplicones contenidos en la mezcla en un gel de agarosa, se purificó dicha mezcla y se midió su concentración por QUBIT® para realizar una dilución la cual fue secuenciada en el equipo 454® de Roche. A continuación se describe el fundamento de la técnica de pirosecuenciación y su utilidad en el estudio del gen 16s ribosomal.

#### **4.6 Secuenciación masiva para el estudio del gen 16s del ARNr**

Se utilizó el gen 16s ribosomal como marcador genético para la clasificación taxonómica de la microbiota intestinal. Dicho marcador cuenta con las siguientes características (Rajendhran y Gunasekaran 2011):

- 1.- Es una molécula antigua y se encuentra presente en todas las bacterias que se conocen en la actualidad. Por tal motivo se considera un blanco universal para el estudio de bacterias.

2.- La estructura y la función del gen 16s ribosomal ha cambiado poco con el tiempo, por lo que es posible determinar qué tan cercano o alejado está un microorganismo de otro en un árbol filogenético.

3.- A pesar de que la estructura de su secuencia ha sido relativamente constante, cuenta con las suficientes variaciones para poder diferenciar un individuo de otro (regiones hipervariables).

4.- Debido al gran número de estudios que utilizan al gen 16s ribosomal, se cuenta con numerosas bases de datos que se complementan y actualizan día con día.



**Regiones conservadas.-** aplicaciones inespecíficas.

**Regiones hipervariables.-** aplicaciones de identificación taxonómica

**Figura 5.- Estructura del gen 16s ribosomal. Tomado de "Alimetrics DNA sequence analysis".** El gen 16s es un gen conservado que cuenta con regiones hipervariables que permiten clasificar filogenéticamente a los microorganismos.

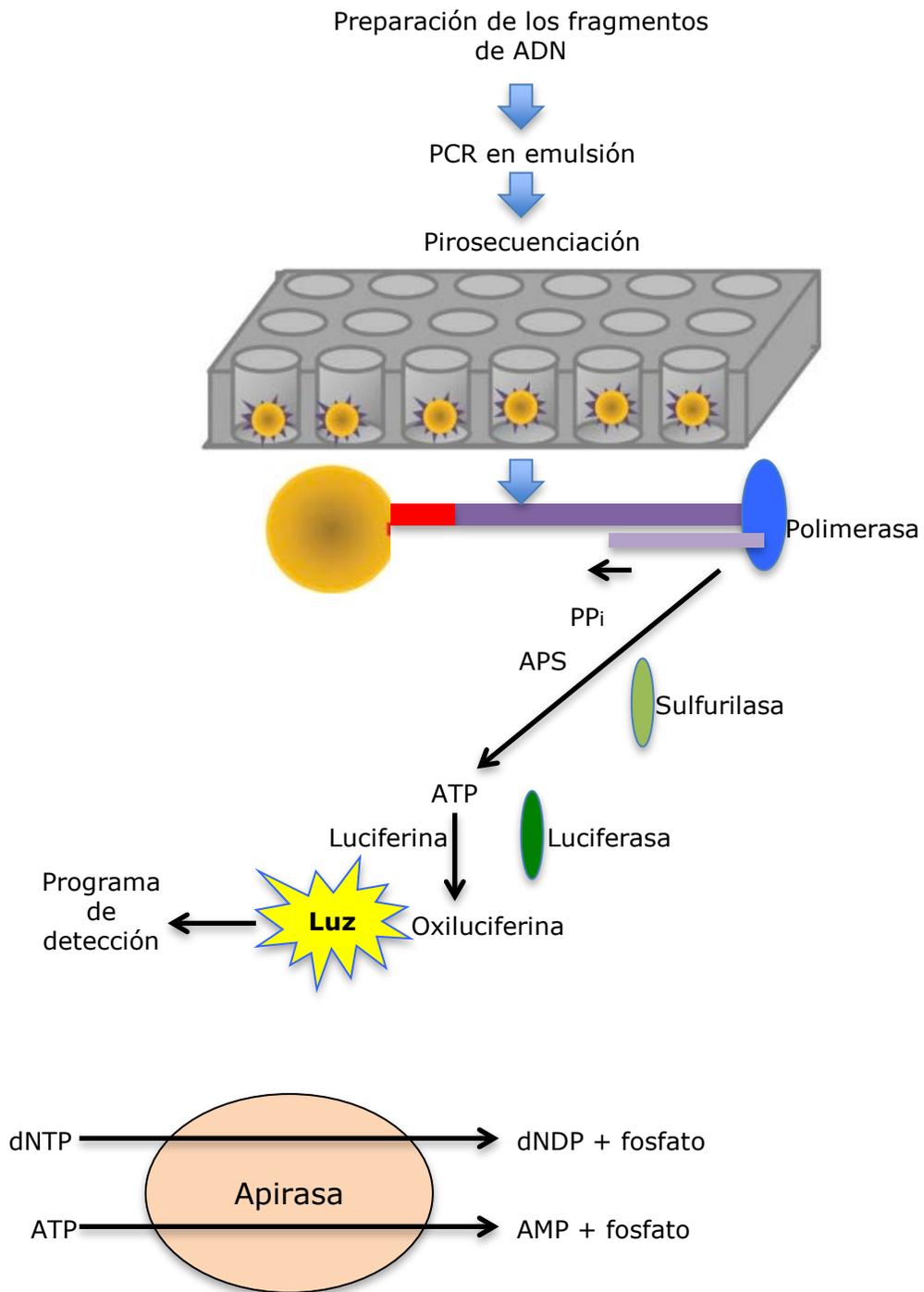
#### 4.6.1 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación masiva que utiliza la síntesis de ADN mediante una PCR y la generación de luz después de incorporar los nucleótidos a la nueva cadena de ADN. De acuerdo con Siqueira *et al.*, 2012 la pirosecuenciación en general se puede dividir en tres etapas:

1.-Unión de adaptadores. La cadena de ADN a secuenciar es fragmentada, ligada a dos adaptadores y separada en hebras sencillas. Uno de los adaptadores es para anclar la cadena molde a una piconesfera que contiene oligonucleótidos complementarios a dicho adaptador. El segundo es complementario a los cebadores utilizados en la PCR.

2.- Clonación mediante PCR en emulsión. Las piconesferas son solubles en agua, se colocan en una emulsión y se agita vigorosamente. Este proceso genera miles de gotitas de agua, las cuales contienen los compuestos necesarios para llevar a cabo una clonación por PCR dentro de ellas. Mediante el método de dilución límite se calcula la cantidad de piconesferas necesarias para que cada gotita de agua contenga una sola piconesfera con ADN anclado. A continuación el fragmento de ADN es clonado dentro de la fase acuosa, generando múltiples copias de éste.

3.- Secuenciación por síntesis. Una vez terminada la amplificación clonal por PCR se rompe la emulsión y las microesferas son colocadas en una placa con picopozos capaces de contener una sola piconesfera a la vez. A continuación se lleva a cabo la síntesis de nuevas cadenas de ADN a partir de las cadenas clonadas en la piconesfera. Cada vez que un nucleótido es añadido a la cadena nueva se libera un pirofosfato que desencadena una serie de reacciones de quimioluminiscencia, que puede ser medida mediante detección luminométrica.



**Figura 6.- Fundamento de la técnica de pirosecuenciación 454. Adaptado de (Siqueira *et al.*, 2012)**

#### **4.7 Análisis bioinformático**

Para la determinación taxonómica de la microbiota intestinal se utilizó el software Qiime (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). El primer paso fue eliminar las secuencias de mala calidad y posibles errores. Después se buscaron los “códigos de barra” para asignar las secuencias que corresponden a cada muestra. Posteriormente, las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas operacionales (OTUs). A continuación se identificaron las secuencias obtenidas comparándolas con las de la base de datos GreenGenes. Los OTUs se asignaron con el 97% de similitud con la secuencia de referencia. Aquellas secuencias que compartieron menos de 50% de similitud se consideraron como desconocidas.

#### **4.8 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó en software SPSS V 15.0 (SPSS Chicago, IL, USA). Debido al bajo número de muestras se realizaron pruebas no paramétricas en todos los análisis. Para comparar los valores basales de los parámetros bioquímicos y la microbiota intestinal del grupo suplementado con placebo con los del grupo suplementado con ácidos grasos omega-3, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. En el caso de las comparaciones de los valores basales con los valores finales de las variables estudiadas se realizó una comparación de dos muestras relacionadas mediante la prueba W de Wilcoxon. En todas las pruebas el valor  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **V.- RESULTADOS**

En este estudio se evaluó si el consumo diario de un suplemento de ácidos grasos omega-3 (1.2 g/día) modifica la composición de la microbiota intestinal de adolescentes obesos y si dichas modificaciones se asocian con cambios en los parámetros bioquímicos de los participantes. Se utilizaron muestras fecales basales y finales de 16 adolescentes que terminaron un estudio de suplementación con ácidos grasos omega-3 realizado por el personal del Hospital de Pediatría del Centro Médico del IMSS (8 recibieron placebo y 8 el suplemento de ácidos grasos omega-3).

### **Características de la población al inicio del estudio**

En la tabla 6 se encuentran los valores de las variables demográficas, bioquímicas y antropométricas del grupo con placebo y del grupo con omega-3, antes de la suplementación. No se encontraron diferencias significativas entre los valores basales de dichas variables, excepto en los niveles de ALT en suero, los cuales fueron mayores en el grupo con omega-3.

**Tabla 6.- Características antropométricas y bioquímicas al inicio de la suplementación**

	Placebo	Omega-3	<i>p</i>
	Basal	Basal	
Mujeres (%)	75	75	
Edad	13 (13.00-17.25)	12 (11.25-13.75)	0.095
Peso (kg)	78.20 (68.68-91.73)	74.60 (70.13-81.13)	0.529
Talla (m)	1.61 (1.57-1.64)	1.56 (1.53-1.60)	0.113
Percentil IMC	97.50 (96.25-98.00)	98.00 (98.00-98.75)	0.063
Percentil Presión Sistólica	31.70 (6.20-63.93)	53.60 (23.68-93.63)	0.294
Percentil Presión Diastólica	65.00 (46.23-80.23)	78.25 (71.15-95.03)	0.083
Glucosa (mg/dL)	94.19 (86.95-98.13)	88.55 (81.91-90.72)	0.074
Triglicéridos (mg/dL)	121.54 (87.51-196.85)	185.76 (107.03-234.94)	0.141
VLDL (mg/dL)	28.70 (17.70-39.30)	37.16 (21.40-46.99)	0.294
Colesterol (mg/dL)	165.38 (144.80-173.80)	169.31 (153.37-184.03)	0.529
HDL (mg/dL)	45.36 (37.79-53.50)	42.57 (41.46-43.94)	0.674
LDL (mg/dL)	85.38 (76.44-100.24)	85.76 (83.56-97.72)	0.674
ALT UI/L	26.32 (22.37-32.21)	40.55 (32.83-59.33)	<b>0.036</b>
AST UI/L	33.03 (28.55-43.55)	30.68 (26.60-42.07)	0.674
GGT UI/L	15.53 (13.28-19.24)	18.63 (16.29-25.55)	0.115

Tabla 6.- Los datos se muestran en medianas y rangos intercuartiles. Los datos fueron ajustados por percentil de IMC. La comparación se realizó mediante una U de Mann-Whitney para muestras independientes ( $p < 0.05$ ).

## **Cambios en las variables metabólicas**

En la Tabla 7 se presentan las determinaciones metabólicas del grupo con placebo y del grupo con omega-3, antes y después de las intervenciones. En el grupo con placebo, se observó una disminución significativa en los niveles de glucosa y colesterol después de la intervención ( $p < 0.05$ ). En cuanto al grupo con el suplemento de ácidos grasos omega-3, sólo se observó disminución significativa en los niveles séricos de ALT después de la intervención ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 7.- Características antropométricas y bioquímicas al inicio y al final de estudio.**

Variable	Placebo n=8		<i>p</i>	Omega-3 n=8		<i>p</i>
	Basal	Final		Basal	Final	
Percentil Presión Sistólica	31.70 (6.20-63.93)	24.75 (16.10-69.63)	0.866	53.60 (23.68-93.63)	58.80 (24.15-69.08)	0.779
Percentil Presión Diastólica	65.00 (46.23-80.23)	70.80 (44.40-86.08)	0.866	78.25 (71.15-95.03)	73.35 (68.50-92.23)	0.327
Glucosa (mg/dL)	94.19 (86.95-98.13)	82.45 (76.08-86.50)	<b>0.012</b>	88.55 (81.91-90.72)	79.79 (77.00-85.33)	0.123
Triglicéridos (mg/dL)	121.54 (87.51-196.85)	97.28 (72.07-153.67)	0.208	185.76 (107.03-234.94)	155.11 (116.83-170.87)	0.093
VLDL (mg/dL)	28.70 (17.70-39.30)	19.46 (14.41-30.73)	0.123	37.16 (21.40-46.99)	31.42 (27.54-37.52)	0.161
Colesterol (mg/dL)	165.38 (144.80-173.80)	146.72 (140.26-152.10)	<b>0.017</b>	169.31 (153.37-184.03)	164.59 (147.98-183.75)	0.161
HDL (mg/dL)	45.36 (37.79-53.50)	41.59 (33.78-52.61)	0.674	42.57 (41.46-43.94)	43.68 (39.89-44.91)	0.484
LDL (mg/dL)	85.38 (76.44-100.24)	77.80 (70.59-89.33)	0.575	85.76 (83.56-97.72)	97.13 (83.56-97.72)	0.484
ALT UI/L	26.32 (22.37-32.21)	27.51 (10.21-46.08)	0.575	40.55 (32.83-59.33)	25.96 (14.46-37.26)	<b>0.012</b>
AST UI/L	33.03 (28.55-43.55)	28.30 (16.72-47.17)	0.327	30.68 (26.60-42.07)	23.62 (19.94-34.68)	0.263
GGT UI/L	15.53 (13.28-19.24)	20.55 (15.91-28.25)	<b>0.050</b>	18.63 (16.29-25.55)	20.85 (16.63-23.47)	0.674

Tabla 7.- Los datos se muestran en medianas y rangos intercuartiles. Los datos fueron ajustados por percentil de IMC. La comparación se realizó mediante una W de Wilcoxon para muestras relacionadas ( $p < 0.05$ ).

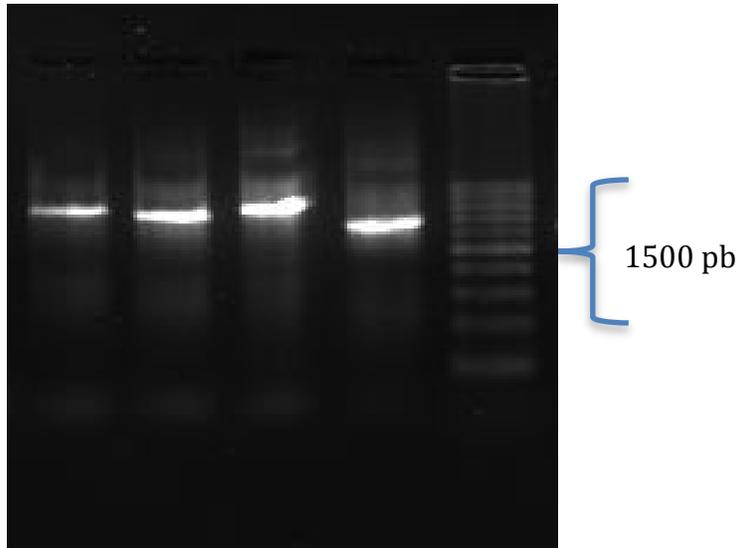
## **Resultados de la pirosecuenciación**

En la Figura 7 se presentan los productos de la amplificación por PCR de las regiones hipervariables V3 a V9 del gen 16s ribosomal. Como se esperaba, los tamaños de los amplicones fueron cercanos a 1500 pb. Al evaluar la calidad de dichos amplicones por espectrofotometría se corroboró que éstos cubrían los requerimientos para proceder con la pirosecuenciación.

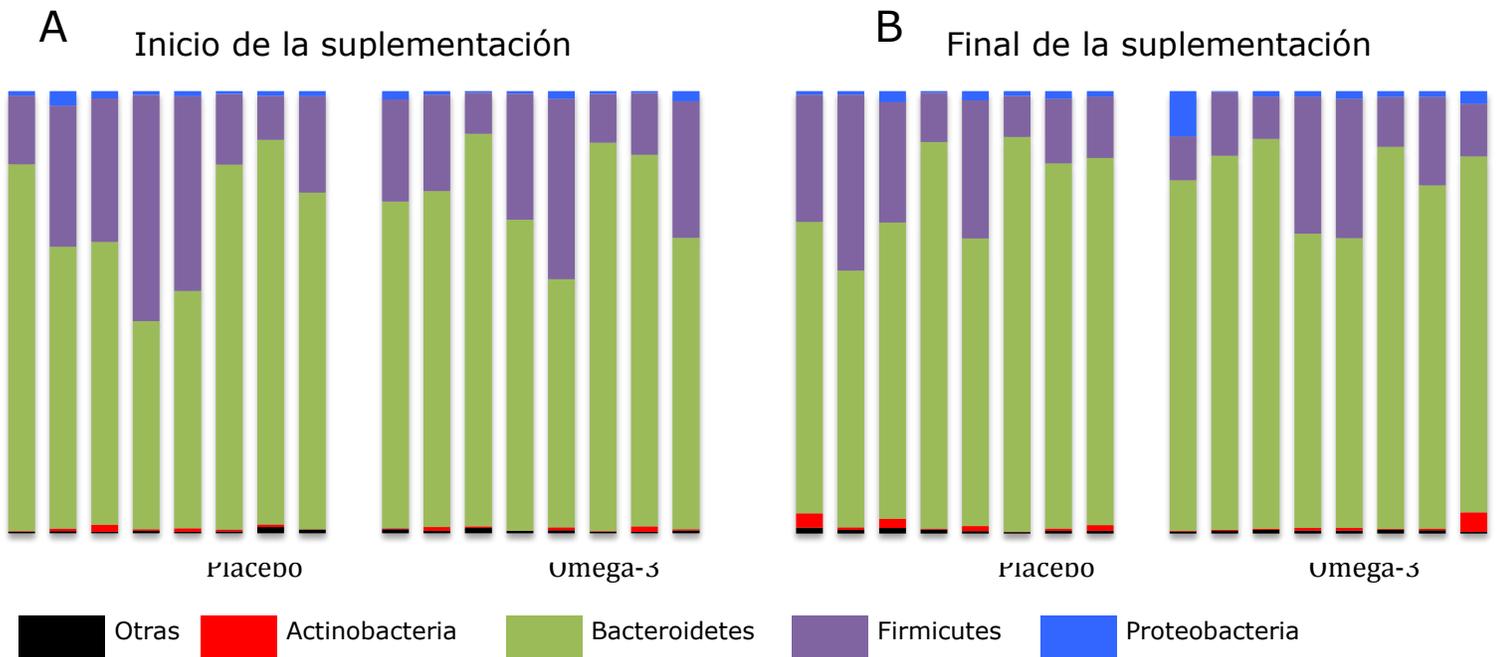
## **Composición de la microbiota intestinal a nivel de fila**

El análisis taxonómico de la microbiota intestinal mostró que los fila con mayor abundancia relativa en ambos grupos al inicio del estudio, fueron Bacteroidetes y los Firmicutes. Las Proteobacterias y las Actinobacterias presentaron valores menores de abundancia relativa (figura 8). Los valores de abundancia relativa no mostraron diferencias significativas al comparar el grupo con omega-3 y el grupo con placebo, antes de comenzar la intervención (tabla 8).

Los Bacteroidetes y los Firmicutes continuaron siendo los fila más abundantes tanto en el grupo con omega-3, como en el grupo con placebo, después de la intervención (figura 8). La composición de la microbiota intestinal a nivel de fila no presentó diferencias significativas tras finalizar el estudio, tanto en el grupo con omega-3 como en el grupo con placebo (tabla 8).



**Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos por PCR.**



**Figura 8 .-** Abundancia relativa de los principales fila al inicio y al final de la suplementación. **A** Valores basales **B** Valores después de 3 meses de suplementación.

**Tabla 8.- Abundancia relativa de los fila al inicio y al final de la suplementación.**

Variable	Placebo n=8			Omega-3 n=8			p*
	Basal	Final	p	Basal	Final	p	
Actinobacteria	0.57	1.14	0.833	0.46	0.82	0.362	0.345
Bacteroidetes	69.54	74.79	0.327	75.40	78.63	0.779	0.294
Firmicutes	27.73	21.98	0.327	22.43	17.44	0.674	0.248
Proteobacteria	1.38	1.35	0.575	1.10	2.53	0.674	0.328

**Tabla8 .-** Abundancia relativa de los principales fila al inicio y al final de la suplementación. La comparación se realizó mediante una W de Wilcoxon para muestras relacionadas ( $p < 0.05$ ).  $p^*$  = la comparación entre tiempo basal del grupo con placebo y el grupo suplementado con omega-3. Esta prueba se realizó mediante una U de Mann-Whitney para muestras independientes ( $p < 0.05$ ).

### **Composición de la microbiota intestinal a nivel de género.**

En la Tabla 9 se observan los valores de abundancia relativa de los géneros más representativos de los fila analizados anteriormente. No se observaron diferencias significativas entre los valores del grupo con omega-3 y los del grupo con placebo, al inicio de la suplementación.

Después de la intervención, tampoco se observaron cambios significativos en los valores de abundancia relativa a nivel de género tanto en el grupo con omega-3 como en el grupo con placebo. (Tabla 9).

**Tabla 9. Abundancia relativa de los géneros identificados en el grupo con placebo y el grupo con omega-3 antes y después de la intervención.**

Género	Grupo Placebo n=8		<i>p</i>	Grupo Omega-3 n=8		<i>p</i>	<i>p</i> *
	Basal	Final		Basal	Final		
Bifidobacterium	0.0038 (0.0013-0.0060)	0.0027 (0.0008-0.0069)	0.889	0.0081 (0.0026-0.0177)	0.0020 (0.0010-0.0050)	0.327	0.294
Bacteroides	0.2867 (0.0953-0.5257)	0.1688 (0.1006-0.5479)	0.401	0.2403 (0.1594-0.4441)	0.3006 (0.0904-0.5592)	0.401	0.834
Prevotella	0.1827 (0.0106-0.6616)	0.4916 (0.0095-0.6937)	0.484	0.3965 (0.0563-0.6279)	0.4961 (0.0086-0.6407)	0.889	0.674
Faecalibacterium	0.0728 (0.0391-0.1278)	0.0596 (0.0287-0.1000)	0.263	0.0614 (0.0535-0.0753)	0.0687 (0.0300-0.1568)	0.575	0.462
Ruminococcus	0.0325 (0.0158-0.0425)	0.0188 (0.0079-0.0417)	0.263	0.0171 (0.0064-0.0326)	0.0102 (0.0020-0.0013)	0.208	0.294
Suterella	0.0028 (0.0018-0.0045)	0.0027 (0.0016-0.0044)	0.889	0.0027 (0.0013-0.0123)	0.0057 (0.0042-0.0085)	0.484	0.756
Enterobacteraceae	0.0025 (0.0014-0.0076)	0.0009 (0.0005-0.0023)	0.327	0.0019 (0.0004-0.0051)	0.0013 (0.0006-0.0145)	0.327	0.345
Haemophilus	0.0003 (0.0001-0.0014)	0.0001 (0.00001-0.0015)	0.484	0.0004 (0.0002-0.0011)	0.0001 (0.0001-0.0015)	0.093	0.875
Bilophila	0.0019 (0.0010-0.0027)	0.0009 (0.0001-0.0018)	0.263	0.0010 (0.0006-0.0015)	0.0010 (0.0006-0.0014)	0.674	0.172

Tabla 9.- Abundancia relativa de los principales géneros identificados por pirosecuenciación al inicio y al final de la suplementación del grupo placebo y el grupo omega-3. Los datos se expresan en mediana y valores intercuartiles.. La comparación del tiempo basal vs el tiempo final se realizó mediante una W de Wilcoxon para muestras relacionadas.  $p < 0.05$ .  $p^* =$  la comparación entre tiempo basal del grupo con placebo y el grupo suplementado con omega-3. Esta prueba se realizó mediante una U de Mann-Whitney para muestras independientes ( $p < 0.05$ ).

## VI.- DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que los ácidos grasos omega-3 pueden ser utilizados en el control de complicaciones metabólicas relacionadas con la obesidad. Se ha reportado que tienen la capacidad de regular la presión arterial, el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de lípidos (Jacobson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016; Leslie *et al.*, 2015), y que pueden mejorar marcadores de daño hepático como las ALT, AST y GGT (Wu *et al.*, 2012; Janczyk *et al.*, 2013).

Estudios en adolescentes obesos han reportado una disminución significativa en los niveles de glucosa y triglicéridos después de tres meses de suplementación con ácidos grasos omega-3 en dosis de 1.2 a 1.8 g/día (Dangardt *et al.*, 2012; Juárez-López *et al.*, 2013). En nuestro estudio, los sujetos suplementados con omega-3 no presentaron cambios significativos en los niveles séricos de lípidos y glucosa. Es probable que el tamaño tan limitado de la muestra no permita ver cambios significativos en estas variables. Sin embargo, sí se observó una tendencia a disminuir los niveles de triglicéridos ( $p=0.093$ ) en el grupo que consumió el suplemento de ácidos grasos omega-3, por lo tanto, será necesario ampliar el tamaño de muestra para determinar si esta tendencia alcanza significancia.

En los niveles séricos de ALT se observó una disminución significativa en el grupo que consumió el suplemento de ácidos grasos omega-3. Diversos estudios han presentado que los ácidos grasos omega-3 reducen marcadores de daño hepático incluyendo los niveles de ALT, tanto en adultos como en niños y adolescentes (Di Minno *et al.* 2012; Janczyk *et al.*, 2013; Zelber-Sagi *et al.* 2007). Se ha propuesto que este efecto se debe a que los ácidos grasos omega-3 reducen los niveles de

moléculas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , así como la expresión de genes asociados con la lipotoxicidad como SREBP (Howell et al. 2009; Spadaro et al. 2008).

En el grupo con placebo se observó un aumento significativo en los niveles de GGT. Es probable que estos cambios estén asociados con variaciones en la dieta o en la actividad física de los participantes (Ferolla et al., 2015; Pour et al., 2014).

Al analizar la composición taxonómica de la microbiota intestinal, se encontró que el filo con mayor abundancia relativa tanto al inicio como al final del estudio fue el de Bacteroidetes seguido por el de Firmicutes. Entre estos dos fila representaron más de 95% de las bacterias intestinales, tal como se ha reportado en trabajos previos sobre la microbiota intestinal humana (Tremaroli y Bäckhed 2012). Los estudios pioneros sobre microbiota intestinal y su relación con la obesidad, reportaron que los Firmicutes se encontraban en mayor proporción en sujetos obesos en comparación con sujetos delgados (Bervoets et al. 2013; Ley et al., 2006). No obstante, estudios realizados en niños y adolescentes mexicanos, han observado una mayor abundancia relativa de Bacteroidetes, tanto en sujetos delgados sanos como en sujetos obesos, e incluso en sujetos con diabetes tipo 1 (Mejía-León et al., 2014; Ramírez, 2014).

Trabajos en roedores han observado que el consumo de ácidos grasos omega-3 aumenta la presencia de bacterias protectoras contra la inflamación como *Bifidobacterium*, *Akkermansia* y el cluster IV y XIVa de *Clostridium* (Caesar et al., 2015; Kaliannan et al., 2015). Estos últimos están compuestos por bacterias asociadas con la producción de butirato. En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en la

composición de la microbiota intestinal, después de tres meses de suplementación. Aun cuando el número reducido de sujetos estudiados podría explicar estos resultados, no se puede excluir el efecto de la dieta de los participantes, como un factor determinante de la composición de la microbiota (Sonnenburg y Bäckhed 2016). Aunque en este estudio se les indicó que no modificaran su dieta durante el estudio.

Los efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre el metabolismo aún no son del todo claros, ya que se han observado reacciones antagonistas entre distintas poblaciones (Muley *et al.*, 2014), sugiriendo que el papel de la genética también condiciona los efectos de dichos ácidos grasos. El estudio de la interacción entre los componentes de la dieta y la microbiota intestinal, proporciona datos nuevos para el entendimiento de la obesidad y sus complicaciones metabólicas. Es importante contemplar que la obesidad y sus complicaciones metabólicas representan entidades complejas, por lo que las estrategias planeadas para su control deben integrar el papel de los factores genéticos, dietarios, fisiológicos; así como los relacionados con la microbiota intestinal.

## **VII.- CONCLUSIONES**

Los participantes que consumieron el suplemento de ácidos grasos omega-3 mostraron una reducción significativa en los niveles de ALT séricos tras completar el estudio. Debido a que no se encontraron diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal asociadas con la suplementación, es probable que la reducción en los niveles de ALT se deban a los efectos antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3.

Si bien el tamaño de la muestra fue la mayor limitante de nuestro trabajo, este estudio nos permitió estandarizar los protocolos experimentales utilizados en la extracción de ADN y en la pirosecuenciación para ser utilizados en futuros proyectos del laboratorio. De igual manera, nos permitió establecer tanto las variables a controlar como las variables de respuesta para diseñar una intervención dietaria que pueda implementarse en las instalaciones del laboratorio.

El uso de las intervenciones dietarias que tienen como blanco a la microbiota intestinal es una estrategia emergente para el control y prevención de la obesidad y sus complicaciones metabólicas. El interés principal de nuestro estudio fue conocer si el consumo de ácidos grasos omega-3 modifica la composición de la microbiota intestinal en una población de adolescentes con obesidad. El análisis de la microbiota fue nuestra herramienta para contestar dicha pregunta; sin embargo, no responde qué interacciones existen entre el hospedero y las bacterias intestinales. El estudio funcional del microbioma intestinal en humanos mediante metagenómica y metatranscriptómica ayudará a un mejor conocimiento de cómo los microorganismos intestinales interactúan con los nutrientes de nuestra dieta, el metabolismo y la genética.

## **VIII.- PERSPECTIVAS**

Como complemento para este estudio sería interesante analizar marcadores de inflamación como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS etc., para tener una mejor comprensión sobre el impacto de los ácidos grasos omega-3 en la inflamación de bajo grado característica de la obesidad, y analizar la posible asociación con el perfil de la microbiota intestinal.

Otro factor importante para una intervención es el control de la mayor cantidad de variables posibles como la dieta y la actividad física. Toda vez que ambos factores influyen directamente en la composición de la microbiota intestinal. La inclusión de información de los diarios de alimentación ayudará a ajustar los datos por consumo de macronutrientes y a evaluar si los resultados obtenidos están siendo influenciados por alguno de ellos.

La microbiota intestinal es un factor que está cobrando mucha relevancia debido a que cada vez se encuentran más asociaciones con diferentes enfermedades complejas como el cáncer, la diabetes, la obesidad y enfermedades autoinmunes. Por tal motivo, el uso de técnicas más finas de secuenciación masiva se ha convertido en el estándar de oro para su estudio; así como las llamadas ciencias "ómicas" que tratan de explicar el universo huésped-hospedero de manera integrada.

## IX.- BIBLIOGRAFÍA

1. Amar Jacques, Rémy Burcelin, Jean Bernard Ruidavets, Patrice D. Cani, Josette Fauvel, Marie Christine Alessi, Bernard Chamontin, y Jean Ferrières. 2008. "Energy Intake Is Associated with Endotoxemia in Apparently Healthy Men". *The American Journal of Clinical Nutrition* 87 (5): 1219–23.
2. Bäckhed Fredrik, Jill K. Manchester, Clay F. Semenkovich, y Jeffrey I. Gordon. 2007. "Mechanisms Underlying the Resistance to Diet-Induced Obesity in Germ-Free Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (3): 979–84. doi:10.1073/pnas.0605374104.
3. Bays, Harold E., Ann P. Tighe, Richard Sadovsky, y Michael H. Davidson. 2008a. "Prescription Omega-3 Fatty Acids and Their Lipid Effects: Physiologic Mechanisms of Action and Clinical Implications". *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 6 (3): 391–409. doi:10.1586/14779072.6.3.391.
4. Bays Harold E., J. Michael González-Campoy, George A. Bray, Abbas E. Kitabchi, Donald A. Bergman, Alan Bruce Schorr, Helena W. Rodbard, y Robert R. Henry. 2008b. "Pathogenic Potential of Adipose Tissue and Metabolic Consequences of Adipocyte Hypertrophy and Increased Visceral Adiposity". *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 6 (3): 343–68. doi:10.1586/14779072.6.3.343.
5. Bell Christopher G., Andrew J. Walley, y Philippe Froguel. 2005. «The Genetics of Human Obesity». *Nature Reviews. Genetics* 6 (3): 221–34. doi:10.1038/nrg1556.
6. Bervoets, Liene, Kim Van Hoorenbeeck, Ineke Kortleven, Caroline Van Noten, Niel Hens, Carl Vael, Herman Goossens, Kristine N Desager, y Vanessa Vankerckhoven. 2013. "Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study". *Gut Pathogens* 5 (abril): 10. doi:10.1186/1757-4749-5-10.
7. Bezard J., J. P. Blond, A. Bernard, and P. Clouet. 1994. *The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues*. *Reprod. Nutr. Dev.* 34:539–568.

8. Bray G. A. 1999. "Etiology and Pathogenesis of Obesity". *Clinical Cornerstone* 2 (3): 1-15.
9. Bouchard Claude. 2008. "Gene-Environment Interactions in the Etiology of Obesity: Defining the Fundamentals". *Obesity (Silver Spring, Md.)* 16 Suppl 3 (diciembre): S5-10. doi:10.1038/oby.2008.528.
10. Cabo Jorge, Rodrigo Alonso, y Pedro Mata. 2012. "Omega-3 Fatty Acids and Blood Pressure". *The British Journal of Nutrition* 107 Suppl 2 (junio): S195-200. doi:10.1017/S0007114512001584.
11. Caesar Robert, Valentina Tremaroli, Petia Kovatcheva-Datchary, Patrice D. Cani, y Fredrik Bäckhed. 2015. "Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling". *Cell Metabolism* 22 (4): 658-68. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.026.
12. Calder Philip C. 2015. "Marine Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes: Effects, Mechanisms and Clinical Relevance". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1851 (4): 469-84. doi:10.1016/j.bbali.2014.08.010.
13. Cani Patrice D., Claude Knauf, Miguel A. Iglesias, Daniel J. Drucker, Nathalie M. Delzenne, y Rémy Burcelin. 2006. "Improvement of Glucose Tolerance and Hepatic Insulin Sensitivity by Oligofructose Requires a Functional Glucagon-like Peptide 1 Receptor." *Diabetes* 55 (5): 1484-90.
14. Cani Patrice D., S. Possemiers, T. Van de Wiele, Y. Guiot, A. Everard, O. Rottier, L. Geurts, 2009. "Changes in Gut Microbiota Control Inflammation in Obese Mice through a Mechanism Involving GLP-2-Driven Improvement of Gut Permeability." *Gut* 58 (8): 1091-1103. doi:10.1136/gut.2008.165886.
15. Calle Eugenia E., Carmen Rodriguez, Kimberly Walker-Thurmond, y Michael J. Thun. 2003. «Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults». *The New England Journal of Medicine* 348 (17): 1625-38. doi:10.1056/NEJMoa021423.
16. Center for Disease Control and Prevention. Contributing factors. 2010. [Last accessed on 2014 Jul 01]. Available from: [http://www.cdc.gov//obesity/childhood/contributing\\_factors.html](http://www.cdc.gov//obesity/childhood/contributing_factors.html) .

17. Chan Ruth S.M, y Jean Woo. 2010. "Prevention of Overweight and Obesity: How Effective is the Current Public Health Approach". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7 (3): 765–83. doi:10.3390/ijerph7030765.
18. Chaput Jean-Philippe, Louis Pérusse, Jean-Pierre Després, Angelo Tremblay, y Claude Bouchard. 2014. "Findings from the Quebec Family Study on the Etiology of Obesity: Genetics and Environmental Highlights". *Current Obesity Reports* 3 (1): 54–66. doi:10.1007/s13679-013-0086-3.
19. Cotillard Aurélie, Sean P. Kennedy, Ling Chun Kong, Edi Prifti, Nicolas Pons, Emmanuelle Le Chatelier, Mathieu Almeida, 2013. "Dietary Intervention Impact on Gut Microbial Gene Richness". *Nature* 500 (7464): 585–88. doi:10.1038/nature12480.
20. Dangardt, Frida, Yun Chen, Eva Gronowitz, Jovanna Dahlgren, Peter Friberg, y Birgitta Strandvik. 2012. "High Physiological Omega-3 Fatty Acid Supplementation Affects Muscle Fatty Acid Composition and Glucose and Insulin Homeostasis in Obese Adolescents". *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012. doi:10.1155/2012/395757.
21. David Lawrence A., Corinne F. Maurice, Rachel N. Carmody, David B. Gootenberg, Julie E. Button, Benjamin E. Wolfe, Alisha V. Ling, 2014. "Diet Rapidly and Reproducibly Alters the Human Gut Microbiome." *Nature* 505 (7484): 559–63. doi:10.1038/nature12820.
22. De Ferranti Sarah D. , y Dariush Mozaffarian. 2008. "The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences". *Clinical Chemistry* 54 (6): 945
23. De Ferranti Sarah D., Kimberlee Gauvreau, David S. Ludwig, Ellis J. Neufeld, Jane W. Newburger, y Nader Rifai. 2004. "Prevalence of the Metabolic Syndrome in American Adolescents: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey". *Circulation* 110 (16): 2494–97. doi:10.1161/01.CIR.0000145117.40114.C7.
24. De Filippo Carlotta, Duccio Cavalieri, Monica Di Paola, Matteo Ramazzotti, Jean Baptiste Poulet, Sebastien Massart, Silvia Collini, Giuseppe Pieraccini, y Paolo Lionetti. 2010. "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* 107 (33): 14691–96. doi:10.1073/pnas.1005963107.

25. Després Jean-Pierre, Isabelle Lemieux, Jean Bergeron, Philippe Pibarot, Patrick Mathieu, Eric Larose, Josep Rodosep Rod, Olivier F. Bertrand, y Paul Poirier. 2008. "Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk" *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (6): 1039r *Biological and Vascular Biology*
26. Devillard Estelle, Freda M. McIntosh, Sylvia H. Duncan, y R. John Wallace. 2007. "Metabolism of Linoleic Acid by Human Gut Bacteria: Different Routes for Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid." *Journal of Bacteriology* 189 (6): 2566–70. doi:10.1128/JB.01359-06.
27. Di Minno, Matteo Nicola Dario, Anna Russolillo, Roberta Lupoli, Pasquale Ambrosino, Alessandro Di Minno, y Giovanni Tarantino. 2012. "Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease". *World Journal of Gastroenterology: WJG* 18 (41): 5839–47. doi:10.3748/wjg.v18.i41.5839.
28. Duncan S. H., G. E. Lobley, G. Holtrop, J. Ince, A. M. Johnstone, P. Louis, y H. J. Flint. 2008. "Human Colonic Microbiota Associated with Diet, Obesity and Weight Loss". *International Journal of Obesity* 32 (11): 1720–24. doi:10.1038/ijo.2008.155.
29. Eckburg Paul B., Elisabeth M. Bik, Charles N. Bernstein, Elizabeth Purdom, Les Dethlefsen, Michael Sargent, Steven R. Gill, Karen E. Nelson, y David A. Relman. 2005. "Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora". *Science (New York, N.Y.)* 308 (5728): 1635–38. doi:10.1126/science.1110591.
30. Erejuwa Omotayo O., Siti A. Sulaiman, y Mohd S. Ab Wahab. 2014. "Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges". *International Journal of Molecular Sciences* 15 (3): 4158–88. doi:10.3390/ijms15034158.
31. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001. "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program

- (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)". *JAMA* 285 (19): 2486–97.
32. Feinleib M., R. J. Garrison, R. Fabsitz, J. C. Christian, Z. Hrubec, N. O. Borhani, W. B. Kannel, R. Rosenman, J. T. Schwartz, y J. O. Wagner. 1977. «The NHLBI Twin Study of Cardiovascular Disease Risk Factors: Methodology and Summary of Results». *American Journal of Epidemiology* 106 (4): 284-85.
33. Ferolla, Silvia Marinho, Luciana Costa Silva, Maria de Lourdes Abreu Ferrari, Aloísio Sales da Cunha, Flaviano dos Santos Martins, Cláudia Alves Couto, y Teresa Cristina Abreu Ferrari. 2015. "Dietary approach in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease". *World Journal of Hepatology* 7 (24): 2522–34. doi:10.4254/wjh.v7.i24.2522.
34. Flores-Lázaro José Rolando, Erika Rodríguez-Martínez, y Selva Rivas-Arancibia. 2011. "Consecuencias metabólicas de la alteración funcional del tejido adiposo en el paciente con obesidad". *Revista Médica del Hospital General de México* 74 (03): 157–65.
35. Gani Osman ABSM. 2008. "Are fish oil omega-3 long-chain fatty acids and their derivatives peroxisome proliferator-activated receptor agonists?" *Cardiovascular Diabetology* 7 (marzo): 6. doi:10.1186/1475-2840-7-6.
36. Glauber H., P. Wallace, K. Griver, y G. Brechtel. 1988. "Adverse Metabolic Effect of Omega-3 Fatty Acids in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus". *Annals of Internal Medicine* 108 (5): 663–68.
37. Gutiérrez-Delgado J. y col. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
38. Hartweg J., R. Perera, V. Montori, S. Dinneen, H. a. W. Neil, y A. Farmer. 2008. "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) for Type 2 Diabetes Mellitus." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, núm. 1: CD003205. doi:10.1002/14651858.CD003205.pub2.

39. Hill J. O., y J. C. Peters. 1998. «Environmental Contributions to the Obesity Epidemic». *Science (New York, N.Y.)* 280 (5368): 1371-74.
40. Hou Tim Y., David N. McMurray, y Robert S. Chapkin. 2015. "Omega-3 Fatty Acids, Lipid Rafts, and T Cell Signaling". *European Journal of Pharmacology*, mayo. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.091.
41. Howell, George, Xiong Deng, Chandrahassa Yellaturu, Edwards A. Park, Henry G. Wilcox, Rajendra Raghov, y Marshall B. Elam. 2009. "N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Insulin-Induced SREBP-1c Transcription via Reduced Trans-Activating Capacity of LXRalpha". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1791 (12): 1190-96. doi:10.1016/j.bbaliip.2009.08.008.
42. Jacobson Terry A., Sara B. Glickstein, Jonathan D. Rowe, y Paresh N. Soni. 2012. "Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Other Lipids: A Review". *Journal of Clinical Lipidology* 6 (1): 5-18. doi:10.1016/j.jacl.2011.10.018.
43. Janczyk Wojciech, Piotr Socha, Dariusz Lebensztejn, Aldona Wierzbicka, Artur Mazur, Joanna Neuhoff-Murawska, y Pawel Matusik. 2013. "Omega-3 fatty acids for treatment of non-alcoholic fatty liver disease: design and rationale of randomized controlled trial". *BMC Pediatrics* 13 (mayo): 85. doi:10.1186/1471-2431-13-85.
44. Jandhyala Sai Manasa, Rupjyoti Talukdar, Chivkula Subramanyam, Harish Vuyyuru, Mitnala Sasikala, y D Nageshwar Reddy. 2015. "Role of the normal gut microbiota". *World Journal of Gastroenterology: WJG* 21 (29): 8787-8803. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787.
45. Jo, Junghyo, Oksana Gavrilova, Stephanie Pack, William Jou, Shawn Mullen, Anne E. Sumner, Samuel W. Cushman, y Vipul Periwal. 2009. "Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth". *PLoS Computational Biology* 5 (3). doi:10.1371/journal.pcbi.1000324.
46. Juárez-López, Carlos, Miguel Klünder-Klünder, Adrián Madrigal-Azcárate, y Samuel Flores-Huerta. 2013. "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduce Insulin Resistance and

Triglycerides in Obese Children and Adolescents". *Pediatric Diabetes* 14 (5): 377–83. doi:10.1111/pedi.12024.

47. Jumpertz Reiner, Duc Son Le, Peter J. Turnbaugh, Cathy Trinidad, Clifton Bogardus, Jeffrey I. Gordon, y Jonathan Krakoff. 2011. "Energy-Balance Studies Reveal Associations between Gut Microbes, Caloric Load, and Nutrient Absorption in Humans". *The American Journal of Clinical Nutrition* 94 (1): 58–65. doi:10.3945/ajcn.110.010132.
48. Kaliannan Kanakaraju, Bin Wang, Xiang-Yong Li, Kui-Jin Kim, y Jing X. Kang. 2015. "A Host-Microbiome Interaction Mediates the Opposing Effects of Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids on Metabolic Endotoxemia." *Scientific Reports* 5: 11276. doi:10.1038/srep11276
49. Kaplins'kyi S. P., A. M. Shysh, V. S. Nahibin, V. Ie Dosenko, V. M. Klimashevs'kyi, y O. O. Moïbenko. 2009. "[Omega-3 polyunsaturated fatty acids stimulate the expression of PPAR target genes]". *Fiziologichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1994)* 55 (2): 37–43.
50. Kelley Darshan S., David Siegel, Madhuri Vemuri, y Bruce E. Mackey. 2007. "Docosahexaenoic Acid Supplementation Improves Fasting and Postprandial Lipid Profiles in Hypertriglyceridemic Men". *The American Journal of Clinical Nutrition* 86 (2): 324–33.
51. Kidd Parris M. 2007. «Omega-3 DHA and EPA for Cognition, Behavior, and Mood: Clinical Findings and Structural-Functional Synergies with Cell Membrane Phospholipids». *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic* 12 (3): 207-27.
52. Kim J., M. E. Carlson, G. A. Kuchel, J. W. Newman, y B. A. Watkins. 2016. "Dietary DHA Reduces Downstream Endocannabinoid and Inflammatory Gene Expression and Epididymal Fat Mass While Improving Aspects of Glucose Use in Muscle in C57BL/6J Mice". *International Journal of Obesity* 40 (1): 129–37. doi:10.1038/ijo.2015.135.
53. Kris-Etherton, P., S. R. Daniels, R. H. Eckel, M. Engler, B. V. Howard, R. M. Krauss, A. H. Lichtenstein, et al. 2001. "Summary of the Scientific Conference on Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Health: Conference Summary from the Nutrition

Committee of the American Heart Association". *Circulation* 103 (7): 1034–39.

54. Leslie Michael A., Daniel J. A. Cohen, Danyelle M. Liddle, Lindsay E. Robinson, y David W. L. Ma. 2015. "A Review of the Effect of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Blood Triacylglycerol Levels in Normolipidemic and Borderline Hyperlipidemic Individuals". *Lipids in Health and Disease* 14 (1): 1–18. doi:10.1186/s12944-015-0049-7.
55. Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, y Jeffrey I. Gordon. 2006. "Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity". *Nature* 444 (7122): 1022–23. doi:10.1038/4441022a.
56. Lifshitz, Fima. 2008. "Obesity in Children". *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 1 (2): 53–60. doi:10.4008/jcrpe.v1i2.35.
57. Lohman T. G. 1986. "Applicability of Body Composition Techniques and Constants for Children and Youths". *Exercise and Sport Sciences Reviews* 14: 325–57.
58. López-Alvarenga Juan C., Sven O. E. Ebbesson, Lars O. E. Ebbesson, M. Elizabeth Tejero, V. Saroja Voruganti, y Anthony G. Comuzzie. 2010. "Polyunsaturated Fatty Acids Effect on Serum Triglycerides Concentration in the Presence of Metabolic Syndrome Components. The Alaska-Siberia Project." *Metabolism: Clinical and Experimental* 59 (1): 86–92. doi:10.1016/j.metabol.2009.07.010.
59. Lorente-Cebrián Silvia, André G. V. Costa, Santiago Navas-Carretero, María Zabala, J. Alfredo Martínez, y María J. Moreno-Aliaga. 2013. "Role of Omega-3 Fatty Acids in Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Diseases: A Review of the Evidence." *Journal of Physiology and Biochemistry* 69 (3): 633–51. doi:10.1007/s13105-013-0265-4.
60. Maes H. H., M. C. Neale, y L. J. Eaves. 1997. "Genetic and Environmental Factors in Relative Body Weight and Human Adiposity". *Behavior Genetics* 27 (4): 325–51.
61. Manco Melania, Lorenza Putignani, y Gian Franco Bottazzo. 2010. "Gut Microbiota, Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the

Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk". *Endocrine Reviews* 31 (6): 817–44. doi:10.1210/er.2009-0030.

62. Mejía-León María Esther, Joseph F. Petrosino, Nadim Jose Ajami, María Gloria Domínguez-Bello, y Ana María Calderón de la Barca. 2014. "Fecal Microbiota Imbalance in Mexican Children with Type 1 Diabetes." *Scientific Reports* 4: 3814. doi:10.1038/srep03814.
63. Micallef Michelle A., y Manohar L. Garg. 2008. "The Lipid-Lowering Effects of Phytosterols and (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Are Synergistic and Complementary in Hyperlipidemic Men and Women." *The Journal of Nutrition* 138 (6): 1086–90.
64. Moertl Deddo, Alexandra Hammer, Sabine Steiner, Raisa Hutuleac, Karin Vonbank, y Rudolf Berger. 2011. "Dose-Dependent Effects of Omega-3-Polyunsaturated Fatty Acids on Systolic Left Ventricular Function, Endothelial Function, and Markers of Inflammation in Chronic Heart Failure of Nonischemic Origin: A Double-Blind, Placebo-Controlled, 3-Arm Study". *American Heart Journal* 161 (5): 915.e1-9. doi:10.1016/j.ahj.2011.02.011.
65. Mori Trevor A. 2004. "Effect of Fish and Fish Oil-Derived Omega-3 Fatty Acids on Lipid Oxidation." *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 9 (4): 193–97. doi:10.1179/135100004225005200.
66. Mostad Ingrid L., Kristian S. Bjerve, Marit R. Bjorgaas, Stian Lydersen, y Valdemar Grill. 2006. "Effects of n–3 Fatty Acids in Subjects with Type 2 Diabetes: Reduction of Insulin Sensitivity and Time-Dependent Alteration from Carbohydrate to Fat Oxidation". *The American Journal of Clinical Nutrition* 84 (3): 540–50.
67. Muley Arti, Prasad Muley, y Monali Shah. 2014. "ALA, Fatty Fish or Marine N-3 Fatty Acids for Preventing DM?: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Current Diabetes Reviews* 10 (3): 158–65.
68. Nestel Paul, Hideki Shige, Sylvia Pomeroy, Marja Cehun, Mavis Abbey, y Daniel Raederstorff. 2002. "The N-3 Fatty Acids Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Increase Systemic Arterial Compliance in Humans." *The American Journal of Clinical Nutrition* 76 (2): 326–30.
69. Neel J. V. 1962. "Diabetes Mellitus: A 'thrifty' genotype Rendered

Detrimental By 'progress'?" *American Journal of Human Genetics* 14 (diciembre): 353-62.

70. "OMS | Obesidad y sobrepeso". 2016. WHO. Consultado diciembre 19. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
71. Pour MRR, Mousavian S, Hejazi SM. 2014. The Effect of 12 Weeks of Selective Aerobic Exercise on Insulin, Insulin Resistance and GGT Enzymes in Middle-Aged Type II Diabetic Women. *IJSS* 4: 502-507
72. Rajendhran, J., y P. Gunasekaran. 2011. "Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond". *Microbiological Research* 166 (2): 99-110. doi:10.1016/j.micres.2010.02.003.
73. Ramírez Mirafuentes, Alejandro, sustentante Asociación de la microbiota intestinal con la obesidad y sus complicaciones metabólicas en población infantil mexicana / 2015
74. Ridaura Vanessa K., Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Jiye Cheng, Alexis E. Duncan, Andrew L. Kau, Nicholas W. Griffin, 2013. "Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice". *Science (New York, N.Y.)* 341 (6150). doi:10.1126/science.1241214.
75. Rivera Domarco, J., Velasco Bernal, A., Hernández Ávila, M., Aguilar Salinas, C., Vadillo Ortega, F. and Murayama Rendón, C. 2015. Obesidad en México: recomendaciones para una política de estado. In: J. Rivera Domarco, M. Hernández Ávila, C. Aguilar Salinas, F. Vadillo Ortega and C. Murayama Rendón, ed., 1st ed.
76. Rodríguez-Cruz Maricela, Armando R. Tovar, Martha del Prado, y Nimbe Torres. 2005. "Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud." *Revista de investigación clínica* 57 (3): 457-72.
77. Santos José Luis, José Alfredo Martínez, Francisco Pérez, y Cecilia Albala. 2005. "[Genetic epidemiology of obesity: family studies]". *Revista Médica De Chile* 133 (3): 349-61. doi:/S0034-98872005000300012.
78. Sekirov Inna, Shannon L. Russell, L. Caetano M. Antunes, y B. Brett Finlay. 2010. "Gut Microbiota in Health and Disease."

79. Simopoulos Artemis P. 2002. "Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases". *Journal of the American College of Nutrition* 21 (6): 495–505.
80. Siqueira, José F., Ashraf F. Fouad, y Isabela N. Rôças. 2012. "Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes". *Journal of Oral Microbiology* 4 (enero). doi:10.3402/jom.v4i0.10743.
81. Sonnenburg Justin L., y Fredrik Bäckhed. 2016. "Diet-Microbiota Interactions as Moderators of Human Metabolism". *Nature* 535 (7610): 56–64. doi:10.1038/nature18846.
82. Spadaro, L., O. Magliocco, D. Spampinato, S. Piro, C. Oliveri, C. Alagona, G. Papa, A. M. Rabuazzo, y F. Purrello. 2008. "Effects of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease". *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 40 (3): 194–99. doi:10.1016/j.dld.2007.10.003.
83. Stunkard A. J., T. I. Sørensen, C. Hanis, T. W. Teasdale, R. Chakraborty, W. J. Schull, y F. Schulsinger. 1986. «An Adoption Study of Human Obesity». *The New England Journal of Medicine* 314 (4): 193–98. doi:10.1056/NEJM198601233140401.
84. Swinburn Boyd A., Gary Sacks, Kevin D. Hall, Klim McPherson, Diane T. Finegood, Marjory L. Moodie, y Steven L. Gortmaker. 2011. "The Global Obesity Pandemic: Shaped by Global Drivers and Local Environments". *Lancet (London, England)* 378 (9793): 804–14. doi:10.1016/S0140-6736(11)60813-1.
85. Takeuchi Osamu, y Shizuo Akira. 2010. "Pattern Recognition Receptors and Inflammation." *Cell* 140 (6): 805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
86. Tremaroli Valentina, y Fredrik Bäckhed. 2012. "Functional Interactions between the Gut Microbiota and Host Metabolism". *Nature* 489 (7415): 242–49. doi:10.1038/nature11552.

87. Turnbaugh Peter J., Fredrik Backhed, Lucinda Fulton, y Jeffrey I. Gordon. 2008. "Marked alterations in the distal gut microbiome linked to diet-induced obesity." *Cell host & microbe* 3 (4): 213–23. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015.
88. Turnbaugh Peter J., Ruth E. Ley, Michael A. Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R. Mardis, y Jeffrey I. Gordon. 2006. "An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest." *Nature* 444 (7122): 1027–31. doi:10.1038/nature05414.
89. Vallée Marcotte, Bastien, Hubert Cormier, Frédéric Guénard, Iwona Rudkowska, Simone Lemieux, Patrick Couture, y Marie-Claude Vohl. 2016. "Novel Genetic Loci Associated with the Plasma Triglyceride Response to an Omega-3 Fatty Acid Supplementation". *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 9 (1): 1–11. doi:10.1159/000446024.
90. Wu Zhengshan, Jianjie Qin, y Liyong Pu. 2012. "Omega-3 fatty acid improves the clinical outcome of hepatectomized patients with hepatitis B virus (HBV)-associated hepatocellular carcinoma". *Journal of Biomedical Research* 26 (6): 395–99. doi:10.7555/JBR.26.20120058.
91. Zelber-Sagi, Shira, Dorit Nitzan-Kaluski, Rebecca Goldsmith, Muriel Webb, Laurie Blendis, Zamir Halpern, y Ran Oren. 2007. "Long Term Nutritional Intake and the Risk for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Population Based Study". *Journal of Hepatology* 47 (5): 711–17. doi:10.1016/j.jhep.2007.06.020.

## ANEXO

Tabla 3.- Secuencias de los oligos forward y los oligos reverse.

Descripción de la secuencia	Secuencia
<b>Primer PCR</b>	
<b>454-V1-V9-F1</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F2</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACACCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F5</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGACACGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F6</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATATCGCGAGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F7</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTGTCTCTACCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F8</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCGCGTGTCCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F9</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGTATCAGCCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F10</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTATGCGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F11</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATACGTCTCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F12</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTGAGCTACCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F13</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATAGTAGTGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F14</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGATACCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F15</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGACGTACCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F16</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACGTACTACCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F17</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTCTAGTACCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F18</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTACGTAGCCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F19</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTACTACTCCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F20</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGACTACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F21</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTAGACTAGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F22</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGAGTATGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F23</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTCTCGTGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F24</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGAGACGAGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F25</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGTCGCTCGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F26</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACATACGCGTCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F27</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCGAGTATCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F28</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTACTATGTCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F29</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTGTACAGTCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F30</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACTATACTCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F31</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCGTCTCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F32</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTACGCTATCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F33</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATAGAGTACTCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-F34</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACGCTACGTCTACGGGNGGCWGCAG
<b>454-V1-V9-R51</b>	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCAAGGCCCGGGAACG
<b>Segunda PCR</b>	
<b>454-F-UNIV</b>	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
<b>454-R-UNIV</b>	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG