



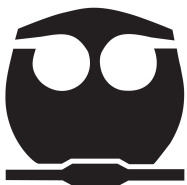
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

PAPEL DE LA MICROBIOTA EN LA DIABETES MELLITUS

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ALICIA NUÑO LÁMBARRI



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. EN C. LUCIA CORNEJO BARRERA
VOCAL: Q.F.B. EDUARDO BONILLA ESPINOSA
SECRETARIO: DR. HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ
1er. SUPLENTE: Q.F.B. NORMA ANGELICA CAMACHO DE LA ROSA
2° SUPLENTE: DRA. ILIANA ELVIRA GONZALEZ HERNANDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM. MÉXICO, D.F.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

SUSTENTANTE:

ALICIA NUÑO LÁMBARRI

ÍNDICE

Resumen	1
Objetivos	3
Introducción	4
Capítulo 1. Ecología de la microbiota intestinal	5
1.1 Géneros bacterianos predominantes en la microbiota	6
1.2 Factores que influyen en el establecimiento de la microbiota	15
1.2.1 Dieta	15
1.2.1.1 Prebióticos	17
1.2.1.2 Probióticos	20
1.2.1.3 Consumo elevado de hidratos de carbono	23
1.2.1.4 Consumo elevado de proteínas	24
1.2.1.5 Consumo elevado de lípidos	25
1.2.2 Antibióticos	25
1.2.3 Epigenética	26
1.2.4 Sistema Inmune	27
1.2.5 Etapas de la vida	29
Capítulo 2. Productos metabólicos de importancia para la salud, provenientes de la microbiota	32
2.1 Ácidos grasos de cadena corta (SFCA's)	32
2.2 p-Cresol, ácido sulfhídrico (H ₂ S), compuestos N-nitrosos, Isovalerato	35
2.3 Ácido linoléico conjugado (CLA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA)	37

2.4 Ácidos biliares secundarios	39
Capítulo 3. Diabetes mellitus	42
3.1 Generalidades de la diabetes mellitus	42
3.2 Diabetes mellitus tipo 1	48
3.3 Diabetes mellitus tipo 2	52
3.4 Comorbidades asociadas a la diabetes mellitus	57
3.5 La microbiota intestinal y sus implicaciones en la salud	59
3.5.1 Microbiota intestinal y diabetes mellitus	60
3.5.1.1 Rol de la microbiota intestinal en diabetes tipo 1	60
3.5.1.2 Rol de la microbiota intestinal en diabetes tipo 2	63
3.5.1.2.1 Endotoxemia metabólica	65
Capítulo 4. Métodos de análisis e identificación	69
4.1 Next generation sequencing (NGS)	70
4.2 Metagenómica	73
4.3 Ensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , para el estudio de la microbiota intestinal y su rol en la diabetes mellitus	76
Conclusiones	81
Perspectivas	82
Referencias	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros representativos de la microbiota normal de humanos.....	10
Tabla 2. Prebióticos reconocidos y emergentes.....	18
Tabla 3. Estructura química de prebióticos.....	19
Tabla 4. Microorganismos usados como probióticos.....	22
Tabla 5. Especies predominantes en el intestino humano.....	30
Tabla 6. Acción principal de los ácidos grasos de cadena corta.....	35
Tabla 7. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.....	43
Tabla 8. Criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus.....	46
Tabla 9. Comorbilidades de la diabetes mellitus.....	58
Tabla 10. Diferentes plataformas de secuenciación.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético que representa la diversidad de la microbiota intestinal y la presencia relativa en porcentaje, en adultos sanos de la Unión Europea.....	8
Figura 2. Microorganismos a lo largo del tracto gastrointestinal.....	9
Figura 3. Ecología de la microbiota normal del cuerpo humano.....	10
Figura 4. El tracto gastrointestinal humano. Distribución de los microorganismos no patógenos más representativos en individuos adultos sanos.....	14
Figura 5. Desarrollo de microbiota intestinal en humanos y los efectos de exposición a diferentes ambientes.....	15
Figura 6. Relación entre enfermedades y genes.....	28
Figura 7. Cambios en la microbiota intestinal, a través de las diferentes etapas de la vida.....	30
Figura 8. Vías alternativas para la síntesis de butirato y propionato.....	34
Figura 9. Principales vías de fermentación proteínica y grupos microbianos asociados a dicha fermentación.....	37
Figura 10. Estructura de ácidos grasos de importancia para la salud que pueden ser generados por la microbiota intestinal.....	38
Figura 11. Ácidos biliares primarios y secundarios. Desconjugación y dehidroxilación.....	40
Figura 12. Incremento de diabéticos, tipo 1 y 2 diagnosticados a nivel nacional..	47
Figura 13. Comparación de prevalencia de diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).....	47
Figura 14. Insulinitis.....	50
Figura 15. Ingesta de hidratos de carbono en persona sana y persona con diabetes mellitus tipo 2.....	53
Figura 16. Efecto del estrés oxidativo sobre el número y la función de las células β del páncreas.....	55

Figura 17. Principales vías metabólicas activadas por la hiperglucemia crónica, vinculadas con el desarrollo de estrés oxidativo en pacientes diabéticos.....	56
Figura 18. Modelo de factores que influyen para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 1. En negro, factores que influyen en un riesgo bajo.....	61
Figura 19. Membrana de bacterias Gram negativas.....	66
Figura 20. Estructura de lipopolisacárido.....	66
Figura 21. Modelos mediante los cuales, los lipopolisacáridos alcanzan el torrente sanguíneo.....	67
Figura 22. Posibles vías que ligan el consumo de una dieta alta en grasa con endotoxemia metabólica y enfermedades crónico degenerativas.....	68
Figura 23. Diagrama de resecuenciación del genoma completo.....	71
Figura 24. Método para descubrir nuevos genes usando la metagenómica.....	7

Resumen.

La microbiota es un conjunto de bacterias alojadas y distribuidas a lo largo del tracto gastrointestinal, con una mayor acumulación en el intestino grueso. Existen aproximadamente 10^{11} células bacterianas por mL en el intestino grueso las cuales pertenecen a más de 500 especies. La microbiota puede variar de huésped en huésped, algunos de los factores que influyen en esto son: nacimiento vía cesárea o vía vaginal, dieta, antibióticos, sistema inmune. Este conjunto de bacterias realizan diversas reacciones bioquímicas, siendo muchas de estas imposibles de realizar con las enzimas producidas por el huésped.

Investigaciones recientes han encontrado que la microbiota está directamente relacionada con la diabetes mellitus. Las proporciones de géneros bacterianos se ven alteradas respecto a individuos sanos, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana intestinal, sensibilidad a la insulina, metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, aumento del tiempo de tránsito intestinal y aumento de la absorción de nutrimentos provenientes de la dieta, por mencionar solo algunos.

La diabetes mellitus es un problema de salud pública en México, de acuerdo con el INEGI, de cada 100 mil personas que mueren, 70 fallecen por diabetes; la encuesta nacional de salud (ENSANUT) reporta que desde el 2000 hasta el 2012 se ha observado un incremento de diabetes mellitus, de 2,842,800 adultos enfermos en el 2000 a 6,406,600 adultos enfermos; he aquí la importancia de estudiar todo lo relacionado con dicha enfermedad.

Para conocer la composición de la microbiota, en individuos sanos y en pacientes diabéticos, se han desarrollado métodos de última generación, conocidos como "Next generation sequencing", los cuales permiten comparar el genoma de la microbiota de individuos sanos contra el genoma de la microbiota de pacientes diabéticos; lo anterior es posible debido a que el genoma entero se fragmenta y se secuencian en millones de reacciones simultáneas, las nuevas líneas de bases

llamadas lecturas, se reensamblan usando un genoma de referencia, de esta forma se reorganiza la información y es así como se conoce la secuencia de bases completa del genoma.

Lo anterior mejorará el entendimiento de esta enfermedad, cada día más común en México y en el mundo. Los métodos de última generación proporcionan información valiosa, la cual nos acerca un poco más a la posibilidad de poder tratar la diabetes, haciendo cambios estratégicos en la microbiota intestinal y en la dieta.

Objetivos

Objetivo general.

Mostrar un panorama actual del papel que desempeña la microbiota intestinal en el desarrollo de la diabetes mellitus.

Objetivos particulares.

Definir a la microbiota intestinal, identificando los factores que provocan el establecimiento de diferentes géneros microbianos.

Establecer cómo los productos metabólicos provenientes de la microbiota intestinal, interfieren con la salud del huésped.

Definir diabetes mellitus, comorbilidades asociadas a dicha enfermedad y cual es el rol que desempeña la microbiota intestinal.

Establecer los métodos de análisis e identificación, que nos permiten conocer minuciosamente el comportamiento de la microbiota intestinal en huéspedes enfermos o sanos.

Introducción.

La relación entre el huésped y la microbiota intestinal, está influenciada por varios factores como la dieta, edad, genéticos, ambientales, entre otros. Estos factores afectan la estructura de la comunidad microbiana y a su vez a muchos procesos fisiológicos del huésped. Algunas investigaciones sugieren que la composición de la microbiota intestinal influye la extracción de energía de la dieta, permeabilidad del intestino, el tiempo de tránsito intestinal, el sistema inflamatorio y esto podría a su vez influenciar el desarrollo de obesidad y desórdenes relacionados, como la diabetes mellitus tipo 2 (Turnbaugh P.J. *et al.*, 2006; Ordovas J.M. & Mooser V., 2006; Cani P.D. & Delzenne M. N., 2007). En el caso de la diabetes mellitus tipo 1 existe riesgo genético, sin embargo, factores como el consumo de alimentos sólidos prematuramente en la infancia pueden provocar el desarrollo de autoinmunidad contra las células beta del páncreas. Algunas investigaciones sugieren que la microbiota intestinal tiene la capacidad de activar o regular el sistema inmune, es por ésta razón que está relacionada con enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1 (Wen L. *et al.*, 2008).

Falta esclarecer el mecanismo por el cual la microbiota intestinal contribuye para el desarrollo de la cadena inflamatoria, así como la composición ideal de la microbiota intestinal para mantener un adecuado estado de salud, también se desconoce la forma o técnica más conveniente para modular la microbiota intestinal y así poder prevenir o tratar enfermedades como la diabetes mellitus.

En este trabajo de investigación se recopila información actualizada, para que sea posible proponer nuevas líneas de investigación, que ayuden a resolver algunos de los asuntos que quedan pendientes para poder proponer una mejor calidad de vida para las personas que sufren de diabetes mellitus o en el mejor de los casos evitar que se desarrolle dicha enfermedad.

Capítulo 1.

Ecología de la microbiota intestinal.

En el cuerpo humano existe una relación simbiótica comensal, de una gran cantidad de microorganismos, aproximadamente 10^{18} , rebasan el número de células eucariotas en el cuerpo humano por más de 5 ordenes de magnitud (Flint H., 2012; Peterfreund G.L., 2012), principalmente bacterias. Estos microorganismos son parte esencial para mantener un buen estado de salud. Por esta relación favorable, a este grupo de microorganismos se les denomina microbiota normal del cuerpo humano (Brock *et al.*, 2009). Se ha demostrado en varios estudios que la microbiota intestinal, tiene una conexión estrecha con el metabolismo, almacenamiento de energía y gasto de la misma (Musso G. *et al.*, 2011).

Investigadores notaron, que al realizar cirugías para reducción de peso (bypass gástrico) (Bjorneklett A. *et al.*, 1981), la microbiota intestinal tenía cambios en su conformación, en este ensayo se midieron la desconjugación de los ácidos biliares y la producción y excreción de hidrógeno y metano. Debido a esto se empezó a estudiar la microbiota intestinal hace más de 30 años (Musso G. *et al.*, 2011). Los primeros estudios de la microbiota eran bastante limitados, debido a que la mayoría de las bacterias presentes no se pueden cultivar mediante métodos convencionales (Volker M., 2004). El desarrollo de métodos innovadores como los de *Next Generation Sequencing* (NGS), nos permiten indagar mucho más, respecto a la composición, y actividad de la microbiota.

Más de 500 especies de bacterias están presentes en esta relación simbiótica, la extensión y variabilidad en el huésped, a lo largo de la vida, son áreas que se están investigando cada vez con más frecuencia (Volker M., 2004).

El microbioma o genoma de la microbiota intestinal, es mucho más extenso que el genoma humano, debido a esto es que la microbiota está relacionada ampliamente en reacciones bioquímicas imposibles de realizar por el huésped (Musso G. *et al.*, 2011).

El establecimiento de la microbiota intestinal depende de diversos factores, los cuales se abordan en este capítulo.

1.1 Géneros bacterianos predominantes en la microbiota.

La microbiota es responsable de varias funciones metabólicas, las cuales el huésped no puede realizar, por ejemplo: biodisponibilidad de nutrimentos, conversión de ácidos biliares, degradación de hidratos de carbono complejos como la celulosa, y facilita la excreción de toxinas, degradación de xenobióticos (Musso G. *et al.*, 2010), síntesis de vitamina K, síntesis de vitaminas del complejo B (B₁, B₂, B₆ y B₁₂), producción de ácidos orgánicos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) (Brock *et al.*, 2009), por mencionar algunos. Por otro lado, la microbiota también genera compuestos tóxicos los cuales pueden contribuir al desarrollo de cáncer, diarreas, constipación e infecciones intestinales (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Existen 30 phyla del dominio “Bacteria”, (Euzéby, J.P., 2011). Los phyla que conforman a la microbiota intestinal son: Firmicutes (~60%), Actinobacterias (> 10%), Bacteroidetes (>10%), Proteobacteria (1%), Fusobacteria (1%), y otros más en menor proporción (Figura 1) (Musso G. *et al.*, 2010; Robinson C.J. *et al.*, 2010; Diamant M. *et al.*, 2011; Power S.E. *et al.*, 2014). Las Firmicutes son bacterias Gram positivas, de bajo contenido de guanina y citocina, generalmente forman esporas; los géneros importantes de este phylum son: *Bacillus spp.* (*B. anthracis* patógeno, *B. subtilis*, el cual es ampliamente usado en biotecnología), bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus casei* de uso biotecnológico, *Streptococcus pyogenes* patógeno), *Clostridium* (*C. difficile* patógeno, *C. acetobutylicum* uso biotecnológico). Las Actinobacterias son bacterias Gram positivas, tienen un contenido de guanina y citocina elevado, por esta razón son llamadas “bacterias Gram positivas de alto contenido de G-C”; algunas especies notables de este phylum son: *Streptomyces* (producción de antibióticos) y *Propionibacterium acnes* (comensal que se encuentra en la piel y despiden olores). Las Bacteroidetes, son bacterias Gram negativas, algunas especies de este phylum, son patógenos oportunistas y muchas otras son las que componen a la microbiota normal del

intestino. Las Proteobacterias son bacterias Gram negativas, este phylum es el más grande dentro del dominio Bacteria, aquí se encuentran muchos patógenos como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, entre otras. Las Fusobacterias, son bacilos Gram negativos, anaerobias obligadas (Euzéby, J.P., 2011) (Figura 1).

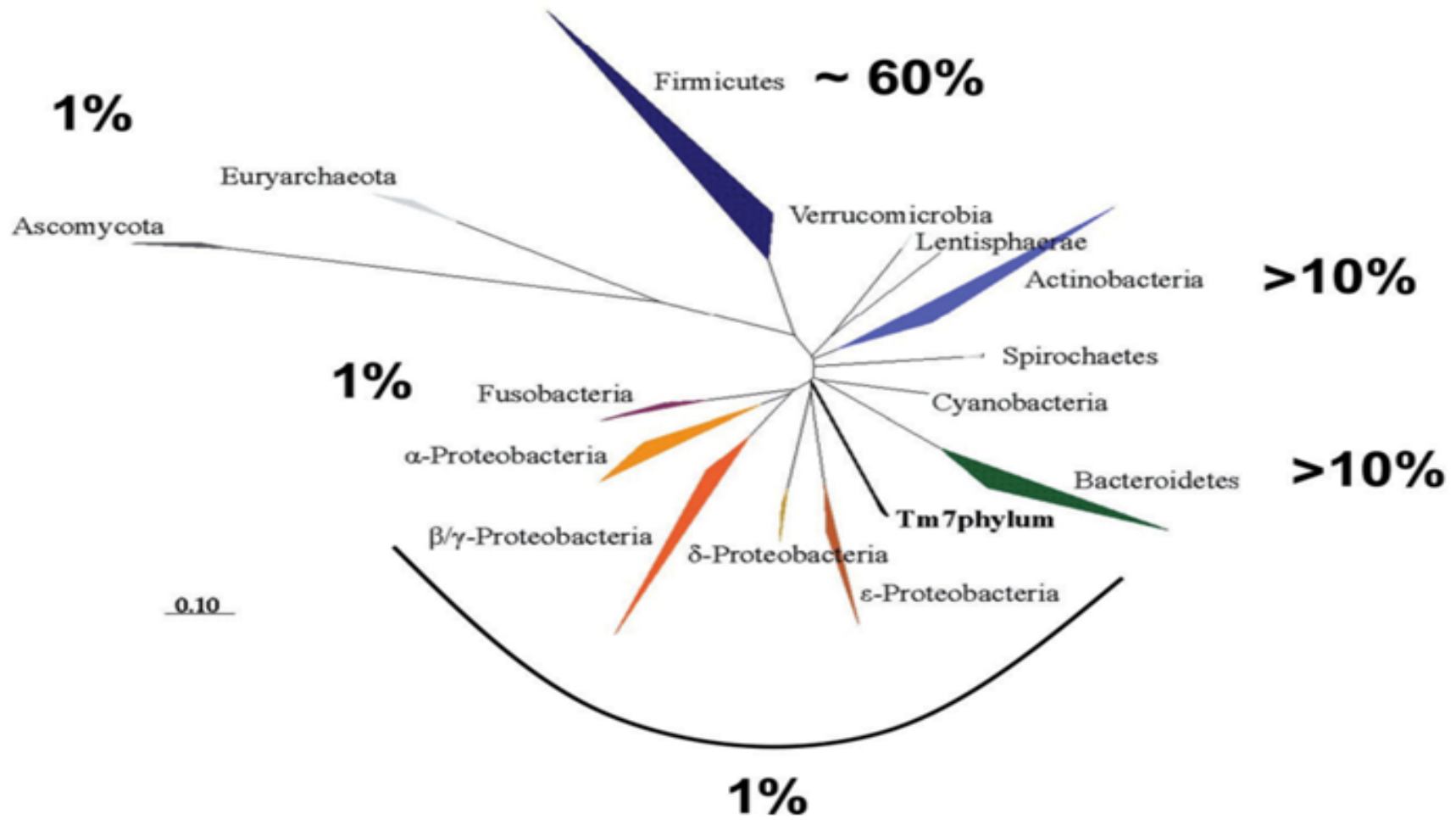


Figura 1. Árbol filogenético que representa la diversidad de la microbiota intestinal y la presencia relativa en porcentaje, en adultos sanos de la Unión Europea (Diamant M. *et al.*, 2011).

La microbiota alojada en el tracto gastrointestinal, va cambiando a lo largo de éste, empezando con una reducida diversidad y un número bajo de microorganismos en el estómago, incrementando poco a poco hasta llegar al colon (**Figura 2**), es ésta región la mejor para el estudio de la microbiota, pues es aquí donde se encuentra la mayor diversidad y cantidad de microorganismos (Power S. E. *et al.*, 2014). El pH y oxígeno, son factores que influyen para que los microorganismos estén distribuidos de ésta forma; en el colon se realizan casi todas las reacciones de fermentación, es un ambiente anaeróbico y con un pH alrededor de 5.5 y 7, ambiente idóneo para el desarrollo de bacterias de los phyla que se mencionaron anteriormente.

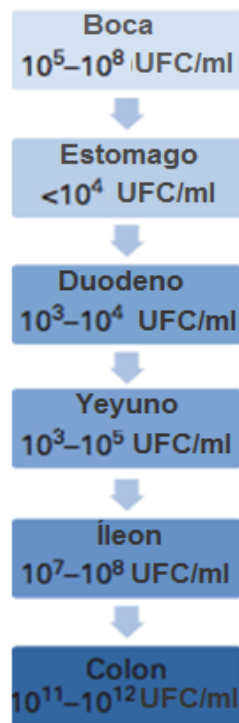


Figura 2. Microorganismos a lo largo del tracto gastrointestinal (Power S.E. *et al.*, 2014).

Además de los microorganismos alojados en el tracto gastro intestinal, existen más microorganismos, en diferentes cavidades del cuerpo humano, los cuales constituyen lo que se conoce como microbiota normal. El cuerpo humano puede visualizarse como un ecosistema que está sujeto a procesos ecológicos que dan estructura a las comunidades, incluyendo: dispersión, invasión, sucesión y dinámica de comunidades (González A. *et al.*, 2011) (*Figura 3*).

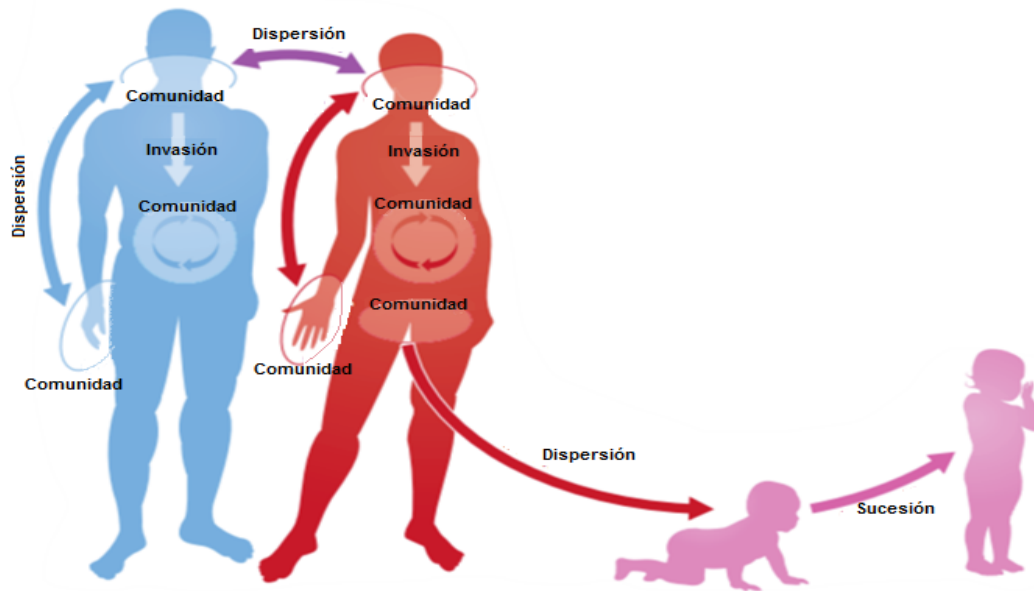


Figura 3. Ecología de la microbiota normal del cuerpo humano (Gonzalez A. *et al.*, 2011).

Algunas especies de microorganismos que forman parte de la microbiota en las 5 diferentes cavidades, se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. Géneros representativos de la microbiota normal de humanos (Witkin S.S. *et al.*, 2007¹; Costello E.K. *et al.*, 2009²; Robinson C.J. *et al.*, 2010³; Wos-Oxley M.L. *et al.*, 2010⁴)

Lugar anatómico	Géneros principales de microorganismos
Piel ²	<i>Corynebacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Branhamella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Malassezia</i>
Boca ³	<i>Streptococcus</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Lautropia</i> , <i>Syngeristes</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Gmella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Stomatococcus</i> , <i>Veillonella</i>
Tracto Respiratorio ⁴	<i>Peptostreptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pentoniphilus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Dolosigranulum</i> , <i>Finegoldia</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterobacterium</i> , <i>Bacteroides</i>
Tracto gastrointestinal ³	<i>Actinomyces</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Gemella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Deferribateres</i> , <i>Deinococcus</i> , <i>Flavobacteria</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterobacterium</i>
Tracto vaginal ^{1, 3}	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Clostridiales</i>

La microbiota presente en la piel está constituida por bacterias y hongos. La mayoría son bacterias Gram positivas (Firmicutes y Actinobacterias), debido a que resisten baja humedad y pH bajo, así como el ácido orgánico de la piel. Esta microbiota característica de bacterias Gram positivas, evita que patógenos Gram negativos, puedan crecer y provocar infecciones. En muchas ocasiones la ausencia de ciertos microorganismos, presentes en la microbiota normal, pueden causar problemas de colonización de otros microorganismos que causan enfermedades serias como la candidiasis en ausencia de *Malassezia spp.* La microbiota alojada en la piel varía en cantidad y diversidad bacteriana, dependiendo del lugar en el que se localice (ingle, axilas, manos) (Brock *et al.*, 2009; Costello E.K. *et al.*, 2009).

La primera observación de microorganismos, fue una muestra de la cavidad bucal de Antonie van Leeuwenhoek, él llamó a estos microorganismo “animalcules”. Las bacterias que son parte de esta microbiota normal de la boca, se encuentran distribuidas en la saliva, dientes, lengua y en las encías (Robinson C.J. *et al.*, 2010). En la cavidad bucal, existen enzimas como la lisozima y la lactoperoxidasa, sustancias antimicrobianas, sin embargo, debido a la constante disponibilidad de nutrientes, la microbiota que se encuentra es bastante amplia. Los microorganismos que se alojan en la cavidad bucal, producen sustancias adherentes para poder crecer en las superficies lisas de los dientes, formando una biopelícula conocida como placa dental; la producción de ácido de estos microorganismos daña la superficie de los dientes, provocando caries y enfermedades peridontales (Brock *et al.*, 2009).

El tracto respiratorio está colonizado por microorganismos, los cuales pertenecen a la microbiota normal, se encuentran en el tracto respiratorio superior, conformado por: nasofaringe, cavidad bucal, laringe y faringe; el tracto respiratorio inferior está revestido por epitelio ciliado, el cual se encarga de empujar el polvo y los microorganismos hacia arriba, evitando así que se alojen en los pulmones, bronquios y tráquea. Ésta microbiota, como ya se ha mencionado antes, evita que microorganismos patógenos puedan colonizar y provocar enfermedades, debido a la competencia que existe por los nutrientes (Brock *et al.*, 2009). Uno de los microorganismos que predomina en el tracto respiratorio es *Staphylococcus*

aureus, este microorganismo es patógeno, si se aloja en otro ambiente (tracto gastrointestinal), sin embargo en el tracto respiratorio es parte de la microbiota normal (Wos-Oxley M.L. *et al.*, 2010).

Los microorganismos pertenecientes a la microbiota normal del tracto vaginal, son Gram negativos. Las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Megasphaera*), predominan en el tracto vaginal, es por esta razón que el pH es ligeramente ácido, en la etapa de reproducción. El pH ácido es una defensa contra la proliferación de microorganismos patógenos (Witkin S.S. *et al.*, 2007; Brock *et al.* 2009). Ésta comunidad juega un papel muy grande en la protección del tracto reproductivo, contra patógenos y daños externos del ambiente al que es expuesto (Robinson C.J. *et al.*, 2010).

El tracto gastrointestinal es formado por: estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (colon y ano) (Figura 4), los microorganismos que conforman la microbiota, están en constante contacto con los nutrientes ingeridos en la dieta, y muchos de estos microorganismos permiten la absorción y modificación de moléculas indispensables para mantener un estado de salud adecuado. En el estómago, debido al pH tan ácido, la cantidad de microbiota presente es muy baja, menos de 10^4 UFC/mL, la mayoría de los microorganismos no pueden sobrevivir a esta barrera química, sin embargo, se ha encontrado presencia de microorganismos como *Helicobacter pylori*, patógeno responsable de úlceras estomacales. En el duodeno, existen aproximadamente 10^4 UFC/mL, en el jejunio se encuentran 10^5 UFC/mL, en el íleon 10^8 UFC/mL. La microbiota que es alojada el intestino delgado es muy similar a la del estómago, a medida que nos alejamos de esta zona, el pH va incrementando así como la cantidad de microorganismos. La mayoría de los microorganismos que encontramos en el intestino delgado, son anaerobios obligados. En el intestino grueso se encuentra la mayor parte de la microbiota gastrointestinal, aproximadamente 10^{12} UFC/mL, ésta microbiota está conformada en menor proporción por aerobios facultativos, los cuales consumen todo el oxígeno presente, para que los anaerobios obligados, en mayor proporción, puedan desarrollarse sin tener dificultades (Brock *et al.*, 2009; Power S.E. *et al.*, 2014). Los microorganismos que se encuentran en el estomago, es difícil diferenciar si son microorganismos residentes o solo transitorios, sin

embargo, se sabe que la microbiota es la misma en todo el estómago. La composición de la microbiota del estómago es similar a la que se encuentra en la cavidad bucal, esto indica que la comunidad microbiana del estómago, puede ser resultado de la traslocalización de estos microorganismos de la boca al estómago. No obstante, hay muchos microorganismos de la comunidad del estómago que son asociados específicamente con él. En el intestino delgado, también se encuentran microorganismos similares a los del estómago, sin embargo, hay un cambio en la estructura de la comunidad, bacterias anaerobias facultativas son reemplazadas por anaerobias obligadas, como lo son la mayoría de los miembros principales de la microbiota intestinal. Como ya se mencionó anteriormente, el colon, contiene la mayor cantidad de microorganismos pertenecientes al tracto gastrointestinal, a pesar de esto, muchos miembros alojados en el colon son bacterias desconocidas y solo encontramos dos phyla predominantes Bacteroidetes y Firmicutes. Se cree que el ambiente del intestino selecciona poca diversidad de bacterias en niveles de filogenética elevados y una diversidad extremadamente grande en niveles de filogenética bajos. La variación de las bacterias de niveles filogenéticos bajos, es mucho mayor que el de las bacterias de niveles filogenéticos elevados, esto sugiere que, a pesar de no haber un núcleo de microbiota intestinal, podría haber un núcleo de microbioma (Robinson C.J. *et al.*, 2010).

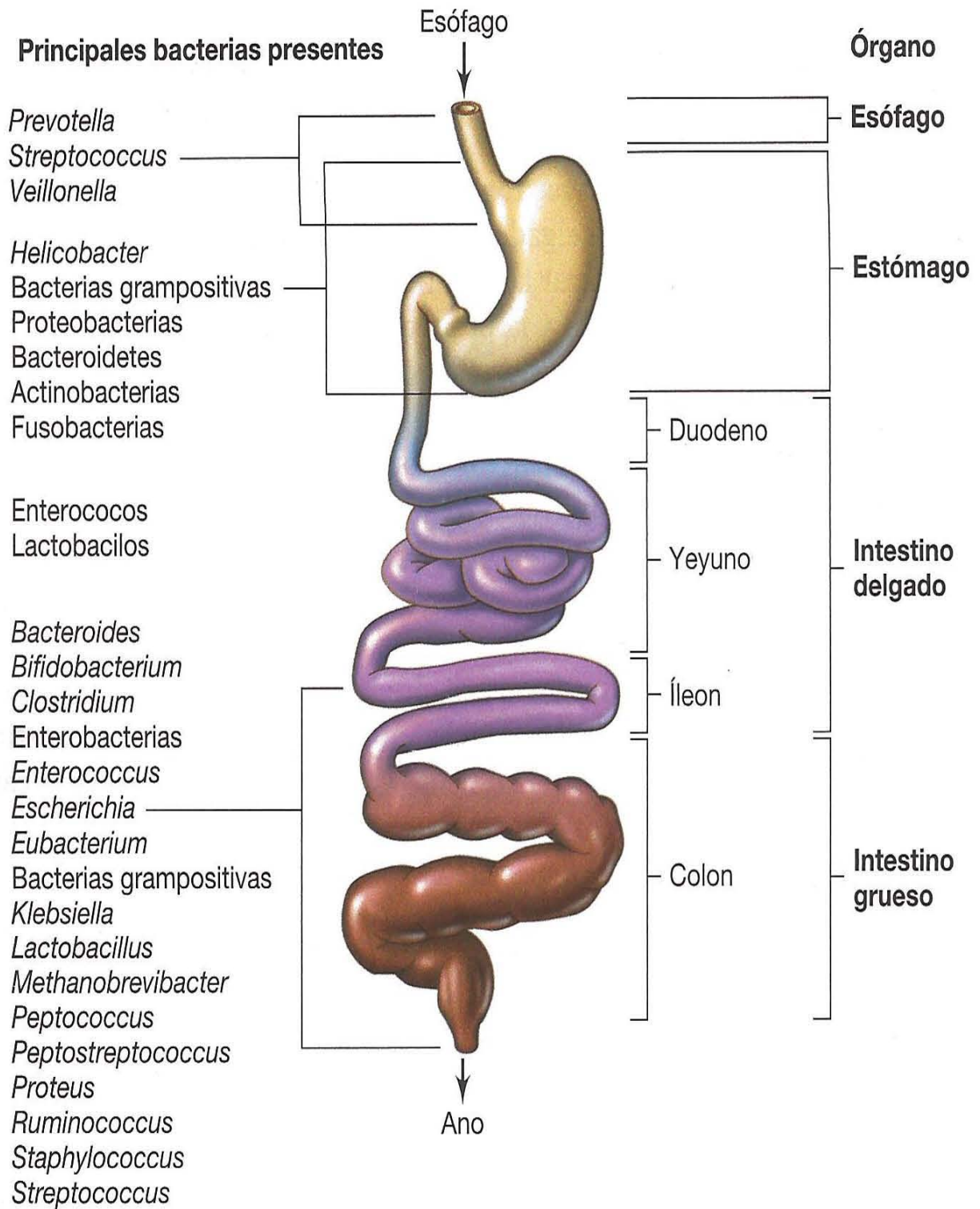


Figura 4. El tracto gastrointestinal humano. Distribución de los microorganismos no patógenos más representativos en individuos adultos sanos (Brock et al. 2009).

1.2 Factores que influyen en el establecimiento de la microbiota.

La microbiota intestinal está compuesta por una mayor cantidad de microorganismos (**Figura 4**), comparada con la microbiota que se encuentra alojada en la piel, el tracto respiratorio, la boca y el tracto urogenital. Siendo la microbiota intestinal, la encargada de biotransformar: xenobióticos, fitoestrógenos, ácidos biliares; facilitar la excreción de toxinas; metabolizar hidratos de carbono complejos no digeribles; por mencionar algunas funciones (Volker. 2004) .

Se han identificado diversos factores que pueden modificar la microbiota intestinal algunos de ellos son: la dieta, consumo de antibióticos, factores genéticos, sistema inmune, etapas de la vida, lugar de origen. Existen otros factores que pueden contribuir al desarrollo de la microbiota intestinal como la colonización inicial después del nacimiento, dependiendo si es por vía vaginal o cesárea, la forma de alimentación del recién nacido, fórmula láctea o amamantado (**Figura 5**) (Volker. 2004; Albenberg L.G. & Wu G.D., 2014).

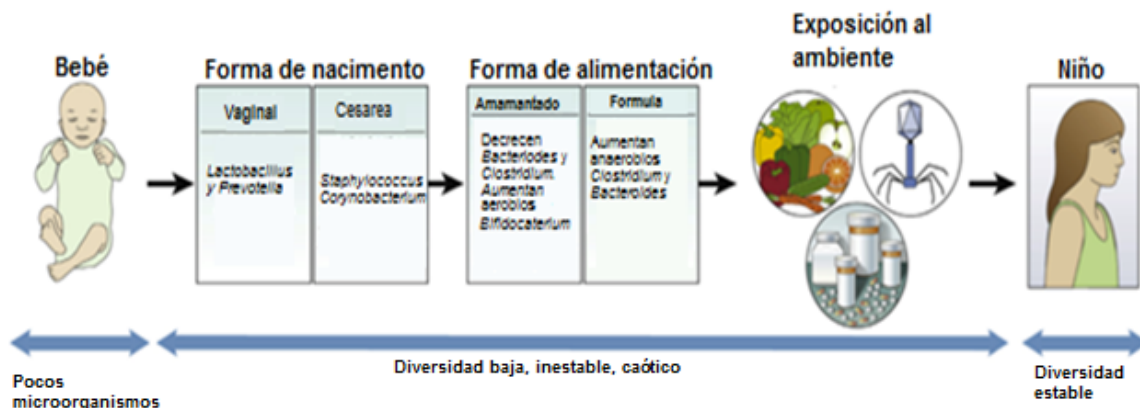


Figura 5. Desarrollo de microbiota intestinal en humanos y los efectos de exposición a diferentes ambientes (Albenberg L.G. & Wu G.D., 2014).

1.2.1 Dieta.

Por definición dieta es: el conjunto de alimentos y platillos que se consumen cada día (Higashida B. 2005). La OMS (Organización Mundial de la Salud) define la dieta como todo lo que se consume en un día, es la unidad fundamental de la alimentación; la dieta debe ser: suficiente (que satisfaga las necesidades de un organismo), agradable sensorialmente y variada.

La microbiota intestinal cambia, dependiendo la proporción de la ingesta de hidratos de carbono, lípidos y proteína, por mencionar solo algunos nutrimentos que la pueden modificar.

Se ha observado que en personas con una dieta vegetariana (baja ingesta de ácidos grasos saturados, de proteína de origen animal y alta ingesta de hidratos de carbono complejos), la microbiota intestinal presenta una mayor proporción de *Prevotella spp.* y baja proporción en *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* y *Enterobacterium spp.*. Esto se debe a que un consumo elevado de hidratos de carbono la microbiota fermenta los hidratos de carbono, en el colón, produce ácidos grasos de cadena corta (SFA's), los cuales disminuyen el pH, en consecuencia *Prevotella spp.*, resistente a pH ácidos, encuentra condiciones ideales para su proliferación. Esto tiene como consecuencia que las bacterias Gram positivas, pertenecientes a la microbiota normal, disminuyan; y patógenos, que antes eran repelidos por el género de bacterias *Bacteroides spp.*, puedan colonizar el intestino (Flint H., 2012; Goldsmith R. & Sartor B., 2014).

Otra dieta que ha sido muy estudiada es, la llamada "western diet", dieta occidental (es decir la nuestra), la cual está compuesta por hidratos de carbono simples y alto contenido de lípidos y proteínas. La dieta recomendada debe estar compuesta por 58% de hidratos de carbono, 28% de lípidos y 14% de proteínas; la dieta occidental, está compuesta por 50% de hidratos de carbono, 35% de lípidos y 15% de proteínas (Layman D.K., *et al.*, 2003). Con este tipo de dieta se ha encontrado, que la microbiota intestinal tiene un mayor número de Bacteroidetes y *Bifidobacterium sp.*, los cuales están directamente relacionados con muchos padecimientos, como: obesidad, enfermedad de inflamación del intestino, enfermedades de hígado graso no alcohólicas, diabetes mellitus y cáncer (Volker. 2004; Alemán, J. O. *et al.*, 2014; Power, S. E. *et al.*, 2014).

1.2.1.1 Prebióticos.

Existen varias definiciones para prebióticos, la más actualizada es de Gibson en el 2004: “ingrediente fermentable que permite cambios específicos en la composición y actividad de la microbiota gastrointestinal, los cuales confieren beneficios al huésped, en salud y bienestar” (Gibson. G. R. *et al.*, 2004). Según la OMS, la definición de prebiótico es: “ingredientes no digestibles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una de las especies de bacterias que están ya establecidas en el colon, o de un número limitado de ellas, y por consiguiente mejoran de hecho la salud del huésped” (WHO/FAO, 2001).

Para que algún ingrediente fermentable, se considere prebiótico debe de cumplir con una serie de especificaciones (Anadón A. *et al.*, 2010):

1. No- digerible.
2. Fermentable por la microbiota intestinal.
3. Estimulación selectiva en crecimiento y actividad, para ciertas bacterias intestinales.

Existen prebióticos, de los cuales se conoce perfectamente el efecto que provocan en el huésped, a estos prebióticos se les conoce como: prebióticos reconocidos; otro tipo de prebióticos, no se sabe del todo el efecto que provocan en el huésped, a estos se les conoce como: prebióticos emergentes. En la **tabla 2**, se enlistan ambos (Anadón A. *et al.*, 2010).

Tabla 2. Prebióticos reconocidos y emergentes (Anadón A. et al. 2010).

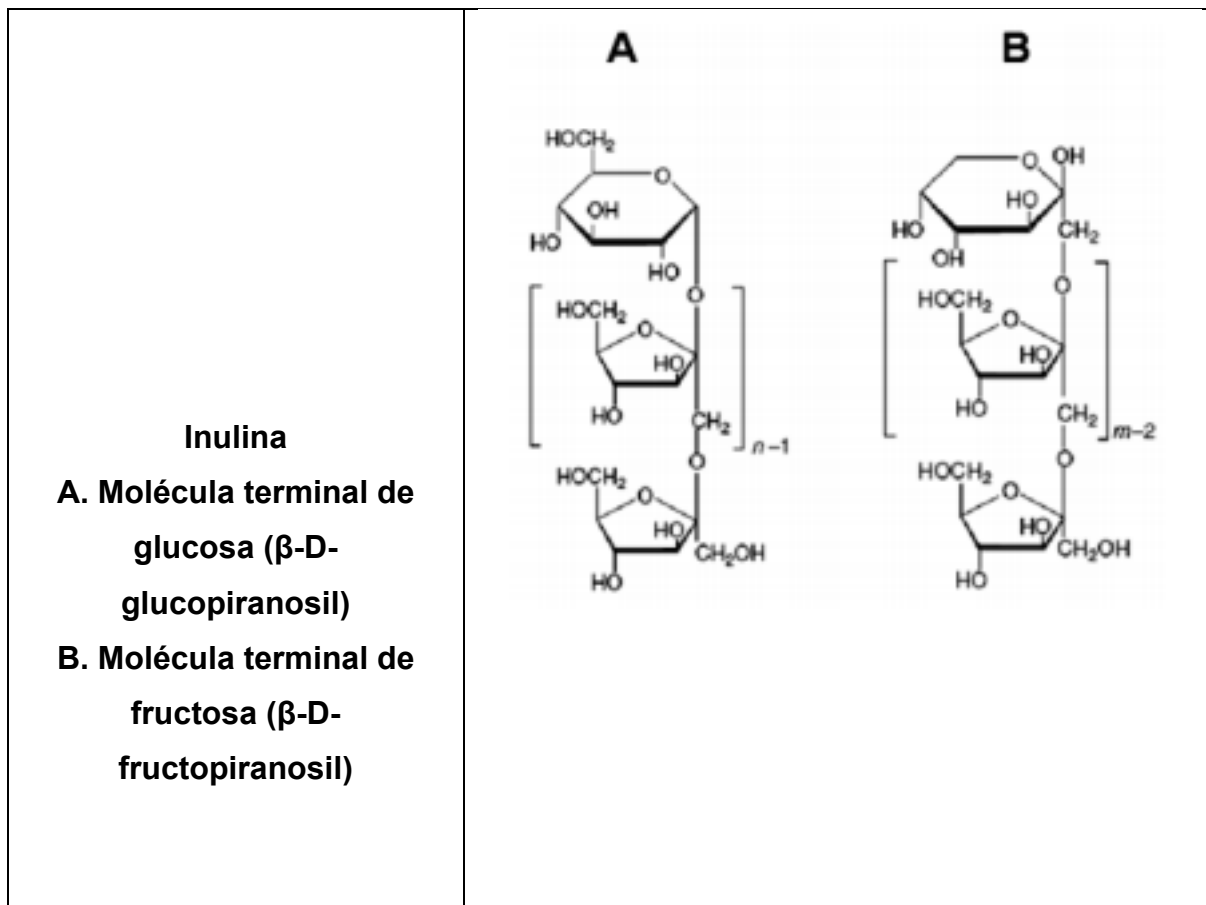
Tipos de oligosacáridos.
Prebióticos reconocidos
Fructo-oligosacáridos (FOS)
Galacto-oligosacáridos (GOS)
Transgalacto-oligosacáridos(TGOS)
Inulina
Isomalto-oligosacárido
Lactulosa
Pirodextrinas
Oligosacáridos de soya (SOS)
Prebióticos emergentes
Gluco-oligosacáridos
Genti-oligosacáridos
Lactosucrosa
Levanos
Pectino-oligosacáridos
Almidones resistentes
Xilo-oligosacáridos (XOS)

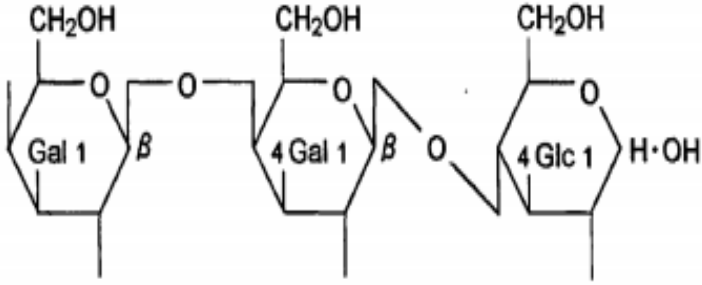
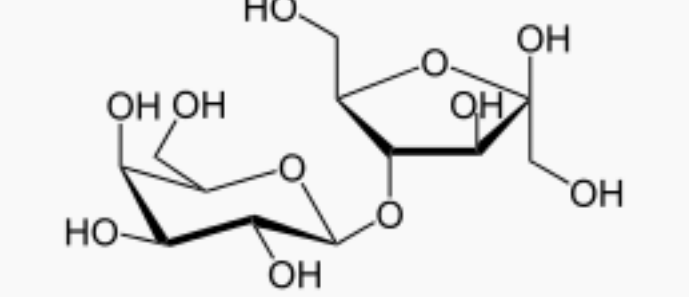
La ingesta de prebióticos eleva la cantidad de bacterias de los géneros: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, debido a que estas bacterias, utilizan los oligosacáridos como fuente de carbono, los fermentan y pueden crecer fácilmente. Los productos de fermentación son: ácidos grasos de cadena corta (SCFA's) como: ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico; gases como: dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), hidrógeno (H₂); ácido láctico (Anadón A. et al., 2010).

Algunos prebióticos u oligosacáridos (inulina, galacto-oligosacárido, lactulosa) (**Tabla 3**), pueden ser considerados como fibra soluble, pues aumentan la biomasa y peso de las heces; aumenta la frecuencia para defecar y tiene un efecto positivo para la mucosa del intestino. Sin embargo, si el consumo de prebióticos es muy elevado, más de 30 gramos por día, puede haber problemas como: flatulencia excesiva, diarrea y desórdenes abdominales (Anadón A. et al., 2010). Se han realizado estudios en donde se administran diferentes dosis de los prebióticos para poder identificar la dosis máxima recomendada para los prebióticos mencionados anteriormente. Llegaron a la conclusión que 10g por día, es una dosis que no presenta efectos secundarios en el organismo y proporcionan efectos benéficos; la dosis en donde se empezó a observar efectos secundarios como: diarrea, flatulencia y desórdenes abdominales fue de 31 a 41g por día

(Devrese, M., & Schrezenmeir, J., 2008). En otro estudio, cuyo objetivo era observar la severidad de diarrea provocada por dos hidratos de carbono no absorbibles, un fructooligosacárido conocido como Idolax y un disacárido de lactulosa, en una población de 12 individuos donde se administraron dosis crecientes de dichos hidratos de carbono (0, 20, 40, 80, 160g/d), se administraron durante tres días en una semana y se colectaron las muestras al tercer día para realizar diferentes estudios como: medición de pH, concentración de ácidos de cadena corta, residuos de Idolax o lactulosa, sodio, potasio, osmolaridad y ácidos orgánicos. Se observó que en las dosis más altas (80 y 160 g/d) el volumen de las heces aumento hasta casi 2 litros, sin embargo en algunos individuos no se observaron estos efectos, debido a que tienen mayor capacidad para fermentar este tipo de hidratos de carbono. Concluyendo que el efecto de dosis elevadas de prebióticos, depende de la microbiota que cada individuo tenga (Clausen, M. r. *et al.*, 1998).

Tabla 3. Estructura química de prebióticos.



<p>Galactooligosacárido</p>	
<p>Lactulosa</p>	

1.2.1.2 Probióticos.

Los probióticos, han sido definidos de distintas formas a lo largo de tiempo, sin embargo la más utilizada y actual es: "Los probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios en la salud del huésped cuando son administrados en una cantidad adecuada" (Guarner y Schaafsma, 1998; FAO/WHO, 2002; Anadón A. *et al.*, 2010; Kamlesh S. *et al.*, 2011).

Los microorganismos probióticos deben ser capaces no solo de sobrevivir a lo largo del tracto intestinal, si no también ser capaces de proliferar una vez que han llegado al intestino grueso. Esto significa que los microorganismos deben de ser resistentes a las enzimas pancreáticas, a los jugos gástricos y a la bilis (Klein *et al.*, 1998; Anadón A. *et al.*, 2010).

Los microorganismos que se pueden clasificar como probióticos deben de cumplir con ciertos criterios: (FAO/WHO, 2002; Kolida *et al.*, 2006; Anadón A. *et al.*, 2010; Kamlesh S. *et al.*, 2011)

1. Aislados del tracto gastrointestinal, preferentemente de humanos.
2. Tienen que ser reconocidos por la FDA (*Food and Drug Administration*), como aditivos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) generalmente reconocido como seguro.
3. Debe ser posible producirlos a gran escala, que sean viables y que estén en un vehículo adecuado para el consumo. Resistir al procesamiento de los alimentos y a su almacenamiento.
4. Presentar capacidad de adherencia en las células epiteliales del intestino y a la mucosa intestinal, para que proliferen y compitan contra microorganismos patógenos.
5. Producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, para atacar a microorganismos patógenos y faciliten el restablecimiento de la microbiota intestinal.
6. Demostrar en estudios aleatorizados, su eficacia y seguridad.
7. Presentar tolerancia a fagos.
8. Propiedades sensoriales agradables.

Algunos mecanismos por los cuales, los probióticos pueden controlar la colonización de patógenos en el intestino son: producción de sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas; exclusión competitiva de fijación de patógenos; competencia por los nutrientes; y modulación de sistema inmune (FAO/WHO, 2002).

Las cepas más utilizadas como probióticos son bacterias, de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, sin embargo, estos dos últimos géneros, tienen patógenos oportunistas, por lo que son usados en menor proporción que los dos primeros.

En la **tabla 4**, se enlistan los microorganismos que son utilizados como probióticos en alimentos.

Tabla 4. Microorganismos usados como probióticos (Cervantes G.A., 2014).

Lactobacillus	Bifidobacterium	Otras bacterias ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. calivarius</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>B. thermophilum</i>	
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

Para que los probióticos tengan un efecto benéfico en el organismo humano, deben de consumirse en las cantidades necesarias, o mejor conocida como dosis mínima terapéutica. Se ha determinado que la dosis mínima es de 10^8 UFC/día, de microorganismos viables y activos (Lourens A. *et al.*, 2001; Stanton C. *et al.*, 2003).

Algunos de los efectos benéficos son: incrementan la absorción de nutrimentos, previenen infecciones provocadas por microorganismos patógenos, promueven la digestión de lactosa, mejoran el sistema inmune, afectan positivamente el tránsito intestinal, entre otras (Anadón A. *et al.*, 2010).

Los microorganismos más utilizados como probióticos, pertenecen a los géneros de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Muchos de los probióticos son aislados de productos lácteos fermentados como el kefir, kule naoto (leche de vaca fermentada por la tribu Maasai en Kenia), kurut (leche de Yak), por mencionar algunos. El kefir, esta formado por gránulos que contienen diferentes levaduras y bacterias, algunas de estos microorganismos se aislan para ser usados como probióticos, por ejemplo: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Leuconostoc mesenteroides* (García G.M. *et al.*, 2009). *Lactobacillus plantarium* es aislado del kule naoto (Mathara J.M. *et al.*, 2008). En el kurut, podemos encontrar microorganismos como: *Streptococcus thermophilis* y *Lactobacillus delbrueckii*; los

cuales se pueden aislar para poder usarlos como probióticos en otros productos (Sun Z. *et al.*, 2010).

1.2.1.3 Consumo elevado de hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono, componen la mayor parte de la dieta humana, muchos de los cuales son digeridos por enzimas propias del cuerpo humano, los que no se pueden digerir llegan al colon en donde son fermentados por la microbiota intestinal, generando moléculas que pueden ser absorbidas y aprovechadas por el cuerpo humano como fuente de energía. Las moléculas que pueden utilizarse como fuente de energía, provenientes de la fermentación bacteriana en el intestino son los ácidos grasos de cadena corta (SCFA's), como: ácido acético, ácido propionico y ácido butírico (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Aproximadamente 40g de hidratos de carbono provenientes de la dieta llegan al colon, para ser fermentados por la microbiota presente. Los hidratos de carbono que llegan al colon son: almidones resistentes, polisacáridos no-almidonosos, y en menores proporciones mono y disacáridos (Cummings J.H., *et al.*, 1991).

Algunos prebióticos como la inulina, han mostrado que promueven el crecimiento de *Bifidocaterium sp.* y *Faecalibacterium prausnitzii*, este tipo de bacterias tienen efectos benéficos en la salud humana, aminora los síntomas de enfermedades del intestino inflamado. También se ha observado que en personas obesas, el consumo de inulina tiene la capacidad de disminuir los niveles de lipopolisacáridos, los cuales son tóxicos para el cuerpo humano (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Se ha observado que si se cambia la cantidad y proporción de hidratos de carbono, por más de cuatro semanas, el cambio en la microbiota intestinal es profundo y rápido. Cuando en la dieta se favorece el consumo de hidratos de carbono complejos, los géneros *Prevotella* y *Xylanibacteres* pertenecientes a las Bacteroidetes (Gram negativas), se encuentran en mayor proporción. Cuando la ingesta de hidratos de carbono en general, se disminuye, como una medida para

bajar de peso, las Firmicutes (Gram positivas) disminuyen; el cambio en la proporción de bacterias es mayor que la pérdida de peso (Abell GCJ, *et al.*, 2008).

1.2.1.4 Consumo elevado de proteínas.

Las proteínas son el siguiente mayor componente de la dieta humana, existen muchas enzimas que degradan las proteínas, sin embargo, la proteína que proviene de vegetales es ligeramente menos digerible que las proteínas de origen animal (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Aproximadamente 12 a 18g de proteínas provenientes de la dieta llegan al colon, es aquí donde hay un recambio de proteínas, estas proporcionan el nitrógeno necesario para el crecimiento de bacterias de la microbiota intestinal (Cummings JH, *et al.*, 1991).

Las proteínas que alcanzan a llegar al colon, son degradadas o digeridas por la microbiota presente en el colon. Las bacterias proteolíticas predominantes en la microbiota son Bacteroidetes (Gram negativas), específicamente *Bacillus fragilis* y *Clostridium perfringens*, hacen reacciones de desaminación y descarboxilación, generando productos metabólicos benéficos como, ácido grasos de cadena corta, y otros tóxicos como: aminas, compuestos nitrosos, amoniaco, compuestos fenólicos y compuestos azufrados. Muchos de estos compuestos dependen de la cadena de aminoácidos que forma la proteína que ha sido fermentada por la microbiota intestinal (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Si la dieta es elevada en proteínas, puede haber un aumento de pH en el colon, debido al amoniaco, éste afecta las células del intestino y puede ser un promotor de tumores, sin embargo, la mayoría del amoniaco, es absorbido y transformado en el hígado para desecharse por la orina (Scott K, *et al.*, 2013). Además del aumento de amoniaco, también aumenta la concentración de p-Cresol, el cual se produce a partir de aminiácidos aromáticos, éste metabolito tóxico daña el ADN de las células epiteliales, esta relacionado con el desarrollo de cáncer de colon. El p-Cresol es desechado a través de las vías urinarias, por lo que puede causar fallas

en el riñón. En algunos experimentos se ha observado que en presencia de hidratos de carbono y pH de 5.5 a 6 en el lumen intestinal, la producción de p-Cresol disminuye considerablemente (Rajilić-Stojanović M., 2013).

1.2.1.5 Consumo elevado de lípidos.

La mayor parte de los lípidos, provenientes de la dieta, son absorbidos en el intestino delgado, sin embargo 7% se excreta en las heces (Gabert L., *et al.*, 2011).

Se han realizado estudios, en donde, por 12 semanas se alimenta a un grupo de ratones con una dieta elevada en lípidos y a otro grupo con una dieta chow; donde la dieta chow contiene 5.28% de grasa y 61.3% de hidratos de carbono, y la dieta elevada en lípidos contiene 34.9% de lípidos y 26.3% de hidratos de carbono. Se comparó la microbiota de ambos grupos, encontrando diferencias significativas, en los ratones alimentados con la dieta elevada en lípidos los géneros de bacterias incrementados fueron: *Mollicutes sp.*, *Erysipelotrichaceae sp.*, *Lawsonia sp.*, *Desulfovibrio sp.* y *Lactococcus sp.* Posteriormente durante las siguientes 10 semanas se alimentaron a ambos grupos con una dieta chow, y no se encontraron diferencias en la microbiota, lo que quiere decir que la microbiota responde a la dieta. Con la dieta elevada en lípidos se observó una disminución significativa en *Roseburia spp.*, también se observó que al disminuir esta especie, los genes bacterianos involucrados en la absorción de ácidos grasos están más activos, aumenta la colesterolemia y hay aumento de peso (Zhang C, *et al.*, 2012).

1.2.2 Antibióticos.

Existen muchos factores que pueden alterar la microbiota normal de un individuo sin embargo, el uso de antibióticos afecta drásticamente este ecosistema. Muchos antibióticos de alto espectro como la ciprofloxacina, cuyo mecanismo de acción es bloquear la actividad de la enzima ADN girasa, impidiendo de esta forma la replicación bacteriana (usado comúnmente para tratar infecciones respiratorias,

infecciones urinarias, enfermedades de transmisión sexual, entre otras) alteran hasta una tercera parte de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal, causando pérdida en la diversidad (Dethlefsen L *et al.*, 2008).

Los antibióticos actúan de diferentes formas, pueden atacar a la membrana celular; pared celular; y principalmente a moléculas u organelos implicados en la transcripción, traducción y replicación del ADN.

Los tratamientos con antibióticos pueden generar espacios o huecos, disponibles para que microorganismos no innatos de la microbiota intestinal, puedan colonizar y provocar enfermedades en el huésped. Un ejemplo de esto es la colonización de *Clostridium difficile*, la cual provoca diarrea y está relacionado con el desarrollo de colitis (De La Cochetière M. F. *et al.*, 2005; Gautam D. *et al.*, 2013).

Los tratamientos con antibióticos son generalmente de 5 a 7 días, durante este tiempo la microbiota es afectada, sin embargo, muchos microorganismos de la microbiota intestinal son resistentes, y después de 60 días aproximadamente, pueden restablecerse prácticamente al 100%; existen casos en los que la microbiota no se restaura por completo y es cuando se presentan los desordenes crónicos como la colitis y el síndrome del intestino irritable (De La Cochetière M. F. *et al.*, 2005).

1.2.3 Epigenética.

La epigenética, recientemente se ha definido como: cambios en la expresión de genes, los cuales no se pueden explicar por cambios en la secuencia de ADN, es decir, es la suma de la cromatina (histonas y ADN). Dependiendo del estilo de vida de cada persona, las metilaciones en el ADN cambian, lo que significa silenciar o activar genes; estas metilaciones están mediadas por: la alimentación, actividad física, contaminación, hábitos, entre otras (Toubal A. *et al.*, 2013).

Se han realizado estudios en donde se tienen gemelos, uno obeso y el otro delgado, se toma la microbiota presente en las heces de estos individuos y se inocula en ratones libres de gérmenes; éstos se alimentan con una dieta chow ad

libitum y al cabo de 15 días se hacen estudios donde se revela que los ratones inoculados con la microbiota del gemelo obeso presentan mayor acumulación de grasa en los adipositos y una ganancia de peso mayor, comparándolos con los ratones inoculados con la microbiota del gemelo delgado. También se encontraron niveles elevados de cadenas ramificadas de aminoácidos, característicos de personas obesas y resistentes a la insulina, en los ratones inoculados con la microbiota del gemelo obeso. Se realizó otro experimento en donde, a los ratones previamente inoculados con la microbiota del gemelo obeso, se les inocula de nuevo pero ahora con la microbiota del gemelo delgado, y viceversa. Se observó que los ratones con la microbiota del obeso, inoculados de nuevo pero con la microbiota del gemelo delgado, disminuyeron de peso y la grasa contenida en los adipositos también disminuyó, la expresión de genes microbianos fue similar a la de los ratones inoculados con la microbiota del gemelo delgado; en los ratones que se inocularon primero con la microbiota del gemelo delgado y después con la microbiota del gemelo obeso, no se observaron cambios de peso ni de grasa contenida en los adipositos, así como tampoco en los genes microbianos expresados. Esto significa que, la micribiota del gemelo obeso es más inestable, provocando que que la microbiota del gemelo delgado, una vez inoculada, pueda establecerse en el intestino como la microbiota nativa, y realizar las funciones metabólicas que son favorables para la salud (Ridaura, V. K. *et al.*, 2013).

1.2.4 Sistema Inmune.

Los microorganismos contribuyen significativamente en enfermedades sistémicas, mediante la traducción de genes y activación de sistema inmune; o circulando metabolitos, los cuales llegan al hígado o al sistema circulatorio sistémico a través de la vena porta (Salonen A. *et al.*, 2014).

El sistema inmune en ocasiones puede mal interpretar señales, y atacar a células y tejidos propios del huésped, produciendo células T, generando enfermedades autoinmunes. La microbiota intestinal influencia la producción de estas células; *Bifidobacterium infantis* induce CD4⁺ y CD25⁺ la cuales inhiben la activación de NF-κB, el cual es un complejo proteico que controla la transcripción de ADN en respuesta inmune, inflamación, crecimiento celular y apoptosis; cuando su

activación es inhibida, se pueden desencadenar enfermedades autoinmunes. *Bacillus fragilis*, juega un papel muy importante en la protección contra la colitis, pues induce IL-10 la cual tiene propiedades antiinflamatorias (Sathyabama S. *et al.*, 2014).

El género *Mycobacterium* se encuentra presente en la microbiota normal, sin embargo, *Mycobacterium avium* es responsable de la tuberculosis, cuando el sistema inmune ataca dicha enfermedad activa al gen *PTPN22*, el cual esta directamente relacionado con enfermedades autoinmunes como: artritis reumatoide, lupus y diabetes mellitus. Por otro lado géneros que son considerados amigables con el ser humano como: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, regulan el gen *ACE*, el cual también se relaciona con enfermedades autoinmunes (Proal A. D. *et al.*, 2009). En la **figura 6**, está esquematizado la relación de los genes con algunas enfermedades.

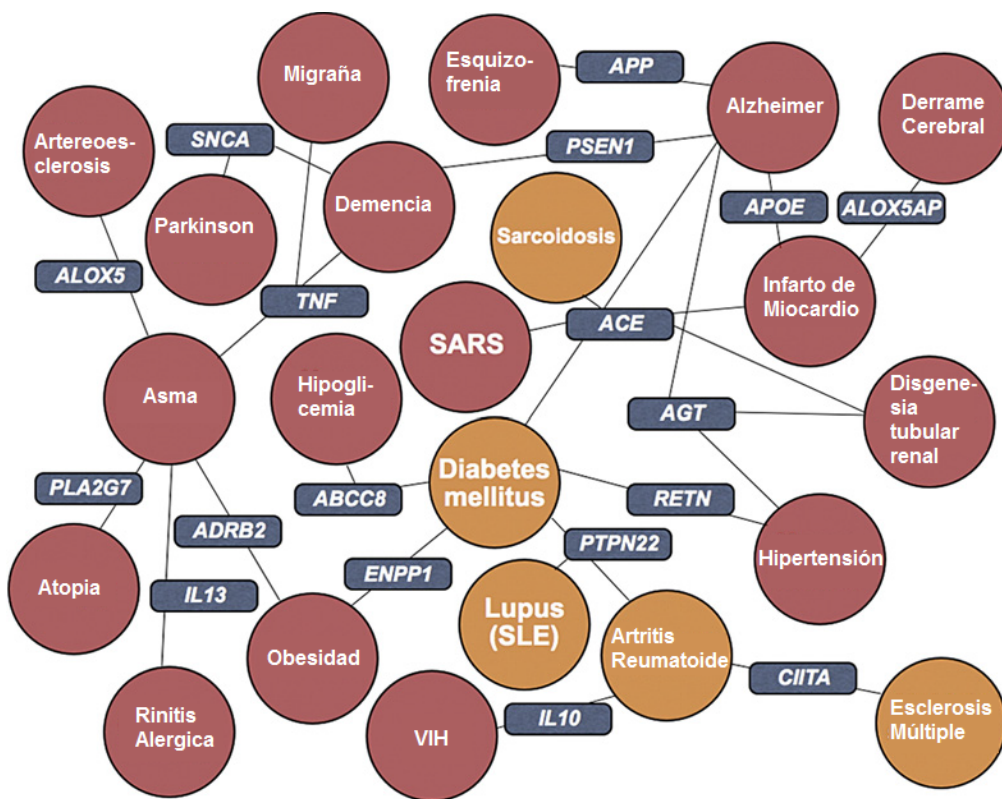


Figura 6. Relación entre enfermedades y genes (Goh K.I. et al. 2007). Enfermedades autoinmunes (NARANJA), otras enfermedades inflamatorias (ROJO).

1.2.5 Etapas de la vida.

Un neonato está libre de microorganismos, una vez que nace comienza a ser colonizado por las bacterias presentes en el ambiente que lo rodea. Los microorganismos que colonizan al recién nacido, van a depender de: la forma de nacimiento, de el lugar de nacimiento y del régimen alimenticio. En general se pueden mencionar los géneros de la microbiota más representativos de los recién nacidos: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* y *Clostridium* (Duncan H. S. *et al.*, 2013; Di Gioia d. *et al.*, 2014). La forma de nacimiento también es importante considerarla, es decir, vía vaginal o cesárea. Si el bebé nace vía vaginal, la microbiota que va a colonizar el intestino del recién nacido, proviene de la microbiota que se encuentra alojada en el canal de parto y también en las heces de la madre. Si el nacimiento es vía cesarea la microbiota que colonizará al bebé dependerá del ambiente que lo rodea.

Una vez que el infante puede ingerir comida sólida, aproximadamente a los 6 meses de edad, la composición de la microbiota intestinal cambia, pues ahora el intestino está expuesto a hidratos de carbono más complejos y a otros nutrientes que la leche materna y la formula láctea no tienen (Di Gioia d. *et al.* 2014). Después de 1 mes de alimentar a un infante con comida sólida, *Bacteroides* sigue siendo uno de los grupos predominantes, sin embargo, el número de *Bifidobacterium*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*, decrece; y otros microorganismos estrictamente anaerobios comienzan a aparecer (Fallani M. *et al.*, 2011).

Después de esta primera etapa, la microbiota intestinal comienza a ser mucho más diversa, la proporción de microorganismos que la van a formar, va a depender prácticamente de la alimentación y del uso de antibióticos. Los phylum predominantes de la microbiota de un adulto sano, como ya lo hemos visto anteriormente, son: Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias (Duncan H. S. *et al.*, 2013). Algunos de las bacterias más representativas se enlistan en la **tabla 5**.

Tabla 5. Especies predominantes en el intestino humano (Walker A. W. et al. 2011).

Especie bacteriana	Phylum
<i>Anaerostipes hadrus</i>	Firmicutes
<i>Bacteroides dorei</i>	Bacteroidetes
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Bacteroidetes
<i>Blautia wexleri</i>	Firmicutes
<i>Clostridium clostridioforme</i>	Firmicutes
<i>Collinsella aerofaciens</i>	Actinobacteria
<i>Eubacterium hallii</i>	Firmicutes
<i>Eubacterium rectale</i>	Firmicutes
<i>Faecalibacterium praosnitzii</i>	Firmicutes
<i>Ruminococcus bromii</i>	Firmicutes

Durante la vejez la microbiota intestinal disminuye respecto a su diversidad. El género *Bifidobacterium* disminuye y el género *Enterobacteriaceae* aumenta. Desde un punto de vista general las especies bacterianas que conforman la microbiota intestinal en esta etapa de la vida son: *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Oscillibacter*, *Alistipes* y *Odoribacter* (Claesson M. J. et al. 2012).

En la **figura 7** se resume el tipo de microbiota intestinal en cada etapa de la vida.

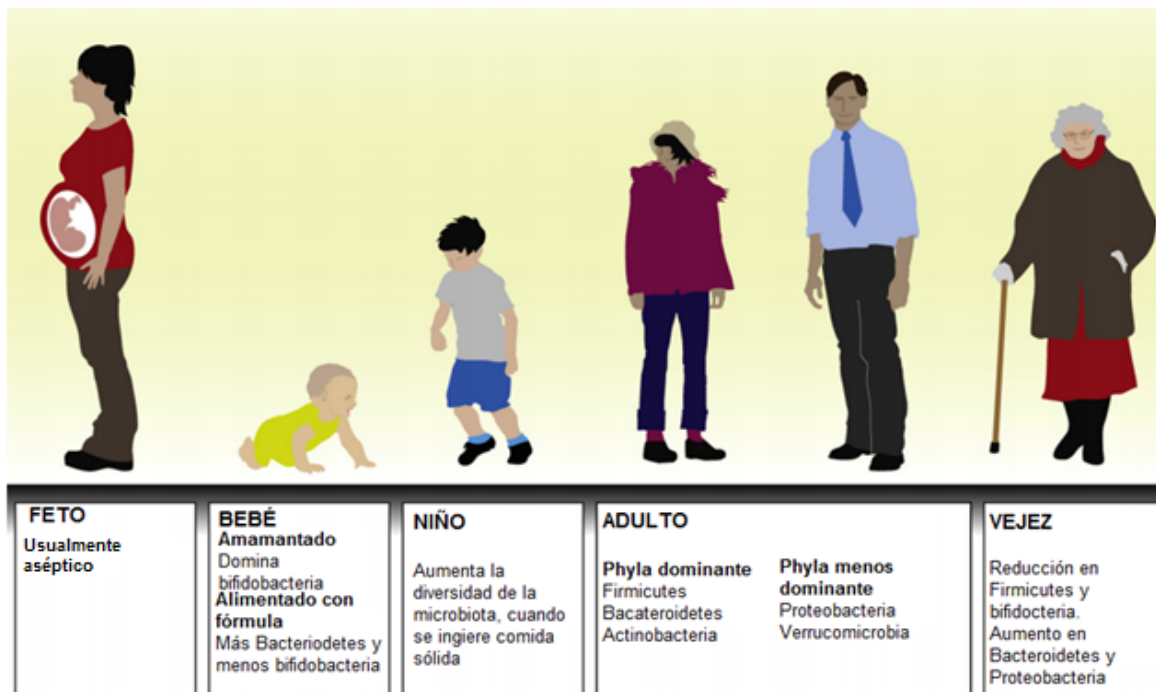


Figura 7. Cambios en la microbiota intestinal, a través de las diferentes etapas de la vida (Duncan H. S. et al. 2013).

La diversidad de la microbiota intestinal a lo largo de la vida, puede ser un factor que predispone al desarrollo de ciertas enfermedades como: diabetes mellitus, enfermedades de inflamación del intestino, cáncer de colon, alérgias, enfermedades autoinmunes, por mencionar algunas. Estas enfermedades pueden prevenirse con una dieta adecuada, dependiendo de la etapa de vida que se está viviendo.

Capítulo 2.

Productos metabólicos de importancia para la salud, provenientes de la microbiota.

El microbioma o genoma microbiano, excede en dos órdenes de magnitud el tamaño del genoma humano, es aquí donde encontramos la información necesaria para realizar funciones metabólicas y bioquímicas que el ser humano no puede realizar por sí solo.

La dieta diaria que consume el ser humano, está formada por hidratos de carbono complejos (celulosa, almidones resistentes, pectinas, por mencionar algunos), hidratos de carbono simples (glucosa, lactosa, fructosa, por mencionar algunos), proteínas y lípidos. Los microorganismos que forman la microbiota intestinal, se encargan de fermentar y/o biotransformar la mayoría de estos, generando productos de importancia para el cuerpo humano. También se encarga de biotransformar moléculas como los ácidos biliares, de ácido biliares primarios a secundarios, los cuales son tóxicos para los enterocitos y los hepatocitos.

Muchos de los metabolitos que son formados por la microbiota intestinal, tienen funciones de gran importancia para mantener un estado de salud adecuado, o bien son precursores de cierta enfermedades. A lo largo de este capítulo se discute como se forman estos compuestos de interés y las repercusiones de cada uno de ellos.

2.1 Ácidos grasos de cadena corta (SFCA's).

En el colon, en la parte más anaerobia del intestino, es donde se encuentran bacterias que se encargan de fermentar los hidratos de carbono complejos. La fermentación de estos hidratos de carbono complejos, se considera como un proceso benéfico para la salud ya que contribuye al aprovechamiento máximo de energía proveniente de la dieta. El ser humano, ha desarrollado la habilidad de

aprovechar y absorber los productos de la fermentación, uno de los productos de fermentación mayoritarios son los SCFAs (por sus siglas en inglés *short-chain fatty acids*) específicamente: acetato, propionato y butirato (Musso G. *et al.*, 2011) en una proporción de 60:25:15 (Vipperla K. & O'Keefe S.J., 2012)

La conversión de piruvato a cualquiera de los SCFAs, genera una molécula más de ATP. En la **figura 8**, se pueden observar algunas vías alternativas para formar acetato, propionato y butirato. La producción de SCFAs representa aproximadamente el 60% de la energía contenida en los hidratos de carbono consumidos (Louis P. *et al.*, 2009). Como ya se mencionó en el capítulo anterior, la dieta está constituida aproximadamente de 40 g de hidratos de carbono, la fermentación de estos hidratos de carbono, genera 0.4 moles de SCFAs, los cuales aportan 140-150 kcal. Aporta casi el 10% del requerimiento calórico (Musso G. *et al.*, 2011;).

Los SCFAs, son fuente de energía para muchas células del cuerpo, por ejemplo: el butirato es la fuente preferida por las células del epitelio del colon, en donde es convertido a cuerpos cetónicos u oxidado a dióxido de carbono (Louis P. *et al.*, 2009).

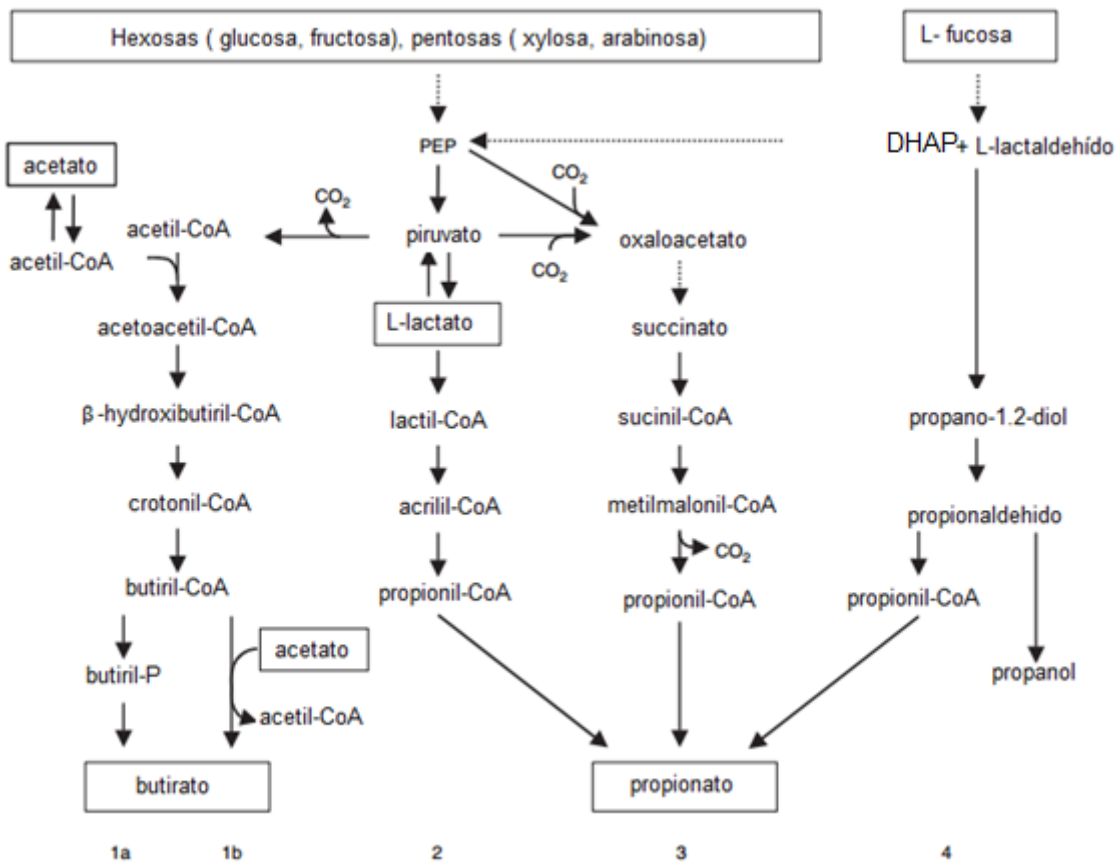


Figura 8. Vías alternativas para la síntesis de butirato (1) y propionato (2-4); 1a, vía butirato cinasa; 1b, vía butiril-CoA; 2, vía acrilato; 3, vía succinato; 4, vía propanodiol. Flechas punteadas indican varios intermediarios. DHAP, Dihidroxiacetona fosfato; P, fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato (Louis P. et al 2007).

El acetato y propionato que han sido absorbidos en el intestino, llegan al hígado, donde la mayoría del propionato entra a la vía de la gluconeogénesis; y el acetato a la vía de la lipogénesis. Se ha observado en ratones que el acetato también llega a otras células como colonocitos y adipocitos, en donde es sustrato para la lipogénesis (Elia M., 2007)

Los SCFAs, particularmente el butirato, tienden a disminuir el pH del colon, limitando de esta forma el crecimiento de bacterias patógenas como ciertas *Enterobacterias* (Musso G. et al., 2011; Vipperla K. & O’Keefe S.J., 2012), inhiben la degradación de los ácidos biliares primarios a secundarios, disminuyendo así los efectos tóxicos de éstos (Vipperla K. & O’Keefe S.J., 2012). En la **tabla 6**, se enlistan los roles que desempeñan los tres principales SCFAs.

Tabla 6. Acción principal de los ácidos grasos de cadena corta (Vipperla K. & O'Keefe S.J., 2012).

SCFA	Sitio de acción	Acción principal
Ácido propiónico	Hígado y tejido adiposo	Metabolismo: sustrato para gluconeogénesis, disminuye la síntesis hepática de colesterol. Anti-inflamación: regula la actividad de la ciclooxigenasa; inhibe NF-κB. Antimicrobiano: inhibe la expresión de genes que facilitan a <i>Salmonella typhimurium</i> , penetrar el epitelio intestinal. Mejora la sensibilidad a la insulina: inhibe la lipólisis y promueve la lipogénesis en tejido adiposo visceral, suprime la formación de ácidos grasos en el hígado, el estado inflamatorio es menor, mitiga la resistencia a la insulina causada por la interacción de los ácidos grasos. Saciedad: promueve la saciedad mediante vía neuronal, endócrina, pancreática y autocrina; influencia la producción de hormonas adipocinéticas como la leptina.
Ácido butírico	Colonocitos	Anticancerígeno: inhibe la histona diacetilasa, provocando hiperacetilación de histonas y dificulta la accesibilidad de los factores de transcripción, al ADN nucleosomal, regulando la expresión de genes y el funcionamiento celular; mejora la actividad de enzimas detoxificantes como la glutation-S-transferasa, inhibe la migración de células tumorales mediante la inhibición del factor de decaimiento acelerado. Anti-inflamación: suprime la activación de NF-κB mediante la inhibición de histonas diacetilasas, inhibe la producción y/o activación de interferón-γ. Reforzamiento de defensa de la barrera del colon: incrementa la expresión del gen MUC2, el cual estimula la síntesis de mucina.
Ácido acético	Hígado, músculo y otros tejidos periféricos	Metabolismo: sustrato principal para la síntesis de colesterol.

2.2 p-cresol, ácido sulfhídrico (H₂S), compuestos N-nitrosos, Isovalerato.

La fermentación de proteínas de origen animal o vegetal, da como resultado algunos metabolitos que son tóxicos para el cuerpo. Cuando el consumo proteínico es elevado, estos metabolitos elevan su concentración, causando

enfermedades degenerativas como cáncer de colon, falla renal, úlceras, colitis, por mencionar algunas.

El p-cresol es un metabolito tóxico producido a partir de la fermentación de aminoácidos aromáticos, causa daño al ADN de las células epiteliales y está relacionado con el desarrollo de cáncer de colon. La eliminación del p-cresol es a través del tracto urinario, lo que también provoca falla renal. Se han realizado experimentos donde se observa que la producción de p-cresol disminuye cuando el pH del intestino es bajo por la presencia de SCFAs. Esto sugiere que si se tiene una dieta balanceada, en donde los hidratos de carbono sean el componente mayoritario, los metabolitos que la microbiota intestinal producirá serán mayoritariamente, los benéficos para la salud y no los tóxicos (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Debido al contenido de azufre en algunos aminoácidos, cuando los microorganismos fermentan este tipo de aminoácidos, producen metabolitos como ácido sulfhídrico (H_2S), el cual es bastante tóxico, pues incrementa apoptosis en la mucosa, depleción de células calciformes, ulceración superficial y daño en el ADN genómico. Existen varias vías por las cuales se puede producir H_2S : por la acción de bacterias reductoras de sulfatos, que utilizan hidrógeno y sulfatos provenientes de derivados de la dieta o de la mucina sulfatada; por la degradación de taurina, liberada por la desconjugación de los ácidos biliares primarios o la que está presente en la dieta (carne y bebidas energéticas); por la degradación de proteínas. Se ha demostrado que existe una correlación lineal entre la cantidad de consumo de carne y la excreción de H_2S en las heces (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Los compuestos N-nitrosos son metabolitos asociados a la digestión de proteínas, estos compuestos son carcinogénicos, son sintetizados en el tracto gastrointestinal, cuando los grupos aminos de los aminoácidos reaccionen con nitratos en el pH ácido del estómago, o bien por acción de enzimas bacterianas presentes en la microbiota intestinal (Rajilić-Stojanović M., 2013).

En la **figura 9**, se muestran algunas vías por las cuales se pueden metabolizar las proteínas, y los principales microorganismos encargados de dicho proceso.

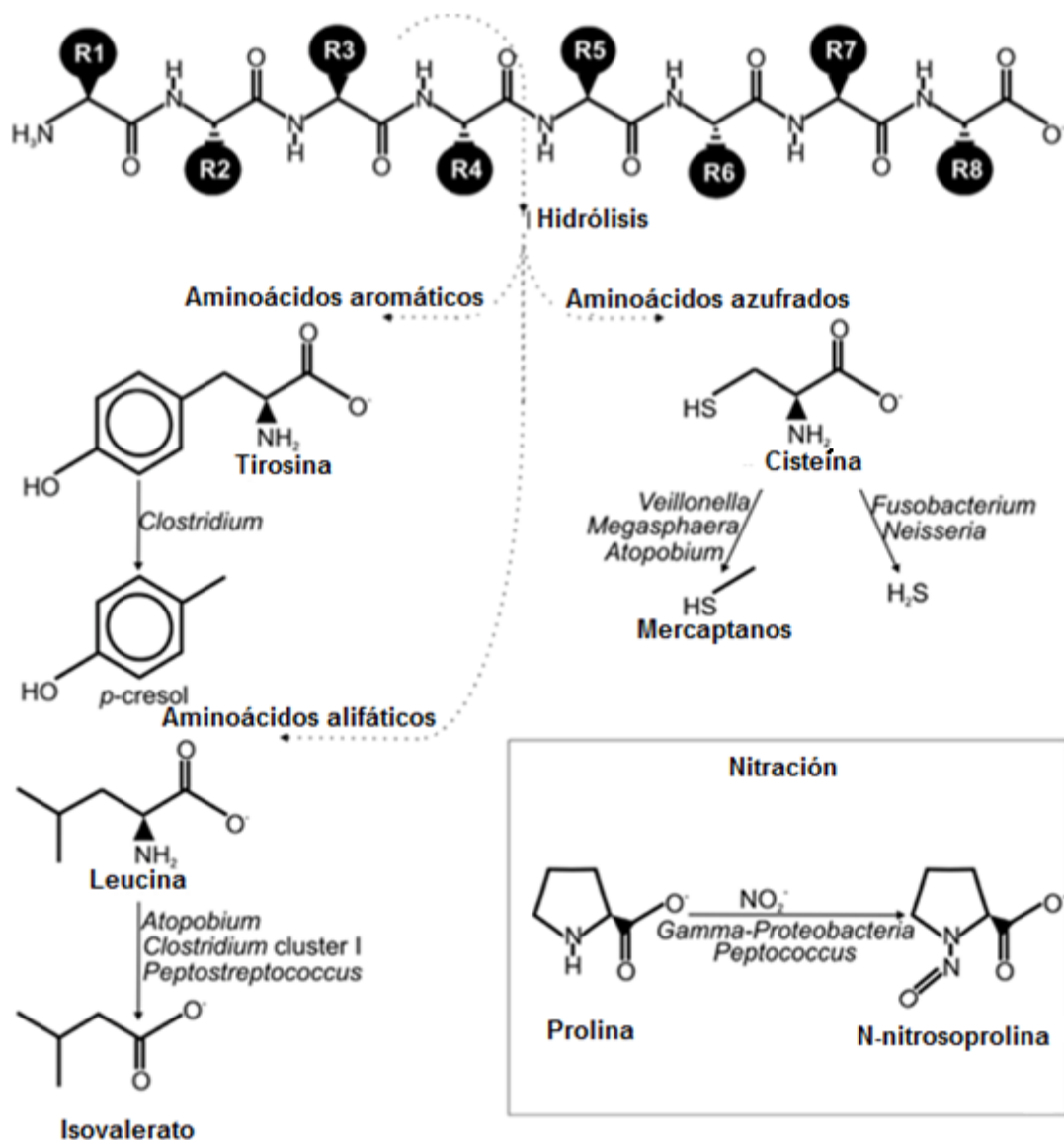


Figura 9. Principales vías de fermentación proteínica y grupos microbianos asociados a dicha fermentación (Rajilić-Stojanović M., 2013).

2.3 Ácido linoléico conjugado (CLA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA).

Algunos microorganismos de la microbiota intestinal, tienen la habilidad de producir ácidos grasos con actividad biológica como: ácido linoleico conjugado CLA, por sus siglas en inglés *conjugated linoleic acid*, específicamente el cis-9,

trans-11; el ácido eicosapentanoico EPA, por sus siglas en inglés *eicosapentanoic acid*; y el ácido docosahexanoico DHA, por sus siglas en inglés *docosahexanoic acid* (Figura 10).

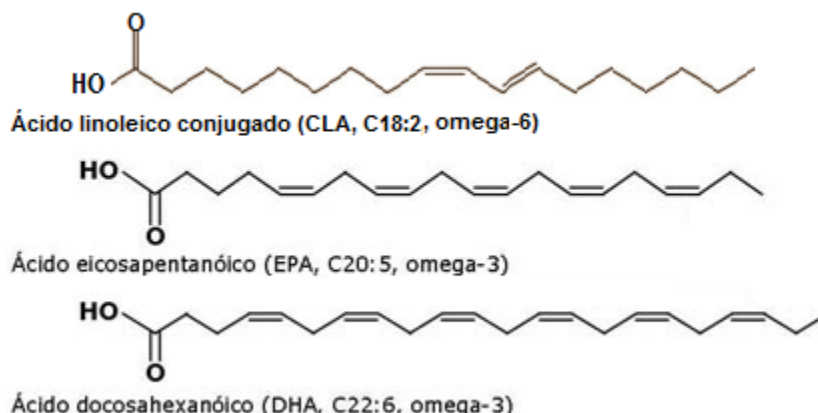


Figura 10. Estructura de ácidos grasos de importancia para la salud que pueden ser generados por la microbiota intestinal.

El CLA, tiene propiedades favorables contra la diabetes, obesidad y en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés *nonalcoholic fatty liver disease*); promueve la disminución del colesterol y de azúcar en sangre, inhibe la proliferación celular, baja los niveles de grasa corporal y actúa como inmunoregulador, entre otras (Baddini F.A. *et al.*, 2009; Wall R. *et al.*, 2009). El EPA y el DHA, son ácidos grasos pertenecientes al grupo de omega-3, los cuales disminuyen la cantidad de lípidos en la sangre y presentan propiedades antiinflamatorias (Wall R. *et al.*, 2009; Musso G. *et al.*, 2011). Esto es posible debido diferentes mecanismos:

- Disminuye la síntesis hepática de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés, *very low density lipoprotein*).
- Incrementa la lipólisis periférica, inhibe la síntesis y secreción de quilomicrones.
- Reduce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 (moléculas de adhesión de células endoteliales) y reduce la adhesión de monocitos a las células endoteliales.

- Reduce la producción de moléculas del tipo leucotrieno B₄ (actúan como atrayentes de células circulantes proinflamatorias) e inhiben la expresión del factor de transcripción NF-κB (García-Ríos A. *et al.*, 2009).

Los géneros bacterianos que se relacionan con la producción de CLA, EPA y DHA, son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La formación de CLA, es una biotransformación que realizan bacterias a partir del ácido linoléico proveniente de la dieta. La concentración de estos ácidos grasos poliinsaturados depende de la proporción de microorganismos y de la dieta del huésped (Wall R. *et al.*, 2009).

2.4 Ácidos biliares secundarios.

Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de colesterol, su función es: emulsificar la grasa proveniente de la dieta y absorberla; transportar vitaminas liposolubles; excretar drogas y toxinas. Los ácidos biliares son moléculas anfifílicas y es debido a esta propiedad que pueden realizar las funciones antes mencionadas (Bertram *et al.*, 2013).

Los ácidos biliares que se sintetizan en el hígado son conocidos como primarios, la microbiota intestinal se encarga de hacer cambios estratégicos para formar ácidos biliares secundarios. Estos cambios son: desconjugación y dehidroxilación (Musso G. *et al.*, 2011; Bertram *et al.*, 2013). En la **figura 11**, se muestran la biotransformación de los ácidos biliares primarios a secundarios.

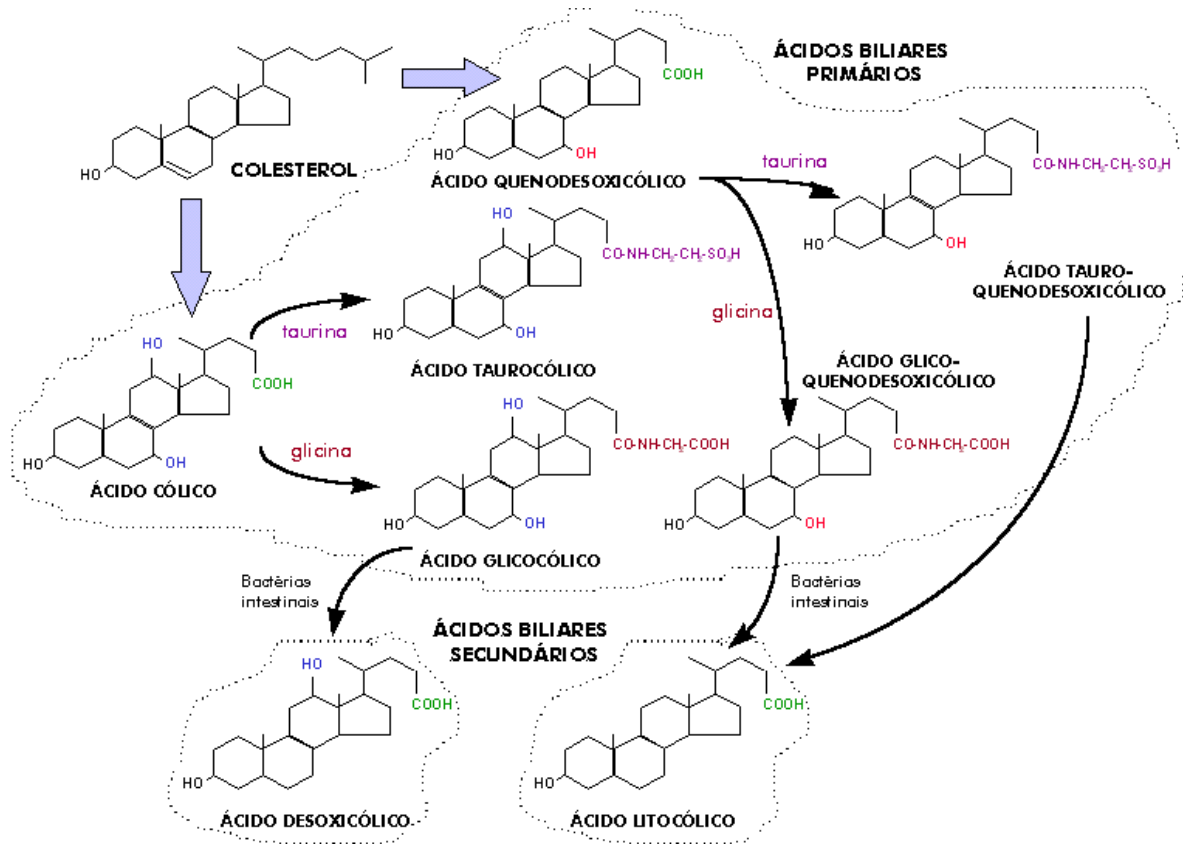


Figura 11. Ácidos biliares primarios y secundarios. Desconjugación y dehidroxilación.

El receptor X farsenoide FWR, por sus siglas en inglés *farsenoid X receptor*, es el encargado de regular la generación de ácidos biliares y también se encarga de regular vías metabólicas como: lipogénesis hepática; gluconeogénesis hepática; síntesis de glucógeno en músculo; y sensibilidad a la insulina (Duseja, A., & Chawla, Y. K., 2014; O'Connell, K., & Brasel, K., 2014). Cuando esta activado se promueve la oxidación de ácidos grasos y triglicéridos (Musso G. *et al.*, 2011).

La microbiota intestinal desconjuga los ácidos biliares primarios, debido al poder antimicrobiano de estos. Los microorganismos encargados de desconjugar a los ácidos biliares primarios se encuentran en el íleon y parte superior del colon (Bertram *et al.*, 2013), particularmente los géneros de *Clostridium*, *Bacteroides* y *Enterobacteria* (Musso G. *et al.*, 2011). Al quitarles la glicina o taurina, genera los ácidos biliares secundarios y estos son tóxicos para los enterocitos y los hepatocitos. Si el huésped consume una dieta alta el grasa y en hidratos de

carbono simples, la acumulación de estos ácidos biliares secundarios es mayor y puede provocar enfermedad de hígado graso no-alcohólico (NALFD), así como dislipidemia, cálculos biliares, pancreatitis, por mencionar algunas (O'Connell, K., & Brasel, K., 2014).

Se han realizado experimentos donde se comprueba que los ácidos biliares secundarios tiene propiedades antiinflamatorias, mediante la activación del receptor TGR5 (Rajilić-Stojanović M., 2013), el cual inhibe la producción de citocinas proinflamatorias (Stepanov V. *et al.*, 2013) En la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés *inflammatory bowel disease*), debido a la disbiosis presente en el intestino, la biotransformación de los ácidos biliares primarios a secundarios, es menor a la normal, esto provoca que la disbiosis incremente debido al poder antimicrobiano de los ácidos biliares primarios, y que las propiedades antiinflamatorias de los ácidos biliares secundarios, no tengan los efectos favorables esperados (Rajilić-Stojanović M., 2013).

Capítulo 3.

Diabetes mellitus.

3.1 Generalidades de la diabetes mellitus.

En el siglo II d.c., Galeno describe a la diabetes como una enfermedad de los riñones e insiste que la poliuria es la responsable de la caquexia de los diabéticos. Se nombró por primera vez a esta enfermedad como diabetes lo que en griego significa “correr a través”, fue nombrada así por Areteo de Capadocia. Cullen añadió a esta enfermedad el término mellitus, que significa “dulce” (Roche. 2001).

La concentración de glucosa en sangre, es controlada por la insulina que es una hormona producida por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas y se encarga de introducir la glucosa a las células (Clark, P., & McDonald, T., 2013).

La diabetes mellitus es una enfermedad donde la concentración de la glucosa en sangre es anormalmente alta (hiperglucemia). Esto se debe a tres causas: insuficiencia en la secreción de la insulina; que la insulina no pueda introducir la glucosa a las células; o ambas (Clark, P., & McDonald, T., 2013).

Esta enfermedad se trata mediante la dieta y administrando insulina o drogas que aumenten la secreción de ésta o que incrementen la sensibilidad (Clark, P., & McDonald, T., 2013).

En la **tabla 7**, se realiza una clasificación de las posibles causas que ocasionan diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es clasificada en dos tipos: uno y dos; existen características clínicas al momento de diagnosticar cualquiera de esto dos tipos: poliuria, sed, debilidad, polifagia con pérdida de peso, visión borrosa recurrente, vulvovaginitis, neuropatía periférica y enuresis nocturna. Estas características clínicas pueden o no estar presentes en cualquiera de los dos tipos (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Existen varios análisis que se realizan para diagnosticar la diabetes mellitus o bien para monitorear a los pacientes con dicha enfermedad. Estos análisis son: cuantificación de glucosa y cuerpos cetónicos en orina; cuantificación de glucosa en sangre entera y plasma en ayunas y después de administrar glucosa; pruebas de hemoglobina glucosilada; medición de concentraciones de insulina o péptico C (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Tabla 7. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus (Modificado de Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Tipo de Diabetes mellitus	Problemas relacionados	Causa
Diabetes Mellitus tipo 1	Destrucción de células β que, por lo general, conduce a una deficiencia absoluta de insulina.	1. De mediación inmune, tipo 1a 2. Idiopática, tipo 1b
Diabetes Mellitus tipo 2	Puede variar del predominio de la resistencia al predominio de un defecto secretorio con mínima resistencia a la insulina.	
Otros tipos específicos	Defectos genéticos autosómicos dominantes de las células β del páncreas.	1. Diabetes hereditaria juvenil del tipo 2 (MODY) 2. Gen de la insulina (INS) 3. Canal de potasio sensible a ATP (KCNJ11 y ABCC8)
	Otros defectos genéticos de las células β pancreáticas.	1. Defectos genéticos autosómicos recesivos 2. ADN mitocondrial 3. Diabetes con tendencia a la cetosis (KPD)
	Defectos genéticos en la acción de la insulina.	1. Mutaciones en los receptores insulínicos 2. Diabetes lipoatróficas
	Diabetes neonatal	1. Transitoria 2. Permanente
	Enfermedades del páncreas exocrino	1. Pancreatitis 2. Traumatismo, pancreatomelectomía 3. Neoplasias 4. Fibrosis quística 5. Hemocromatosis 6. Pancreatopatía fibrocalculosa
	Endocrinopatías	1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Feocromocitoma 5. Hipertiroidismo 6. Somatostatinaoma 7. Aldosteronoma

Tipo de Diabetes mellitus	Problemas relacionados	Causa
	Inducida por fármacos o químicos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Toxicidad de células β: vacor, pentamidina, ciclosporina 2. Autoinmunidad a las células β: interferón α 3. Disfunción de las células β: tiazida y diuréticos del asa, diazóxido, agonista α, β bloqueadores, fenitoína, opiáceos 4. Resistencia a la insulina: glucocorticoides, progesterona ácido nicotínico, hormona tiroidea, β bloqueadores, fármacos antipsicóticos atípicos, antirretrovirales inhibidores de la proteasa
	Infecciones	<ol style="list-style-type: none"> 1. Rubéola congénita 2. Otros virus: citomegalovirus, coxsackievirus B, adenovirus, paperas
	Formas inusuales de diabetes de mediación inmune	<ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de la persona rígida 2. Inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía asociada con el cromosoma X (IPEX) 3. Síndrome de poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 4. Anticuerpos contra los receptores autoinmunes 5. Síndrome de ataxia telangiectasia (anticuerpos contra los receptores) 6. Síndrome POEMS
	Otros síndromes genéticos ocasionalmente relacionados con la diabetes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Defectos cromosómicos: síndromes de Down, Klinefelter y Turner 2. Síndromes neuromusculares: ataxia de Friedreich, corea de Huntington, distrofia miotónica, porfirias y otros 3. Síndromes de obesidad: síndromes de Laurence-Moon-Biedl, de Bardet-Biedl, de Prader-Wili y otros 4. Síndrome de Wolfram

Uno de los análisis más importantes para diagnosticar la diabetes mellitus es la medición de glucosa en sangre total y plasma en ayunas y después de la ingesta de cierta cantidad de glucosa. Los laboratorios especializados usan el plasma para realizar las mediciones, debido a que éste no tiene tantos componentes como en

la sangre total y es más sensible la medición; solo los aparatos caseros para medir glucosa usan la sangre total (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Para determinar la cantidad de glucosa en plasma los laboratorios usan los siguientes métodos: el método enzimático, el método de condensación o el método de reducción; en este último se aprovechan las propiedades reductoras de la glucosa para cambiar el estado de oxidación de un ion metálico; sin embargo, es más utilizado el método de condensación, es un método colorimétrico donde se agrega *o*-toluidina y se forma glucosamina, este compuesto tiene un color verde intenso, la desventaja de éste método es que la *o*-toluidina es corrosiva y tóxica. El método que actualmente se utiliza en los laboratorios especializados es el enzimático, en donde la glucosa oxidasa reacciona con glucosa, agua y oxígeno para formar ácido gluconico y peróxido de hidrógeno, este peróxido de hidrógeno oxida un cromógeno y se mide el consumo de oxígeno para determinar la cantidad de glucosa presente (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

La hemoglobina glucosilada se debe a las reacciones entre la glucosa y otros azúcares y grupos amino libres de la cadena α y β . La glucosilación de la valina aminoterminal de la cadena β imparte una carga negativa suficiente a la molécula de hemoglobina, para poder separarla mediante técnicas dependientes de carga. Al separar estas hemoglobinas por su carga, se les conoce colectivamente como hemoglobinas A_1 (HbA_1), la forma principal de la HbA_1 es la hemoglobina A_{1C} donde la glucosa es el hidrato de carbono que esta ligado a la hemoglobina (HbA_{1C}). La hemoglobina total esta formada por 6% de HbA_{1C} , en personas sanas, sin embargo en pacientes diabéticos la HbA_{1C} , se encuentra anormalmente elevada, debido a la hiperglucemia crónica, en la **tabla 8** se muestran los rango de HbA_{1C} , para determinar si un paciente es diabético, prediabético o sano. La hemoglobina glucosilada, circula dentro de los eritrocitos, cuyo ciclo vital dura hasta 120 días, reflejan el estado glucémico de 8 a 12 semanas anteriores al estudio, por esta razón es un método para la valoración del control diabético (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Los análisis de glucosa en orina, sangre total y plasma sanguíneo, obtenidas en ayunas y después de administración de glucosa, son de enorme importancia para la evaluación de pacientes diabéticos. Las pruebas de hemoglobina glucosada, son útiles en la evaluación inicial y también en la valoración del efecto terapéutico del paciente (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

En la **tabla 8**, se muestran los criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus.

Tabla 8. Criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus (Modificado de Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

	Tolerancia normal a la glucosa	Prediabetes	Diabetes mellitus ^a
Glucosa plasmática en ayunas (mg/dl) ^b	<100	100 a 125 (glucosa basal alterada)	≥126
2 horas después de carga de glucosa (mg/dl) ^c	<140	≥140 a 199 (intolerancia a la insulina)	≥200
HbA _{1c} (%) ^a	<5.7	5.7 a 6.4	≥6.5
Síntomas y concentración de glucosa al azar (mg/dl)	-	-	≥200

^a La glucosa plasmática en ayunas o HbA_{1c} son diagnósticos de diabetes si se confirma en pruebas repetidas. El análisis de HbA_{1c} debe llevarse a cabo mediante procedimientos certificados por el programa de National Glycohemoglobin Standardization y estandarizarse al procedimiento DCCT.

^b La glucosa plasmática en ayunas ≥126 mg/dL es diagnóstico de diabetes si se confirma en algún día subsiguiente al que se encuentra en rango diabético después de ayuno nocturno.

^c Antes de la prueba, administrar 75 g de glucosa disuelta en 300 mL de agua, después de ayuno nocturno en pacientes que recibieron al menos 150 a 200 g de hidratos de carbono a diario por tres días. En ausencia de una hiperglucemia inequívoca, el resultado debe confirmarse mediante pruebas repetidas.

La diabetes mellitus es una enfermedad de importancia mundial, ya que 347 millones de personas han sido diagnosticadas con esta enfermedad. Se calcula que para el 2030 la diabetes mellitus será la séptima causa de muerte en el mundo. El 80% de las muertes por exceso de glucosa en la sangre, es en países de bajos y medianos ingresos (WHO. 2013).

La encuesta nacional de salud (ENSANUT) 2012, dice que 6.4 millones de adultos mexicanos están diagnosticados con diabetes mellitus, sin embargo, se calcula que aproximadamente el mismo número de personas podrían tener la enfermedad

sin ser diagnosticada aún. En la **figura 12**, se observa que desde el año 2000, ha habido un incremento en el número de pacientes diabéticos.

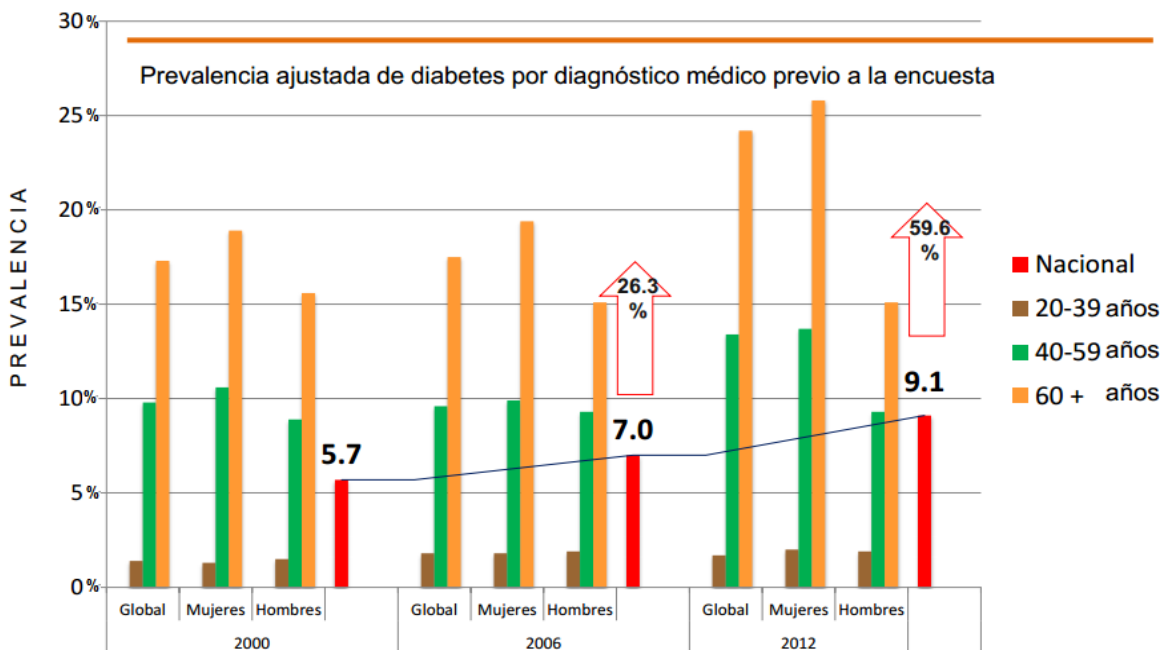


Figura 12. Incremento de diabéticos, tipo 1 y 2 diagnosticados a nivel nacional. Datos de Encuestas Nacionales (ENSANUT 2012).

En la **figura 13**, se observa que la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 1 es en edades tempranas, mientras que la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 es en edades más tardías.

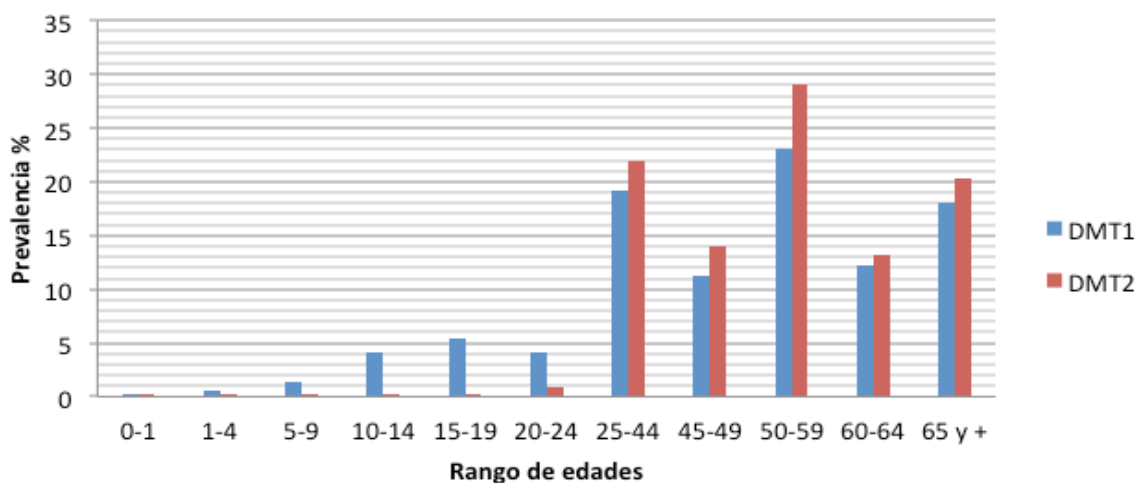


Figura 13. Comparación de prevalencia de diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Datos obtenidos de Dirección General de Epidemiología, DGE.

El costo aproximado para la atención médica de todos estos pacientes diabéticos, en México es de 3,872 millones de pesos, monto que supera al presupuesto asignado, por el gobierno federal, al Seguro Popular en el 2012, el cual fue de 3,790 millones de pesos (Secretaría de Salud, 2012).

Lo anterior hace notar el porque es tan importante estudiar y proponer soluciones para prevenir y tratar la diabetes mellitus.

3.2 Diabetes mellitus tipo 1.

La diabetes mellitus tipo 1, conocida como diabetes insulino dependiente, se divide en dos: la autoinmune, tipo 1a; y la idiopática, tipo 1b. La diabetes mellitus tipo 1a se presenta en 95% de los casos y consiste en la destrucción total o parcial de las células β pancreáticas, lo que provoca una deficiencia de insulina (Gadner D. G. & Shoback D., 2012; Sánchez-Zamora, Y. I., & Rodriguez-Sosa, M., 2014). Existe trastorno catabólico en donde hay ausencia de insulina circulante, como es el caso de la diabetes mellitus tipo 1, se eleva el glucagón pancreático y las células β del páncreas no responden a ningún estímulo insulinogénico. La ausencia de insulina ante los tres tejidos blanco principales (hepático, muscular y graso), ocasiona que no pueda captar glucosa y que se aporten más nutrientes al torrente sanguíneo, proveniente de la degradación de glucógeno, proteínas y grasa. Las alteraciones en el metabolismo de las grasas, provoca acumulación de cetonas. Esto puede revertirse con la administración de insulina (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

La diabetes tipo 1, puede presentarse en cualquier etapa de la vida, sin embargo, es más común que se presente en edad preescolar y antes de la pubertad, habiendo casos en donde se diagnostica a adultos mayores (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Para el diagnóstico de la diabetes tipo 1, se realizan análisis para identificar anticuerpos circulantes, que hacen frente a las células β pancreáticas, estos anticuerpos son: anticuerpos antiislotos (ICA, por sus siglas en inglés, *islet cell antibodies*), anticuerpos antiinsulínicos (IAA, por sus siglas en inglés, *insulin*

autoantibodies), anticuerpos contra la descarboxilasa glutámica ácida (GAD, por sus siglas en inglés, *glutamic acid decarboxylase*), anticuerpos contra la tirosina fosfatasa IA2 (ICA152, por sus siglas en inglés, *islet cell cytoplasmic antibodies*) y anticuerpos contra el transportador de cinc 8 (ZnT8) (Gadner D. G. & Shoback D., 2012; Sánchez-Zamora, Y. I., & Rodríguez-Sosa, M., 2014). Los ICA, son anticuerpos circulantes de naturaleza IgG, dirigidos contra elementos citoplasmáticos de la totalidad de las células que constituyen los islotes pancreáticos, la presencia de este anticuerpo está fuertemente asociada con el desarrollo posterior de diabetes tipo 1 (Mayrhofer M. *et al.*, 1996). Los IAA, bloquean la unión de la insulina con su receptor, impiden su acción y crean una resistencia periférica a la hormona, la presencia de este anticuerpo, en pacientes tratados con insulina exógena, se considera la causa más común de resistencia a la insulina (Casanova C.D. *et al.*, 2001). Los GAD, están implicados en mecanismos para atacar a los islotes del páncreas (Gilliam L.K. *et al.*, 2004).

Los anticuerpos en contra de las proteínas de las células β no provocan la destrucción de este tipo de célula de manera directa en la diabetes tipo 1, sin embargo, como ya antes fue mencionado, son de utilidad para poder monitorear y diagnosticar esta enfermedad. En el sistema inmune celular, los linfocitos T, infiltran a los islotes (un proceso denominado insulinitis) y destruyen las células β . Al momento del diagnóstico, los islotes de los pacientes con diabetes tipo 1 se encuentran extensamente infiltrados con linfocitos T tanto auxiliares como citotóxicos. Por lo regular, el timo elimina los linfocitos T autorreactivos durante su desarrollo, de modo que el sistema inmune se vuelva tolerante a los autoantígenos. Además, ciertos linfocitos T especializados, los linfocitos T reguladores, evitan ataques adicionales en contra de tejidos sanos mediante la reconversión de linfocitos T citotóxicos y auxiliares que pudiesen haber escapado del timo. La diabetes tipo 1 es el resultado de una falla en estos procesos de autotolerancia dentro del sistema inmune (Gadner D. G. & Shoback D., 2012). En la **figura 14**, se muestra un esquema, del proceso de insulinitis.

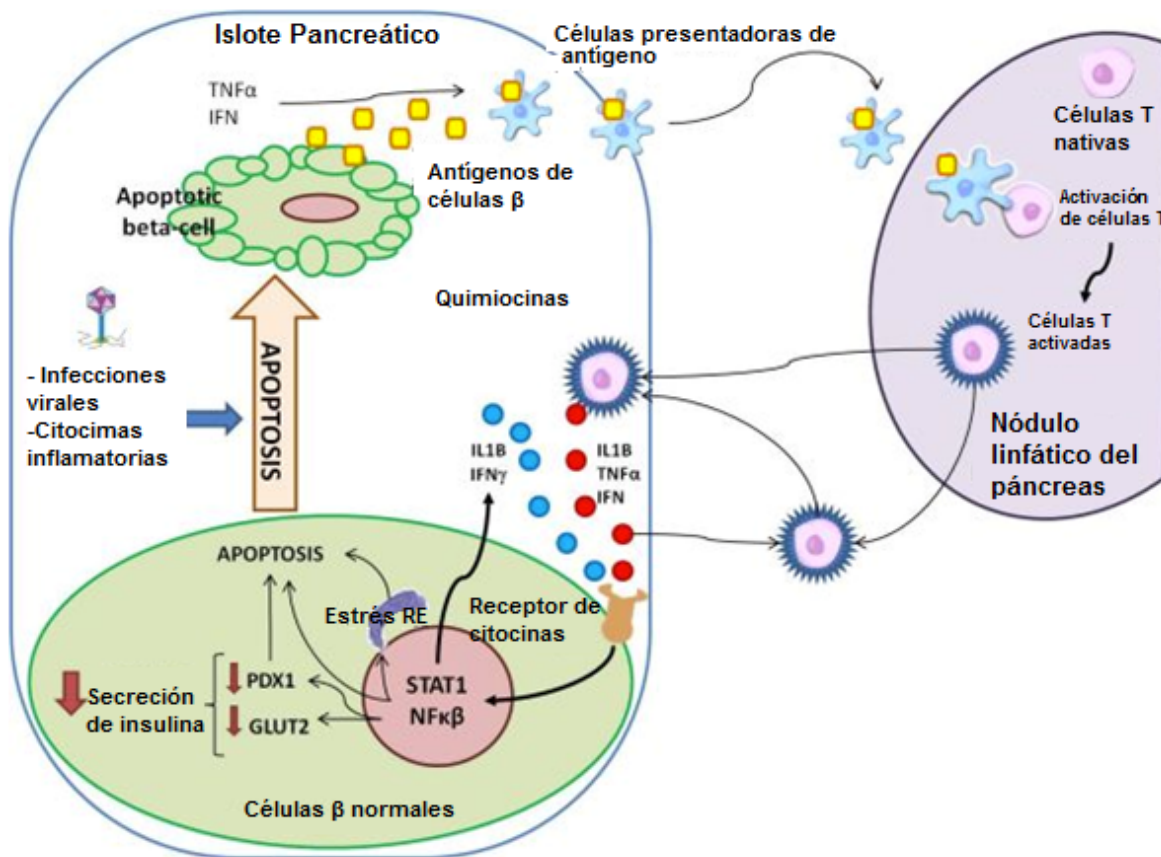


Figura 14. Insulinitis. Destrucción de células β , por células T citotóxicas y auxiliares. Infecciones virales o procesos inflamatorios, pueden inducir apoptosis de las células beta del páncreas. Las células que son apoptóticas, liberan antígenos que activan a las células presentadoras de antígenos, estas células activan a las células T en los nódulos linfáticos del páncreas, las células T activas regresan al islole en donde liberan factores de inflamación e inducen la insulinitis. Las citocinas inflamatorias activan a la transcripción de $\text{NF}\kappa\beta$ y STAT-1, las cuales decrecen la expresión de PDX1 y GLUT1, llevando a insuficiencia de producción y secreción de insulina. La activación de $\text{NF}\kappa\beta$ y STAT-1 también provoca estrés en el retículo endoplásmico (RE), procesos apoptóticos y liberación de citocinas por las células beta, llevando a un ciclo de inflamación y destrucción de células beta, que mantiene y eventualmente amplifica el ataque inmune. (Lazo M.L. & Fernandez-Mejia C. 2011).

La herencia genética, desempeña un papel importante en el desarrollo de la diabetes tipo 1, sin embargo, la mayoría de los pacientes que tienen la enfermedad, no tienen familiares enfermos. Los factores ambientales, por otra parte, tienen mayor influencia en el desarrollo de ésta enfermedad; se ha observado que en gemelos monocigóticos, solo uno de ellos la desarrolla, lo anterior puede deberse al azar en la expresión y mutación de ciertos genes, o a

los factores ambientales a los que están expuestos ambos individuos. Estos factores ambientales pueden ser: virus, sustancias químicas como raticidas de nitrofeniurea, citotoxinas destructivas, entre otras (Gadner D. G. & Shoback D., 2012; Sánchez-Zamora, Y. I., & Rodríguez-Sosa, M., 2014). Algunos genes implicados en la diabetes mellitus tipo 1, son: PDX1/IPF1 (por sus siglas en inglés, *pancreatic duodenal homeobox gene 1*), el cual sufre una mutación que genera un fenotipo, en donde existe insuficiencia pancreática, pues se expresa en la formación del brote pancreático y controla el destino de las células progenitoras del páncreas, también controla la supervivencia de las células β del páncreas; el gen PTF1A (por sus siglas en inglés, *pancreas-specific transcription factor 1A gene*), cuando sufre una mutación, conlleva a un mal desarrollo embrionario del páncreas asociado a una hipoplasia cerebelosa, en pacientes con esta mutación, se detectan niveles de insulina y péptido-C bajos; otro gen implicado en la diabetes mellitus tipo 1 es el *GATA6*, está implicado en la proliferación de las células progenitoras del páncreas, si este gen muta, existen anomalías en el desarrollo del páncreas (Schwitzgebel V.M., 2014).

En algunos estudios de asociación del genoma (GWAS, por sus siglas en inglés, *Genome-wide association studies*), se ha determinado que variaciones en genes como *HLA* (por sus siglas en inglés, *human leukocyte antigen*) representan un factor de alto riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 1, este gen codifica proteínas las cuales actúan como presentadoras de antígenos para las células T. Otras variaciones, en genes de importancia para dicha enfermedad, se mencionan a continuación: el gen *INS*, que codifica para la insulina; *PTPN22* (por sus siglas en inglés, *protein tyrosine phosphatase*), se encarga de reconocer antígenos específicos, e inicia la respuesta inmune; *CTLA4* (por sus siglas en inglés, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), actúa como regulador negativo de la activación de las células T; *IL2RA* (por sus siglas en inglés, *interleukin 2 receptor alpha*) este gen codifica para la subunidad alfa de las IL-2, conocida también como CD25, está relacionado con la memoria inmunitaria. Estos últimos tres genes, presentan variaciones en donde solo cambia nucleótido no-sinónimo, de manera que al ser traducida la cadena, se cambia un aminoácido (Polychronakos C. & Li Q. 2011).

La meta principal para el tratamiento de la diabetes tipo 1 es prevenir el desarrollo de complicaciones crónicas, como: complicaciones microvasculares y macrovasculares. La terapia intensiva de insulina, logra el control total de glucosa en sangre, esta terapia es combinada con tratamiento para regular la presión arterial y otro para controlar la hiperlipidemia; juntos hacen la combinación perfecta para sobrellevar esta enfermedad sin desarrollar las complicaciones antes mencionadas (Leroux, C., 2014). Es muy importante que los pacientes con diabetes mellitus tipo 1, tengan especial cuidado en mantenerse en un peso adecuado, pues los tratamientos con insulina, provocan un aumento de peso y entre mayor sea el peso del paciente, mayor es la cantidad de insulina que se tiene que administrar (Chillarón, J. J., 2014).

3.3 Diabetes mellitus tipo 2.

La diabetes mellitus tipo 2, conocida como diabetes no insulino dependiente o diabetes mellitus de la edad madura, se caracteriza por tener una deficiencia en la producción de insulina o bien resistencia a la misma (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

En la **figura 15**, se esquematiza los que ocurre en una persona sana y en una persona con diabetes mellitus tipo 2, cuando ingiere alimentos.

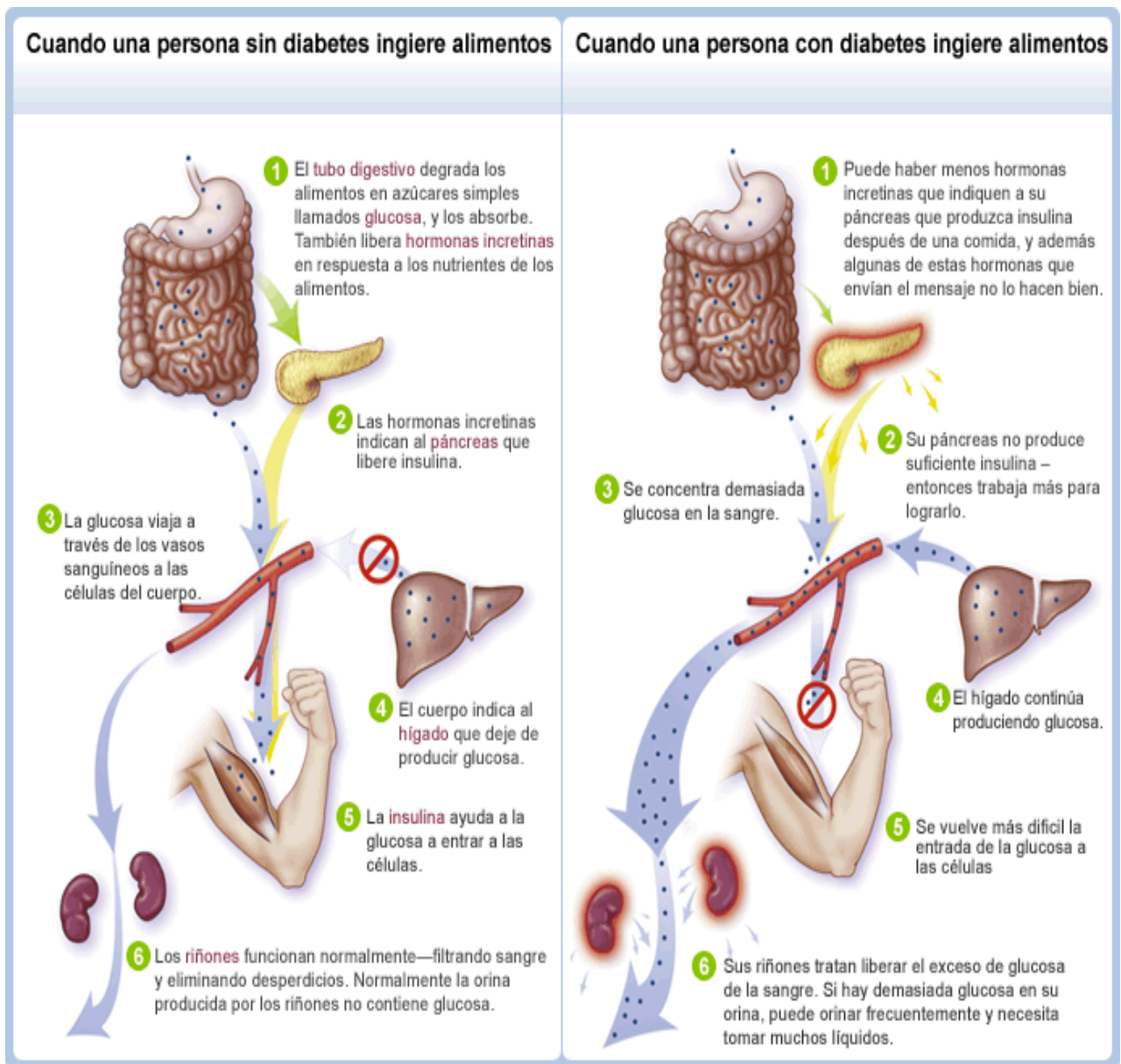


Figura 15. Ingesta de hidratos de carbono en persona sana y persona con diabetes mellitus tipo 2 (Merck Sharp &Dohme I.A. Corp., 2012).

Por lo general la diabetes tipo 2, se presenta en personas adultas, sin embargo, el creciente número de obesos en etapas más tempranas, también ha elevado el número de casos de diabetes tipo 2 en adolescentes y niños (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Existen varios factores que están relacionados a la insensibilidad hística a la insulina, como: presencia de anticuerpos antiinsulinicos, mutación en receptores insulínicos, síndrome de Rabson-Mendenhall leve (es una enfermedad recesiva

cromosomal, en donde existe resistencia a la insulina y hay un crecimiento anormal de cabeza, cara y uñas), hipertiroidismo, obesidad visceral, enfermedades hepáticas, trastornos genéticos, trastornos neuromusculares, cambios hormonales (pubertad, embarazo), inanición, uso de glucocorticoides, entre otros (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

La mayoría de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, tienen familiares con la misma enfermedad, sin embargo, la herencia no se ajusta a patrones mendelianos, por lo que se le da sustento a la conclusión que existen genes involucrados con diferentes grados de penetrancia (Gadner D. G. & Shoback D., 2012). Los genes involucrados en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, pueden activarse, debido a cambios en la dieta, ambientales, edad, por mencionar algunos.

La hiperglucemia en pacientes diabéticos agrava la resistencia de los tejidos a la insulina, así como la mala respuesta de las células β en presencia de glucosa (**Figura 16**). Existen tratamientos que disminuyen los niveles de glucosa en sangre, mejorando de esta forma la resistencia a la insulina, y hasta cierto grado la liberación de insulina por las células β del páncreas (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

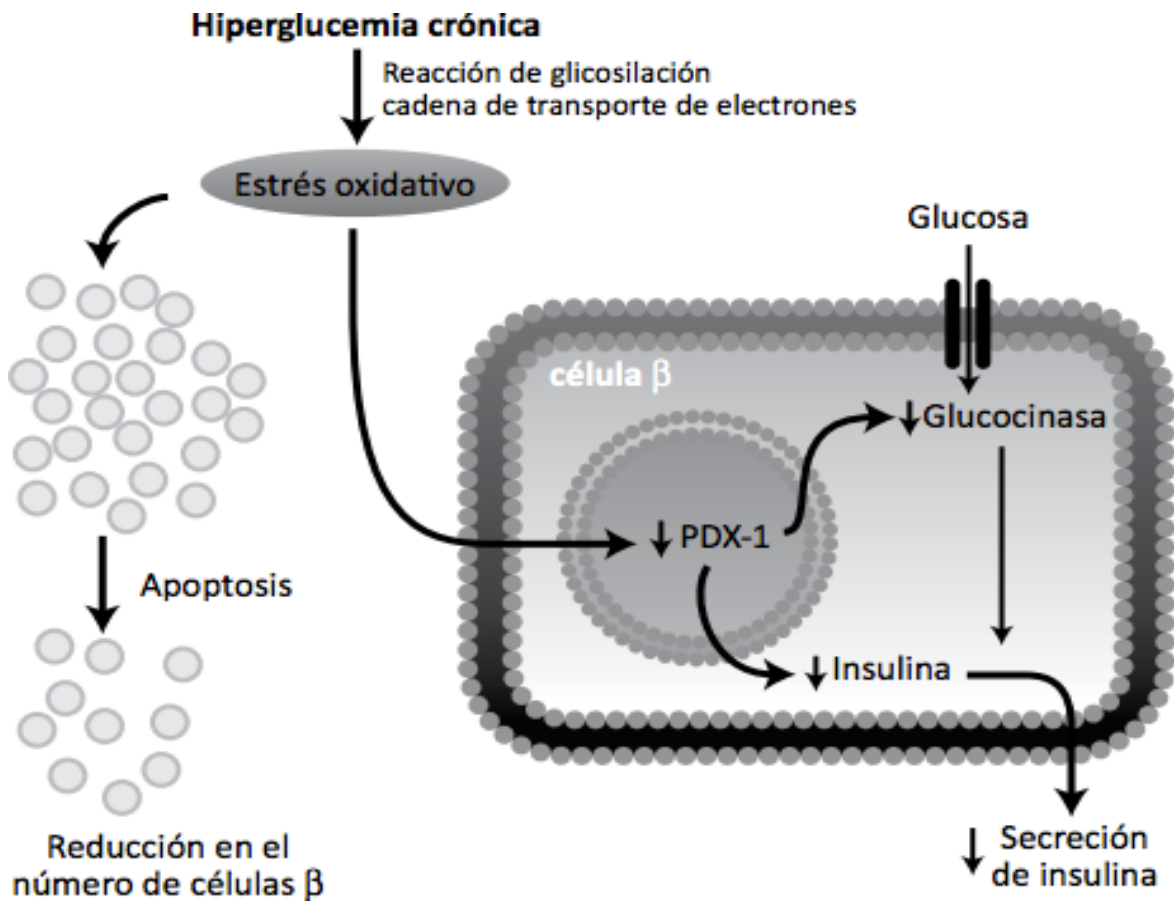


Figura 16. Efecto del estrés oxidativo sobre el número y la función de las células β del páncreas. El gen PDX-1, se encarga de la reparación y regeneración de las células β del páncreas (Rosado-Pérez J. & Mendoza-Núñez V.M., 2007).

La hiperglucemia crónica, provoca estrés oxidativo generando daño a nivel celular, tisular y sistémico que conlleva a enfermedades degenerativas, en las cuales se encuentra incluida la diabetes mellitus, arterioesclerosis, cáncer, artritis reumatoide, entre otras. Dicho estrés oxidativo puede ser desarrollado por la activación de distintas vías metabólicas (Rosado-Pérez J. & Mendoza-Núñez V.M., 2007)(Figura 17).

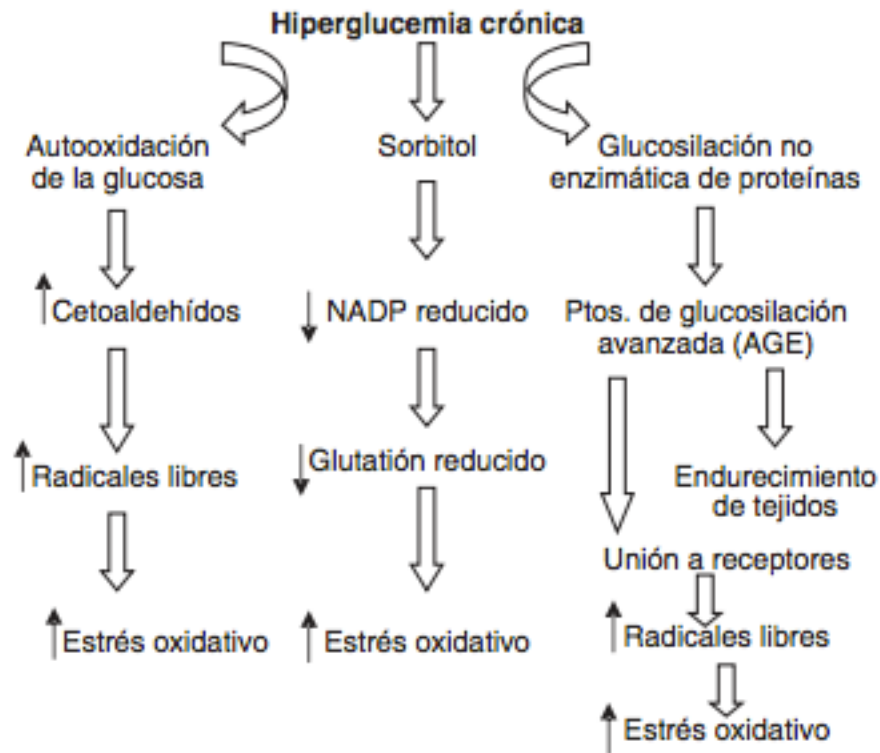


Figura 17. Principales vías metabólicas activadas por la hiperglucemia crónica, vinculadas con el desarrollo de estrés oxidativo en pacientes diabéticos (Gugliucci, 2000).

La diabetes mellitus tipo 2 puede ser diagnosticada mediante los análisis que antes se han mencionado, sin embargo, muchos pacientes con dicha enfermedad no se diagnostican a tiempo y esto conlleva a problemas microvasculares y macrovasculares (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Es de gran importancia, controlar la presión sanguínea, pues es uno de los factores que influyen en el daño microvascular y macrovascular, en pacientes diabéticos. Se controla con medicamentos y con medidas no farmacológicas, como: hacer ejercicio, cambio de dieta, reducción en el consumo de sal y reducción en el consumo de alcohol (Lastra, G. *et al.*, 2014). Además de controlar la presión sanguínea, es muy importante usar medicamentos que controlen la hiperglucemia, y en algunos casos administrar insulina para contrarrestar el mal funcionamiento de las células β del páncreas. El tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus tipo 2, debido al deterioro progresivo de las células β del

páncreas, debe irse intensificando conforme pasa el tiempo (Hirsch, I. B. *et al.*, 2014).

Se ha observado en algunos estudios de asociación del genoma (GWAS, por sus siglas en inglés, *Genome-wide association studies*) que son 11 los genes involucrados en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Los más importantes son: *TCF7L2* (por sus siglas en inglés, *transcription factor 7-like 2*), altera la secreción de insulina y codifica factores de transcripción en el páncreas fetal; *HHEX-IDE* (por sus siglas en inglés, *haematopoietically expressed homeobox insulin-degrading enzyme*), involucrado en el desarrollo pancreático, altera la secreción de insulina y altera la función de las células β del páncreas; *CDKN2A-AB* (por sus siglas en inglés, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), reduce la proliferación de los islotes en edades avanzadas; *FTO* (por sus siglas en inglés, *fat mass and obesity.associated*), altera el índice de masa corporal, se expresa en el hipotálamo (región del cerebro en donde se controla el apetito) (Frayling T.M. 2007).

3.4 Comorbidades asociadas a la diabetes mellitus.

La diabetes mellitus, es una enfermedad que deteriora muchos órganos del cuerpo humano, existen dos tipos de deterioro: microvascular y macrovascular.

Las enfermedades microvasculares, son patologías de los vasos sanguíneos más pequeños, estos vasos sanguíneos se engrosan y causan problemas en la retina (retinopatía diabética), riñón (nefropatía) y corazón (cardiomegalia con insuficiencia cardíaca) (Gadner D. G. y Shoback D., 2012).

Las enfermedades macrovasculares, son patologías de los vasos sanguíneos de gran tamaño, estos se endurecen como en la artereosclerosis, causando infartos del miocardio, embolias y gangrena periférica (Gadner D. G. & Shoback D., 2012).

Las comorbilidades asociadas a la diabetes mellitus (**tabla 9**), pueden presentarse en ambos tipos de diabetes la tipo 1 y la tipo 2, sin embargo, la frecuencia y muchas veces las causas son distintas, por ejemplo: la diabetes mellitus tipo 1, genera enfermedades renales terminales en 40% de los casos,

siendo que en la diabetes mellitus tipo 2, solo 20% presenta este tipo de comorbilidad; la ceguera ocurre por distintas causas, en la diabetes mellitus tipo 1 es debido a una retinopatía proliferativa, desprendimiento de retina y hemorragias vítreas, mientras que en la diabetes mellitus tipo 2 las causas de la ceguera son distintas, es por edema macular e isquemias (Gadner D. G. & Shoback D., 2012; Kovacic, J. C. et al., 2014).

Tabla 9. Comorbilidades de la diabetes mellitus (Modificado de Gadner D. G. y Shoback D., 2012).

Ojos	Retinopatía diabética Cataratas
Riñones	Glomeruloesclerosis intercapilar Infecciones Necrosis tubular renal
Sistema nervioso	Neuropatía periférica Neuropatía motora Neuropatía autónoma
Piel	Dermopatía diabética Necrosis lipoídica diabética Candidiasis Úlceras en pies y piernas
Sistema cardiovascular	Cardiopatías Enfermedad vascular periférica Enfermedades cerebrovasculares
Huesos y articulaciones	Queiroartropatía diabética Contractura de Dupuytren Articulación de Charcot Osteomielitis
Infecciones inusuales	Fascitis necrosante Miositis necrosante Meningitis de Mucor Colecistitis enfisematosa Otitis externa maligna

En general los pacientes con diabetes tipo 1, presentan complicaciones con enfermedades microvasculares (retinopatía diabética, nefropatía, cardiomegalia), mientras que los pacientes con diabetes tipo 2, presentan complicaciones con

enfermedades macrovasculares (infarto de miocardio, embolias, gangrena periférica).

3.5 La microbiota intestinal y sus implicaciones en la salud.

La microbiota intestinal juega un rol importante en el desarrollo, mantenimiento y correcto funcionamiento del intestino, a través de diferentes vías: fortalece las barreras físicas de la mucosa, manteniéndola estable por el comensalismo; estimula las vellosidades microvasculares, para promover la absorción de nutrimentos por el epitelio; regula la secreción de IgA, para proteger al intestino de patógenos; produce SCFA's, nutrimentos esenciales para los enterocitos; induce a la producción de péptidos antimicrobianos; y modula la mucosa inmune innata y adaptativa (Li D. et al., 2013).

La microbiota intestinal está íntimamente relacionada con la salud del cuerpo humano, dependiendo de la conformación de ésta, se presentarán o no algunas enfermedades como: enfermedades del intestino inflamado (colitis, enfermedad de Crohn), obesidad, enfermedades de hígado graso no alcohólicas (EHGNA), esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés, *nonalcoholic steatohepatitis*), resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 1 y 2, cáncer de colon, infecciones bacterianas, entre otras (Alemán, J. O. et al., 2014; Power, S. E. et al., 2014).

Como ya antes se ha mencionado, muchos factores influyen para el establecimiento de la microbiota intestinal. Una mala alimentación y el uso prolongado de antibióticos, puede provocar una disbiosis en donde predominan las bacterias Gram positivas y la diversidad de la microbiota intestinal es baja. La disbiosis está directamente relacionada con: el síndrome del intestino inflamado, NAFLD, NASH, cáncer de colon, cáncer hepático, por mencionar algunos. Estos padecimientos, tienen en común un aumento en la permeabilidad del intestino, por donde pasan metabolitos que conllevan a desencadenar cascadas proinflamatorias y daño de tejidos (Bellavia M. et al., 2013; Mehal W.Z., 2013).

3.5.1 Microbiota intestinal y diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad, de importancia mundial y sobre todo nacional; esta enfermedad, al estar relacionada con la microbiota intestinal, puede ser estudiada desde éste punto de vista, para que se propongan mejores y más innovadores tratamientos, así como medidas preventivas para que la prevalencia de esta enfermedad no siga en aumento, y por el contrario disminuya.

3.5.1.1 Rol de la microbiota intestinal en diabetes tipo 1.

Existen muchas hipótesis, que intentan explicar la causa por la cual se presenta la diabetes mellitus tipo 1, muchas de ellas incluyen a la microbiota intestinal, como la llamada “viejos amigos”, la cual propone que los microorganismos que conforman la microbiota intestinal, tienen la habilidad de inducir o regular el sistema inmune; otra conocida como “tormenta perfecta”, considera 3 componentes para desarrollar la enfermedad: la microbiota intestinal (composición influenciada por factores externos), anomalías genéticas en la regulación de la inmunidad de la mucosa y una alta permeabilidad del intestino (Atkinson M.A, & Chervonsky A., 2012). Con estas hipótesis se han propuesto algunos experimentos, cuyo objetivo es demostrar éstas hipótesis, y de esta forma poder sugerir tratamientos alternativos para el mantenimiento de la salud de pacientes diabéticos, así como propuestas preventivas para dicha enfermedad.

La mayoría de los estudios que se realizan sobre diabetes mellitus tipo 1, se hacen en ratones diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés, *non-obese diabetic*) y en ratas bio-criadas propensas a la diabetes (BB-DP, por sus siglas en inglés, *BioBreeding diabetes-prone*). Estudios practicados en estos modelos, han encontrado que la ingesta de algunos antibióticos, puede prevenir el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 (Brugman S. *et al.*, 2006). En otros estudios han inoculado a ratones NOD libres de gérmenes, con bacterias aerobias Gram positivas esporógenas, se alimenta a estos ratones con una dieta libre de endotoxinas NIH31-M, para cumplir los requerimientos nutrimentales, después de pasar por el tratamiento de autoclave, se notó una disminución en la tasa de diabetes mellitus tipo 1 (King C. & Sarvetnick N., 2011). Algunos más, han

alimentado a estos modelos con diferentes probióticos: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus salivarius*; han observado que se puede prevenir o eliminar el desarrollo de la enfermedad (Calcinaro F. *et al.*, 2005). A ratones NOD, a los cuales les falta la proteína adaptadora para múltiples receptores, encargados de unir antígenos bacterianos, no desarrollan diabetes mellitus tipo 1; esto indica que la interacción entre, la microbiota intestinal y el sistema inmune innato, juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad (Wen L. *et al.*, 2008).

Sin embargo, la microbiota intestinal, no es el único factor que está directamente relacionado con el desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus tipo 1, en la **figura 18**, se propone un modelo de todos los factores que favorecen para el desarrollo de dicha enfermedad.

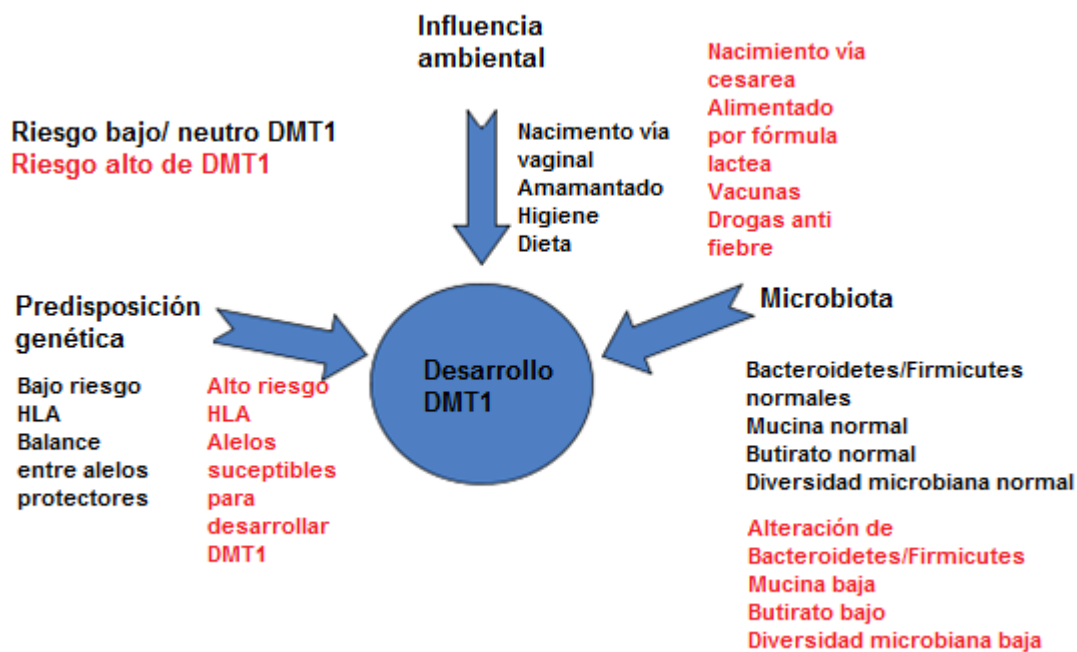


Figura 18. Modelo de factores que influyen para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 1. En negro, factores que influyen en un riesgo bajo. En rojo, factores que influyen en un riesgo alto. HLA, por sus siglas en inglés, *Human leukocyte antigen*; se encargan de diferenciar lo propio de lo ajeno, aseguran la respuesta inmune (Atkinson M.A, & Chervonsky A., 2012).

Por otra parte, se ha observado una relación entre, la composición de la microbiota intestinal, la barrera intestinal y el sistema inmune de la mucosa, con algunas enfermedades alérgicas y otras autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1 (Vaarala, O. *et al.*, 2008). El sistema inmune intestinal, no sólo se encarga de producir anticuerpos para el intestino, sino que también los produce para el páncreas, es por esta razón, que existe una relación tan estrecha de la diabetes mellitus tipo 1 con el intestino y por consecuencia la microbiota intestinal (Vaarala O., 2012).

Algunas de las alteraciones reportadas en pacientes diabéticos son: aumento en la permeabilidad del intestino (Sapone A. *et al.*, 2006), sobreexpresión de enzimas proinflamatorias (Westerholm-Ormio M. *et al.*, 2003), aumento en la expresión de células apoptóticas (Auricchio R. *et al.*, 2004), activación del sistema inmune en el intestino (Auricchio R. *et al.*, 2004), producción de anticuerpos de transglutaminasa (Bister V. *et al.*, 2004), alteraciones en las uniones estrechas del intestino (Sapone A. *et al.*, 2006).

Indiscutiblemente, la microbiota intestinal normal ayuda a mantener en buen estado la barrera intestinal, por ejemplo: *Lactobacillus plantarum*, aumenta la expresión de las proteínas que se encuentran en las uniones estrechas del intestino, ayudando a que la permeabilidad sea normal (Vaarala O., 2012). Sin embargo, cuando existen alteraciones en la composición de la microbiota intestinal normal, muchos efectos benéficos desaparecen, por ejemplo: un elevado número del phylum Firmicutes (alteración en la microbiota intestinal, observada en pacientes diabéticos) (Vaarala O., 2012) desencadena una respuesta inmunológica en donde se promueve la producción de células colaboradoras Th17, las cuales producen citocinas IL-17 y éstas estimulan al estómago para producir más citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8). A través de la inflamación y la atracción de neutrófilos, la función primaria de las células colaboradoras Th17 es atacar a patógenos extracelularmente durante alguna infección, sin embargo, es posible que una excesiva respuesta inflamatoria, contribuya a enfermedades autoinmunes (Atkinson M.A, & Chervonsky A., 2012). Se han realizado experimentos en donde a ratones NOD que tienen diabetes tipo 1, se inoculan con *Lactobacillus johnsonii* (microorganismo presente en la microbiota intestinal

normal), y se observa un retraso en el desarrollo de la diabetes tipo 1, debido a que éste microorganismo regula las células colaboradoras Th17, las cuales promueven inflamación y están muy relacionadas con enfermedades autoinmunes, la vía de regulación de las células colaboradoras Th17, es mediante las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés, *Dendritic Cell*), éstas son células presentadoras de antígenos, y son parte de la defensa inmunitaria innata (Lau K. *et al.*, 2011). Lo anterior sugiere que una dieta en la cual se incluyan microorganismos como *Lactobacillus johnsonii*, puede retrasar o prevenir el desarrollo de diabetes mellitus tipo 1.

3.5.1.2 Rol de la microbiota intestinal en diabetes tipo 2.

Diversos enfoques se han realizado para establecer las razones por las que se puede desarrollar la diabetes mellitus tipo 2, algunos de ellos están enfocados a explorar el rol de la microbiota intestinal en la regulación de moléculas que están involucradas en el sistema inflamatorio e inmunitario, como las TLRs (por sus siglas en inglés, *Toll like receptors*), en ratones deficientes de TLR5, se observó que desarrollan hiperfagia, obesidad, hipertensión, hipercolesterolemia y resistencia a la insulina, cuando se trasplanta la microbiota intestinal de estos ratones a ratones libres de gérmenes, se observó que desarrollaban características similares, lo que sugiere que la microbiota intestinal es la clave determinante para este tipo de desórdenes metabólicos (Carvalho B.M. *et al.* 2012). En otro estudio en ratones deficientes en TLR2, se observó que estos ratones desarrollaron obesidad, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, se demostró también que la microbiota que coloniza al intestino tiene mayor abundancia de Firmicutes y menor de Actinobacteria; se les administró antibióticos a estos ratones deficientes en TLR2, y se observó una mejora en la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, por otra parte al ser menos abundantes las Actinobacterias, la permeabilidad del intestino aumenta y por ende la concentración de lipopolisacáridos en el sistema circulatorio aumenta, y el sistema inmune reconoce a estas endotoxinas, y desencadena la cascada inflamatoria mediante las TLR. La obesidad así como la inflamación tienden a causar diabetes,

por lo que la pérdida de TLR2, provoca cambios en la microbiota, los cuales resultan en un riesgo grave para desarrollar diabetes mellitus (Jialal I. *et al.*, 2012).

Los cambios observados en la microbiota intestinal en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 son: aumento de Bacteroidetes y disminución de Firmicutes; los microorganismos involucrados en el mantenimiento intestinal, están en menor proporción que en personas sanas; estos microorganismos son los productores de ácidos grasos de cadena corta (SFCA), y también los productores de proteínas para el mantenimiento de las uniones estrechas del intestino (Larsen N. *et al.*, 2010; Moreno-Indias I. *et al.*, 2014).

El aumento de Bacteroidetes (bacterias Gram negativas), observado en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, incrementa las posibilidades de desarrollar una endotoxemia metabólica. Las bacterias Gram negativas, tienen en su membrana lipopolisacáridos que son clasificados como endotoxinas; estas endotoxinas provocan que la permeabilidad del intestino aumente, altera la expresión, localización y distribución de proteínas de las uniones estrechas y aumenta la cantidad de lipopolisacáridos en el serum (Everard A. & Cani P.D. *et al.* 2013; Fallucca, F. *et al.*, 2014; Moreno-Indias I. *et al.*, 2014).

En contraste, *Bifidobacterium spp.*, tiene la capacidad de producir moléculas que modulan la inflamación y la permeabilidad del intestino; mejoran la función de las células β del páncreas reduciendo así la resistencia a la insulina (Cani P. D. & Delzenne M. N., 2009). Existen prebióticos como: los fructo-oligosacáridos (FOS) y los transgalcto-oligosacáridos (TGOS), los cuales favorecen el crecimiento de *Bifidobacterium spp.* (Cervantes G.A., 2014). Se ha observado que si el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 incluye a prebióticos y probióticos para el control de la microbiota, tiene mejores resultados que los tratamientos que no los incluyen, por los efectos benéficos que ya se mencionaron anteriormente (Moreno-Indias I. *et al.*, 2014).

3.5.1.2.1 Endotoxemia metabólica.

Los lipopolisacáridos son uno de los mayores componentes de las bacterias Gram negativas (**Figura 19**), contribuyen a la integridad de la estructura bacteriana y la protegen de ataques químicos. Estos lipopolisacáridos, son considerados endotoxinas, una vez que llegan a la circulación sanguínea, causan endotoxemia metabólica, la cual puede inducir una respuesta inmune que conlleva a inflamación (Cani P.D. & Delzenne N.M., 2011; Fallucca, F. *et al.*, 2014; Moreno-Indias I. *et al.*, 2014). La respuesta inflamatoria se desencadena por TLR4, es la encargada de mediar la respuesta inflamatoria en el intestino (Sweet & Hume, 1996). Se ha observado en experimentos realizados en ratas obesas con una dieta alta en grasa, que la expresión de TLR4 es mayor que en ratas delgadas con una dieta chow (de La Serre *et al.*, 2010). De igual modo, se ha observado que las dietas elevadas en grasa, afectan la integridad y la permeabilidad de la membrana. Una dieta alta en grasa, retrasa el crecimiento de *Bifidobacterium sp.*, lo cual está muy relacionado con el aumento de adipocitos y resistencia a la insulina (Zhang C, *et al.* 2012). Cuando se ingiere este tipo de dietas, la microbiota intestinal es afectada, y la expresión de proteínas para las uniones estrechas como ZO-1 y ocludinas, disminuyen (Cani P.D. *et al.*, 2008 ; Cani P.D. & Delzenne N.M., 2011; Fallucca, F. *et al.*, 2014; Moreno-Indias I. *et al.*, 2014). De igual forma la dieta elevada en grasas promueve el desarrollo de bacterias como *Lawsonia sp.* y *Desulfovibrio sp.*, las cuales son capaces de reducir el azufre en ácido sulfhídrico (H₂S) dañando la barrera intestinal (Zhang C, *et al.* 2012). Lo anterior sugiere que la composición de la microbiota intestinal, en respuesta a una dieta alta en grasa, puede ser detonante para el desarrollo de obesidad así como de diabetes mellitus tipo 2.

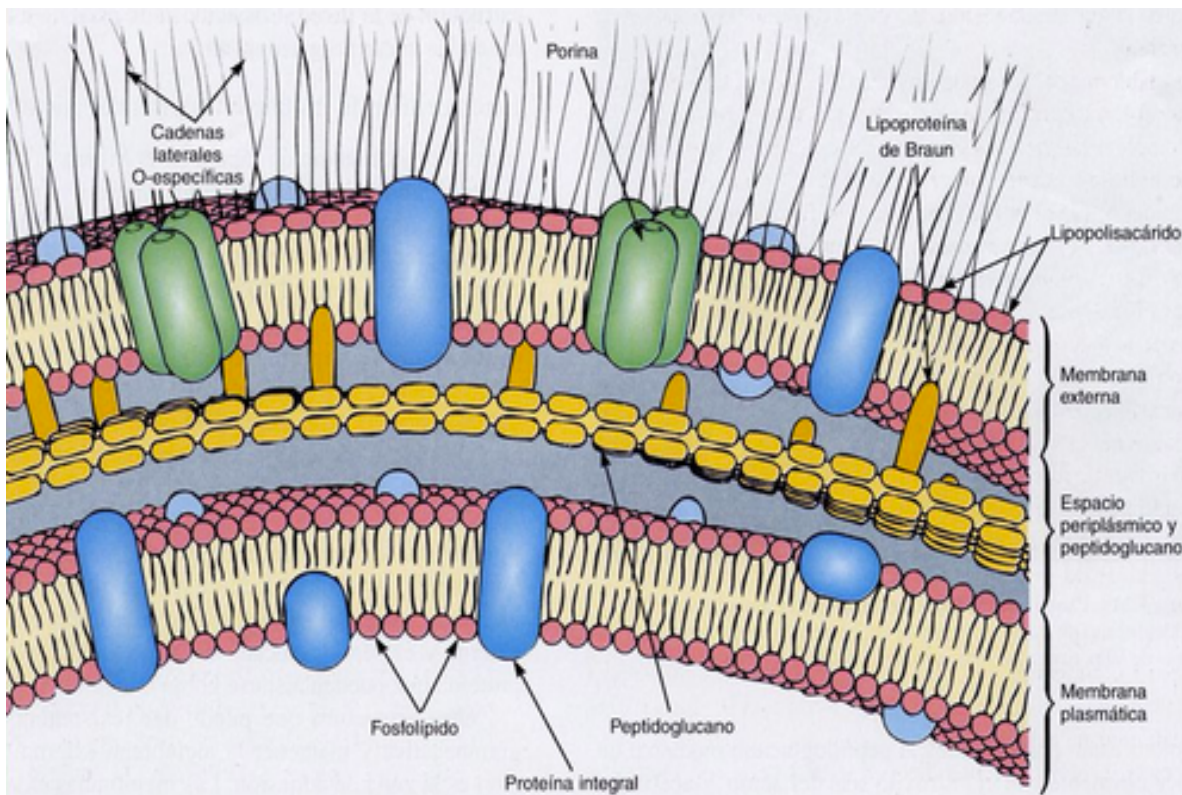


Figura 19. Membrana de bacterias Gram negativas (Sánchez de Rivas C., 2006).

Los lipopolisacáridos están constutuídos por la unión covalente de un lípido y un polisacárido. Tiene 3 regiones distintas: una porción llamada lípido A (responsable de la actividad endotóxica), el núcleo del polisacárido y el polisacárido O específico también conocido como antígeno-O (**Figura 20**) (Raetz C.R.H., Whitfield C., 2002).

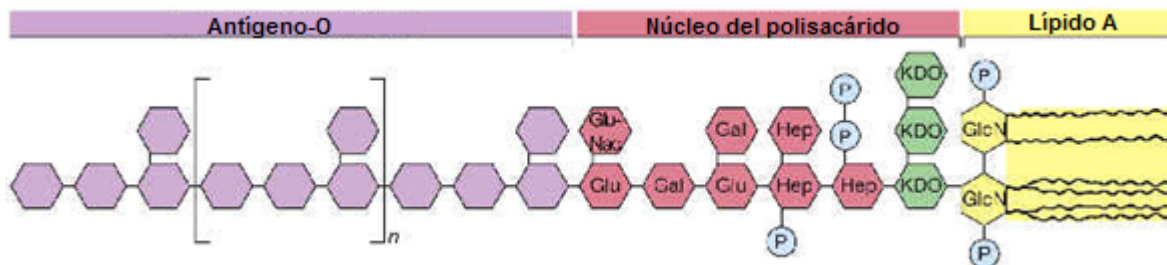


Figura 20. Estructura de lipopolisacárido (Raetz C.R.H., Whitfield C., 2002).

Una dieta alta en grasas, es un factor importante para la translocación de los lipopolisacáridos a través de la mucosa intestinal. Una vez que el lipopolisacárido

se incorpora a la mucosa del intestino, se internaliza en el enterocito, se dirige al aparato de Golgi donde se introduce en quilomicrones para que pueda salir y alcanzar al sistema linfático y a la sangre (Manco M. *et al.*, 2010). Otra forma para que los lipopolisacáridos lleguen al torrente sanguíneo, es debida al cambio en la permeabilidad del intestino, debido a la baja expresión de proteínas como ZO-1 y ocludinas de las uniones estrechas, haciendo posible que los lipopolisacáridos se puedan incorporar al sistema circulatorio. Al primero se le conoce como modelo transcelular y al segundo como modelo paracelular (**Figura 21**) (Kelly C.J. *et al.*, 2012).

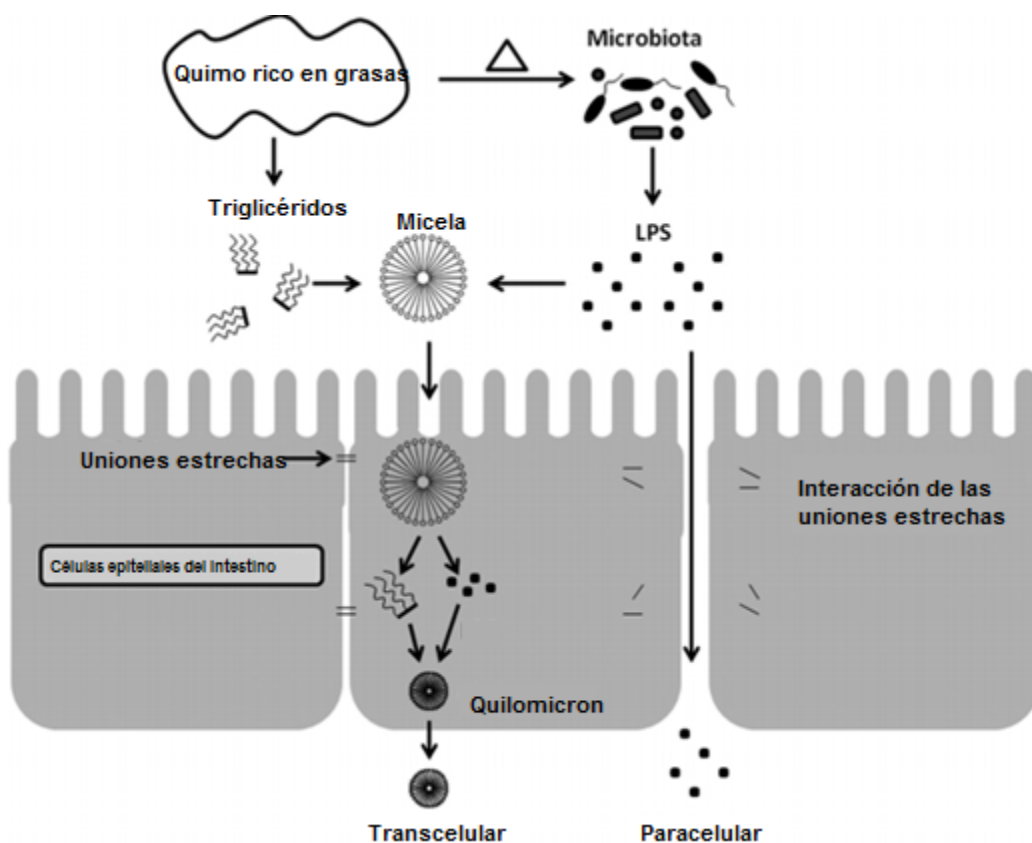


Figura 21. Modelos mediante los cuales, los lipopolisacáridos alcanzan el torrente sanguíneo. LPS, lipopolisacáridos (Kelly C.J. *et al.*, 2012).

Los lipopolisacáridos se encuentran de forma normal en personas sanas, pues hay microorganismos Gram negativos que conforman la microbiota normal de cualquier individuo, sin embargo, los niveles en que se encuentran en la sangre son muy bajos; cuando nos referimos a una persona obesa o con diabetes mellitus

tipo 2, los niveles de lipopolisacáridos aumentan debido al cambio drástico en su microbiota intestinal (ver sección 3.5.1.2), y es cuando se presentan los problemas de inflamación y respuesta inmune (Boroni Moreira A.P., 2012).

La **figura 22**, resume como la dieta alta en grasa liga a enfermedades crónicas degenerativas y a la endotoxemia metabólica.

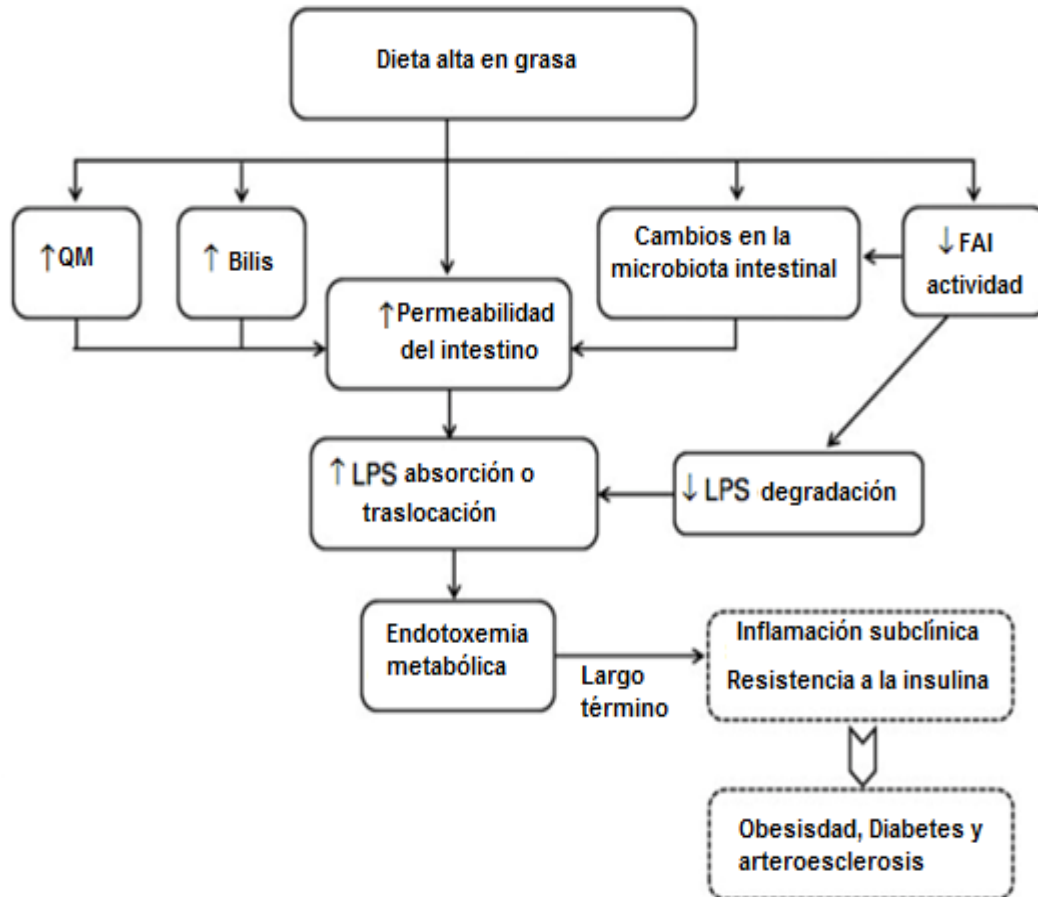


Figura 22. Posibles vías que ligan el consumo de una dieta alta en grasa con endotoxemia metabólica y enfermedades crónicas degenerativas. QM, quilomicrones; FAI, fosfatasa alcalina del intestino; LPS, lipopolisacáridos (Moreira A.P.B. *et al.*, 2012).

Capítulo 4.

Métodos de análisis e identificación.

Uno de los primeros alcances en la identificación de los microorganismos que conforman la microbiota intestinal fue el cultivo bacteriano, es un método directo que permite la identificación mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, sin embargo, no más del 30% de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal eran detectados debido a que la mayoría de los microorganismos que la forman son microorganismos no cultivables, o se desconocen los requerimientos de crecimiento, o bien son anaerobios estrictos y requieren de condiciones rigurosas para poder cultivarse en laboratorios (Musso G. *et al.*, 2011). Las limitaciones de este tipo de metodologías llevo al desarrollo de nuevos métodos que aplican herramientas moleculares independientes del cultivo, ofreciendo un rango mucho mayor para la identificación de los microorganismos (O'Sullivan, 2000; Vaughan *et al.*, 2000; Zoetendal *et al.*, 2004). Uno de los métodos más utilizados es el PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase chain reaction*), esta metodología nos permite conocer a todos los microorganismos presentes en la microbiota, cultivables y no cultivables. Para el estudio de la diversidad microbiana se amplifica el gen ribosomal 16S y se construyen bibliotecas genómicas en donde se comparan las secuencias de dicho gen y se depositan en una base de datos, esta metodología permitió notar que gran parte de la microbiota intestinal no había sido descrita mediante las técnicas convencionales (Altschul *et al.*, 1997; Suau *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2003). Otros métodos moleculares son: FISH (por sus siglas en inglés, *Fluorescence in situ hybridization*), con este método podemos conocer la abundancia de cierto microorganismo, se utilizan sondas que hibridan con el ARN ribosomal, al hibridar emiten fluorescencia que es detectada mediante microscopía de fluorescencia (Welling *et al.*, 1997; Harmsen *et al.*, 2000); DGGE (por sus siglas en inglés, *Denaturing gradient gel electrophoresis*) y TGGE (por sus siglas en inglés, *Temperature gradient gel electrophoresis*), estos métodos se usan para conocer la variedad de microorganismos, se basan en la separación de fragmentos de ADN,

mediante un gradiente químico o de temperatura (Zoetendal *et al.*, 1998; Requena *et al.*, 2002; Zoetendal *et al.*, 2002).

Estas metodologías, aunque siguen siendo utilizadas, ya no son las que proporcionan mayor información, a continuación se mencionan las metodologías de nueva generación que esclarecen de mejor manera la composición de la microbiota intestinal y también el rol que desempeñan los microorganismos en el ambiente intestinal.

4.1 Next generation sequencing (NGS).

Una herramienta esencial para todas las ramas de la investigación biológica es descifrar la secuencia de ADN.

En los 80's se introdujo la técnica de replicación del ADN (PCR); en 1995 se secuenció el primer genoma bacteriano de *Haemophilus influenzae*, dicha secuenciación tardó 13 meses en completarse (Padmanabhan R. *et al.*, 2013).

Fredrick Sanger en 1977 desarrolló la secuenciación de las bases terminales de la cadena de ADN, a la cual se le conoce como secuenciación Sanger; el método que utilizó fue el de electroforesis capilar (Padmanabhan R. *et al.*, 2013). Gracias a esta secuenciación, los científicos tienen la habilidad de esclarecer la información genética de cualquier sistema biológico.

Los métodos de NGS son diferentes a los de Sanger en aspectos como: reacciones masivas en paralelo y costos. NGS se ha convertido en una tecnología ampliamente utilizada en laboratorios alrededor del mundo; tiene la capacidad de revelar una visión del genoma, transcriptoma y epigenoma de cualquier especie sin ningún límite. Esto permite que se avance a pasos agigantados en algunos campos científicos, como la investigación de diferentes enfermedades humanas (Liu L *et al.*, 2012).

La tecnología de NGS, es similar a la electroforesis capilar, la cual consiste en: fragmentar una cadena de ADN con enzimas de restricción, después

resintetizarlos con la cadena base de ADN, esta resintetización se hace limitando los oligos, es decir, se resintetizan los fragmentos de ADN en 4 tubos distintos, se agregan en cada tubo uno de los 4 oligos existentes (ddATP, ddGTP, ddCTP Y ddTTP); así se tienen fragmentos que terminan en la misma base y se puede separar por tamaños mediante una electroforesis. Hacer esto, es bastante lento, sin embargo, NGS extiende este proceso a millones de reacciones masivas en paralelo, en vez de estar limitado a unos cuantos fragmentos de ADN (Illumina *et al.*, 2013).

Para ilustrar el proceso de NGS, se toma una muestra de ADN genómico (ADNg), el cual se corta en pequeños fragmentos, los cuales son secuenciados de manera uniforme y precisa en millones de reacciones en paralelo. Las nuevas cadenas de esos fragmentos, se les conoce como lecturas, las cuales son reensambladas usando una cadena de ADN de referencia, y éstas secuencias alineadas revelan la secuencia completa del ADNg desconocido (**Figura 23**) (Illumina *et al.*, 2013).

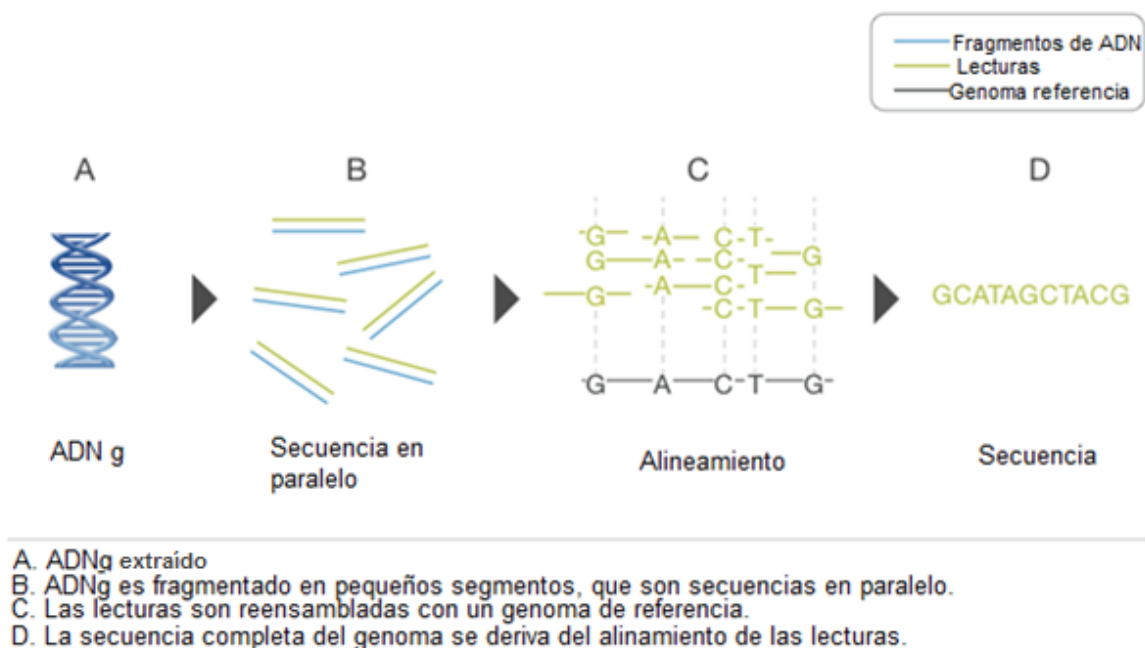


Figura 23. Diagrama de resecuenciación del genoma completo (Illumina *et al.*, 2013).

NGS, ha avanzado mucho con el paso de los años; en el 2007 una sola corrida de secuenciación producía un máximo de una giga base de datos; en el 2011 en una corrida se producen alrededor de una tera base de datos. Con la habilidad de

generar grandes cantidades de datos, se puede tener una idea de los datos completos en cuestión de horas. Los investigadores pueden secuenciar 5 genomas humanos al mismo tiempo y tener los resultados en semanas; la primera secuenciación del genoma humano tardó 10 años y 3 años más para poder analizar los datos (Illumina *et al.*, 2013).

Los avances en los métodos de NGS, han hecho posible estudiar a muchos microorganismos que no son cultivables, y también estudiar a comunidades enteras de microorganismos en un contexto nativo.

Existen muchos modelos comerciales para poder realizar secuenciaciones masivas, sin embargo, las más conocidas son: Sistema Roche 454, Sistema AB SOLiD (*Sequencing by Oligo Ligation Detection*) y Sistema de Illumia GA/HiSeq (*Genome Analyzer/ High Sequencing*). Las diferencias se encuentran en la **tabla 10** (Liu L *et al.*, 2012; Solomon K.V. *et al.*, 2014). Dependiendo de los alcances que se deseen y tomando en cuenta las características de las tecnologías actuales, se decide cual de ellas emplear.

Tabla 10. Diferentes plataformas de secuenciación (Liu L *et al.*, 2012; Solomon K.V. *et al.*, 2014).

Secuenciador	Roche 454	Illumia HiSeq	SOLiD
Mecanismo secuenciador	Pirosecuenciador	Secuenciación mediante síntesis	Ligación y codificación de dos bases
Extensión de lectura	500-600 pb	101-151 pb	85pb
Precisión	99.90%	98%	99.94%
Lecturas por corrida	106	3*10 ⁹	3*10 ⁹
Salida de datos	0.7 Gb	600 Gb	120Gb
Tiempo de lectura	23 horas	9 a 15 días	7 días
Aplicación Biológica	Metagenómica con el gen ribosomal 16S	Ensamblamiento de genoma completo	Trascriptómica

4.2 Metagenómica.

Cuando se realizan secuenciaciones de genomas individualmente, proveen mucha información, sin embargo, cuando se realizan secuenciaciones de genomas para una comunidad de bacterias, por ejemplo, esta información es mucho más completa y sobre todo, nos da un panorama más preciso de lo que pasa en esa comunidad; el análisis genómico de una comunidad de bacterias (generalmente bacterias no-cultivables), como la microbiota intestinal, se le conoce como metagenómica (Padmanabhan R. *et al.*, 2013), el metagenoma de la microbiota intestinal, o también conocido como microbioma, está compuesto por 100 veces más genes, que los genes que conforman al humano (Musso G. *et al.*, 2011; Rajilić-Stojanović M., 2013).

La metagenómica ha acelerado la forma de estudiar a comunidades bacterianas, nos da la posibilidad de conocer interacciones entre las bacterias de dicha comunidad, la actividad en conjunto y la naturaleza de su relación con el entorno (Padmanabhan R. *et al.*, 2013). El microbioma, tiene la capacidad de cambiar dinámicamente su configuración para adaptarse a las necesidades del huésped y de la comunidad bacteriana en general; dicha adaptación es requerida debido a muchos factores como los que ya se han mencionado en el capítulo 1 (Musso G. *et al.*, 2011).

La metagenómica trata de explicar dos preguntas principalmente: ¿Quién está ahí? y ¿Qué hace ahí?

Uno de los objetivos principales de la metagenómica es el estudio de la taxonomía, mediante similaridad de bases o bien, mediante la composición de bases. La primera compara en bases de datos, que tan similar es una secuencia de otra, dependiendo de cuantos nucleótidos se repitan o bien secuencias para aminoácidos; el segundo, compara la composición de los nucleótidos, por ejemplo: el contenido de guanina y citosina, el codón de uso, los patrones de uso de oligonucleótidos, entre otros. Se han empezado a introducir programas, en donde se utilizan estos dos métodos, para que el análisis sea más completo y preciso (Brady A. & Salzberg S., 2011).

La metagenómica nos permite saber que tipo de bacterias están presentes, la cantidad en la que se encuentran y que actividad tienen en dicha comunidad; gracias a esto, podemos saber que los *Firmicutes* disminuyen en enfermedades como la diabetes mellitus y que los *Bacteroides* aumentan; así como se puede saber que algunas bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal, producen metabolitos como: proteínas, ácidos grasos de cadena corta, endotoxinas, entre otras; ya sean benéficos o perjudiciales para la salud del huésped (Culligan E.P. *et al.*, 2014).

En la **figura 24**, se muestra en resumen el método para poder identificar y clonar nuevos genes, presentes en bacterias de cierta comunidad, usando la metagenómica. Primero se toma una muestra de interés; se aísla el contenido de ADN; se realiza un análisis de la secuencia de bases usando métodos de NGS; se crea una librería de clones; se focalizan al gen usando primers degenerados, diseñados a partir de regiones conservadas; se capturan los genes nuevos del plásmido, usando TRACA (captura de transposon asistido, por sus siglas en inglés *transposon-aided capture*) o usando PCR con primers que integran sitios conservados de la secuencia; se realiza una metagenómica funcional, la cual crea librerías de insertos grandes o pequeños, usando los vectores adecuados (plásmidos, fórmidos, cósmidos o BAC (cromosoma artificial bacteriano, por sus siglas en inglés *bacterial artificial chromosome*)); se escoge un huésped heterologo para la expresión metagenómica del ADN, los más utilizados son *E.coli* y algunas especies de *Streptomyces* y *Bacillus*; se identifican las clonas mediante el fenotipo de interés en placas; y para finalizar se clona el gen nuevamente para comprobar el fenotipo (Culligan E.P. *et al.*, 2014).

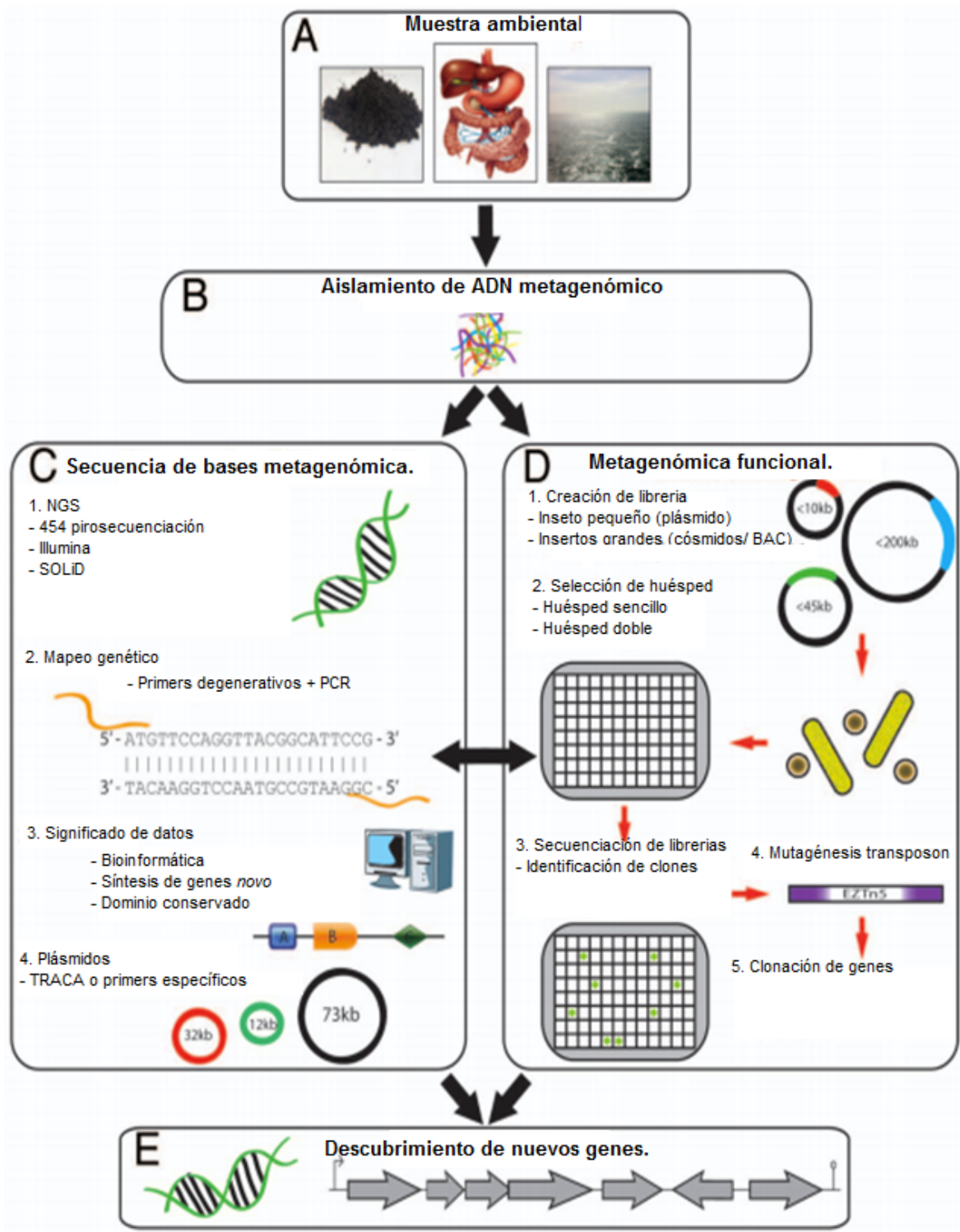


Figura 24. Método para descubrir nuevos genes usando la metagenómica (Culligan E.P. *et al.*, 2014).

Una gran parte de los proyectos de investigación de la metagenómica, están enfocados en encontrar genes y compuestos nuevos, pero también en encontrar especies nuevas. Algunos de los proyectos de investigación que están en desarrollo actualmente son: Meta Hit (por sus siglas en inglés, *Metagenomics of the Human Intestinal Tract*), HMP (por sus siglas en inglés *Human Microbiome Project*) y ELDERMET, entre otros (Claesson M.J. *et al.*, 2012).

Existen cambios en la expresión de genes microbianos, dependiendo si un individuo está sano o enfermo. Debido a estos cambios, la metagenómica podría predecir algún riesgo para desarrollar enfermedades como la diabetes mellitus, convirtiéndose en una herramienta indispensable para el diagnóstico, y también ser una estrategia terapéutica (Power S. E. *et al.*, 2014).

4.3 Ensayos *in vivo* e *in vitro*, para el estudio de la microbiota intestinal y su rol en la diabetes mellitus.

Existen experimentos para poder observar de forma más tangible los efectos en los cambios de la microbiota intestinal, estos pueden ser *in vivo* o *in vitro*. A continuación se van a mencionar algunos de estos ensayos y algunas de sus ventajas y desventajas.

Algunos ensayos *in vivo*, se hacen con ratones genéticamente modificados, en donde se eliminan la expresión de ciertos genes; como noquear el gen TLR5 en ratones, este gen es importante para que el sistema inmune reconozca antígenos bacterianos en el colon, estos ratones genéticamente modificados son hiperfágicos y desarrollan: hiperlipidemia, hipertensión, resistencia a la insulina e incremento en el tamaño de los adipocitos; la microbiota presente en estos ratones modificados genéticamente, fue transferida a ratones libres de microorganismos, y los efectos observados fueron los mismos, lo que indica que la microbiota intestinal, es la que es la responsable de la hiperlipidemia, hipertensión, resistencia a la insulina e incremento en el tamaño de los adipocitos (Vijay-Kumar *et al.*, 2010). Otro tipo de modificación genética en ratones, es provocar una mutación en el gen que codifica para la hormona leptina, la cual se encarga de controlar el apetito, manda la señal de saciedad al cerebro, a estos ratones se le

conoce como ratones *ob/ob*, en un inicio no es posible identificar a los ratones *ob/ob* de los normales, conforme pasa el tiempo, estos ratones engordan, el azúcar en sangre aumenta, los islotes pancreáticos se alargan y aumentan sus niveles de insulina, esto es debido a la ausencia de leptina funcional; con este tipo de ratones, se han realizado investigaciones para saber si la microbiota afecta al control glicémico y a la tolerancia a la glucosa, se tratan con antibióticos a los ratones *ob/ob*, disminuyendo los niveles de microbiota en el intestino y han observado que mejora la tolerancia a la glucosa significativamente (Membrez et al. 2008).

Los ratones genéticamente modificados se producen en laboratorios especializados. Existen en la actualidad aproximadamente 10,000 variedades de ratones con genes noqueados, a los que se les conoce como ratones *knockout*, los investigadores elijen el gen que quieren silenciar, dependiendo de lo que les interese investigar, estos genes noqueados ayudan a entender la función de dicho gen, lo cual ayuda a proponer tratamientos contra cierto tipo de enfermedades, incluyendo la diabetes. Existen otro tipo de transformaciones genéticas como los ratones transgénicos, cuyo objetivo es la sobre expresión de ciertas proteínas, para poder conocer los efectos de esta sobreexpresión; también existen los ratones *knockin*, los cuales son muy útiles cuando se quiere establecer un modelo de alguna enfermedad relacionada con mutaciones en algún gen humano (Hamra F.K., 2010).

Existen más investigaciones que se realizan con animales sin ningún cambio genético, simplemente se realizan cambios en dietas o bien se realizan trasplantes de microbiota. Algunos grupos de investigación como el de Zhang C., realizan investigaciones, alimentando a grupos de ratones con dietas que difieren los porcentajes de grasa e hidratos de carbono; otros grupos de investigación como el de Ridaura V. K., realizan experimentos trasplantando microorganismos de la microbiota de gemelos, uno obeso y otro delgado.

Gran parte de los grupos de investigadores, utilizan ensayos *in vitro* y también *in vivo*, como Possemiers S., publicó un artículo donde colocan heces humanas en el sistema SHIME (*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*) (del cual

se explicará su funcionamiento posteriormente), para poder identificar la microbiota presente y desarrollar una microbiota, agregando prebióticos, que produzca cierto tipo de metabolitos benéficos para la salud, cuando se tuvieron las bacterias de interés en el ensayo *in vitro*, se procedió a inocular a ratas con esta nueva microbiota, para observar si seguía produciendo metabolitos. Debido a todos los factores que ya revisamos en el capítulo 1, es muy difícil saber los efectos que tienen los prebióticos en el cuerpo humano, es por ésta razón que mucho ensayos inician *in vitro* y después evolucionan a ensayos *in vivo*. Otro grupo de investigación a cargo de Van den Abbeele P., así como Possemiers S., realizan investigaciones, acoplando los dos tipos de ensayos, para poder observar el efecto bifidogénico de prebióticos como los FOS y la inulina.

Los modelos de lumen intestinal para poder llevar acabo los ensayos *in vitro*, son:

* Lote de incubación de corto tiempo: este es el más simple y se usa para la mayoría de los ensayos *in vitro*, es para estudiar lotes de fermentación estáticos. Se colocan microorganismos aislados de animales o humanos, en pequeños reactores o tubos de prueba, para probar su habilidad de metabolizar diferentes sustancias. Este tipo de sistemas está lejos de ser una aproximación fisiológica. Son usados generalmente para poder hacer proyecciones iniciales (Venema K & Van Den Abbeele P., 2013).

* Sistema continuo multicompartamental: estos sistemas permiten el estudio profundo de la microbiota intestinal, así como la actividad de moléculas provenientes de la comida o la actividad de la microbiota dependiendo de la dieta, bajo condiciones ambientales representativas (Venema K & Van Den Abbeele P., 2013). Algunos modelos multicompartamentales son:

* MacFarlane/Gibson, sistema de cultivo continuo de tres etapas. Inició en los 80's, con el grupo de Mac Farlane y Gibson. Este modelo consiste en tres recipientes conectados entre sí, los cuales representan el colon, ascendente, transverso y distal. El pH de estos recipientes es de 6.0, 6.5 y 7.0, respectivamente, el volumen de operación es de 300, 500 y 800mL, con diluciones de 80, 48 y 34mL/h. El tiempo de retención total en el sistema es aproximadamente de 63 horas. El medio de crecimiento consiste

en una fuente de proteína e hidratos de carbono complejos (pectina, arabinogalactano, xylano y almidones resistentes), los cuales no pueden ser digeridos por las enzimas del cuerpo humano y son fermentados por la microbiota presente en el colon (Venema K & Van Den Abbeele P., 2013).

* SHIME. El simulador del ecosistema microbiano del intestino humano SHIME, consiste en una sucesión de cinco reactores, los cuales simulan el tracto digestivo. Los dos primeros reactores, simulan el estómago y el intestino delgado, en donde además del medio que vimos anteriormente, se agregan enzimas pancreáticas y bilis para simular las condiciones. Los tres reactores siguientes tienen las mismas condiciones que el de MacFarlane/Gibson, el tiempo de retención final cambia a 72 horas. Después de la inoculación de los microorganismos fecales, se estabiliza durante dos semanas para que la microbiota se adapte a las condiciones *in vitro*. Después de el tiempo de estabilización, se deja dos semanas más para un periodo de control y dos o tres semanas para el tratamiento. Finalmente un periodo de dos semanas para el lavado, esto permite evaluar si hay reversibilidad del tratamiento (Venema K & Van Den Abbeele P., 2013).

* Entero Mix. Está compuesto por cuatro recipientes de vidrio, los cuales representan el colon ascendente, transversal, descendiente y distal. Es posible correr cuatro unidades al mismo tiempo, usando el mismo inóculo fecal. Los recipientes trabajan con volúmenes pequeños, aproximadamente de 6 a 12mL. Los niveles de pH son similares a las condiciones *in vivo*, 5.5, 6.0, 6.5 y 7.0 respectivamente. El inóculo es mezclado en el primer recipiente con 10mL de cultivo, después es bombeado al siguiente recipiente de la cadena. Tres horas después se bombea medio simulador a través del primer recipiente, esto se hace durante 48 horas continuas y después se colectan las muestras de todos los recipientes (Venema K & Van Den Abbeele P., 2013).

* Modelo Lacroix. Es un modelo de tres etapas, desarrollado por el grupo de Lacroix en Zurich, usa microbiota inmovilizada, con la idea de representar la

complejidad de la comunidad microbiana en el colon. El inóculo fecal, se inmoviliza en unas bolitas de gel (compuestas por goma xantana, gelana y citrato de sodio) de diámetro entre 1 y 2mm. Los parámetros son ajustados a los del intestino de un niño. El tiempo de retención total es de 13 horas, con un volumen total de 325mL y un flujo de 25mL/h, lo que representa un tiempo de retención de 4 a 4.5 horas en cada recipiente. El pH de los recipientes es de 5.9, 6.2 y 6.7, respectivamente (Venema K & Van Den Abbeele P., 2013).

* TIM-2. Fue desarrollado por los holandeses, consiste en cuatro bolsas de vidrio con membranas de silicón flexible por dentro. Se simulan los movimientos peristálticos, presionando las membranas flexibles de las bolsas. El pH se mantiene en 5.8 y el volumen es de 135 mL. Se pueden hacer diez corridas en paralelo, usando el mismo inóculo fecal. Este es el único modelo que tiene membranas para diálisis, las cuales simulan el transporte de metabolitos producidos por la microbiota, al cuerpo, también previene la acumulación de los mismos en el lumen. Se puede inocular al sistema con una gran cantidad de microorganismos, debido a que no se satura tan fácilmente. Los experimentos se llevan a cabo en periodos cortos de tiempo (de 1 a 3 días). Generalmente este modelo sólo simula el colon proximal (Venema K & Van Den Abbeele P., 2013).

Los ensayos *in vitro*, así como los *in vivo*, tienen muchas limitaciones, sin embargo, cuando se complementa uno con el otro, los resultados son más prometedores, ya que los ensayo *in vitro*, arrojan información sobre algunos efectos externos como la dieta, uso de antibióticos y consumo de prebióticos; los ensayos *in vivo*, dan información sobre el comportamiento de la microbiota en un modelo tan completo como lo es el tracto gastrointestinal de un mamífero, se pueden conocer la reacción del sistema inmune, efecto de metabolitos producidos a partir de la fermentación de hidratos de carbono complejos, estudiar el comportamiento de la microbiota en modelos diabéticos, por mencionar algunos.

Conclusiones.

Se sabe que la microbiota intestinal está constituida por más de 10^{11} células microbianas, la cual es afectada por muchos factores de la vida cotidiana, sin embargo, se ha tratado de modularla para poder encontrar un tratamiento eficiente contra la diabetes mellitus.

Algunas de las investigaciones recientes, sugieren transplantes de microbiota de huéspedes sanos a pacientes con dicha enfermedad, otras más se han enfocado a la identificación de los géneros que representan la microbiota de un huésped sano para que de esta forma, mediante alimentos adicionados con probióticos y prebióticos y uso estratégico de antibióticos, se pueda tener la microbiota intestinal ideal para mantener un buen estado de salud, de igual importancia se encuentran las investigaciones dedicadas a la identificación de la actividad del microbioma, para poder conocer más íntimamente la influencia metabólica que esta población confiere al huésped y así poder proponer soluciones como tratamiento o bien preventivas para evitar el desarrollo de dicha enfermedad.

Con todas las investigaciones que se han realizado hasta el momento, se puede inferir que la microbiota intestinal puede ser la clave, para tratar la diabetes mellitus debido a la relación íntima que existe entre la actividad metabólica de la microbiota intestinal, el sistema inmune y metabolismo del huésped.

Se espera que en un futuro cercano, con todos los avances en tecnología, se logre proponer un tratamiento de modulación para mejorar la calidad de vida de los pacientes y bajar la incidencia de esta enfermedad en México y el mundo.

Perspectivas.

Los estudios practicados hasta el momento en microbiota intestinal han sido de gran importancia para poder incorporar métodos y conceptos que facilitan el análisis de la riqueza de los datos generados por los nuevos métodos de secuenciación, sin embargo, no se ha abarcado todo lo relevante para poder entender por completo el funcionamiento y composición de la microbiota intestinal.

Es indispensable que los lazos entre la diversidad y la función de la microbiota, sean establecidos para poder entender los mecanismos que contribuyen a la patogenicidad de diferentes enfermedades, en especial diabetes mellitus, debido a disbiosis en la microbiota intestinal, o bien factores que influyen en la composición de la misma, como los que se mencionaron en el capítulo uno. También es de vital importancia hacer uso de métodos como los de NGS y metagenómica, para poder comparar el comportamiento y composición de la diferente ecología de la microbiota, dependiendo de los factores a los que se exponga. Se requiere hacer investigaciones en las cuales se estudie más a fondo la interacción que existe entre enfermedades como la diabetes mellitus y la permeabilidad del intestino así como algunas disfunciones de la barrera intestinal.

Otro camino que puede tomar el estudio de la microbiota intestinal es el estudio del rol de diferentes microorganismo (probióticos), para usarlos como herramientas terapéuticas.

Con lo anterior se podría comenzar a formular estrategias que permitan diagnosticar, tratar o prevenir la diabetes mellitus.

Referencias.

1. Abell G.C.J., Cooke C.M., Bennett C.N., Conlon M.A., McOrist A.L.. Phylotypes related to *Ruminococcus bromii* are abundant in the large bowel of humans and increase in response to a diet high in resistant starch. *FEMS Microbiology Ecology* 2008;66:505–15.
2. Albenberg L.G., Wu G.D.. Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1564-72.
3. Alemán, J.O., Eusebi, L.H., Ricciardiello, L., Patidar, K., Sanyal, A.J., & Holt, P.R.. Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia. *Gastroenterology*. 2014; 146(2), 357-373.
4. Altschul S.F. , Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 3389- 3402.
5. Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Caballero V., Castellano V. Assessment of Prebiotics and Probiotics: An Overview. *Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.* 2010; 19-41.
6. Atkinson M.A., Chervonsky A.. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? early evidence from humans and animal models of the disease. *Diabetologia*. 2012;55(11):2868-77.
7. Auricchio R., Paparo F., Maglio M., Franzese A., Lombardi F., Valerio G., Nardone G., Percopo S., Greco L., Troncone R.: In vitro–deranged intestinal immune response to gliadin in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53:1680–1683.
8. Baddini F. A., Fernandes P. .A, Ferreira da Costa N, et al. Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. *Nutr. Hosp.* 2009; 24:422–28.
9. Bellavia M., Tomasello G., Romeo M., Damiani P., Lo Monte A.I., Lozio L., Campanella C., Gammazza A.M., Rappa F., Zummo G., Cocchi M., Conway De Macario E., Macario A.J.L., Cappello F.. Gut microbiota imbalance and chaperoning system malfunction are central to ulcerative colitis pathogenesis and can be counteracted with specifically designed probiotics: A working hypothesis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2013;202(6):393-406.

10. Bertram, T. A., Ludlow, J. W., Basu, J., & Muthupalani, S. (2013). *Digestive tract*. Pag: 2277-2357.
11. Bister V., Kolho K.L., Karikoski R., Westerholm-Ormio M., Savilahti E., Saarialho-Kere U.: Metalloelastase (MMP-12) is upregulated in the gut of pediatric patients with potential celiac disease and in type 1 diabetes. *Scand J Gastroenterol*. 2004; 40:1413–1422.
12. Bjornekleit A., Viddal K.O., Midtvedt T., *et al.*. Intestinal and gastric bypass. Changes in intestinal microecology after surgical treatment of morbid obesity in man. *Scand. J. Gastroenterol*. 1981; 16:681–87.
13. Boroni Moreira A.P., de Cássia Gonçalves Alfenas R.. The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Nutricion Hospitalaria*. 2012; 27(2):382-90.
14. Brady, A. & Salzberg S.. PhymmBL expanded: confidence scores, custom databases, parallelization and more. *Nat. Methods*. 2011; 8, 367.
15. Brock. (2009). *Biología de los microorganismos*. 12° edición. España. Editorial Pearson Educación.
16. Brooks, G. (2008). *Microbiología médica de Jawetz, Menick y Adelberg*. 19° edición. México. Editorial El Manual Moderno.
17. Brugman S., Klatter F.A., Visser J.T. *et al.* Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia*. 2006; 49:2105–2108.
18. Calcinaro F., Dionisi S., Marinaro M. *et al.* Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*. 2005; 48:1565–1575.
19. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R.. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
20. Cani P.D., Delzenne N.M.. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 729–734.
21. Cani P.D., Delzenne N.M.. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*. 2011; 130: 202-12.
22. Cani, P.D., Delzenne, N.M.. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des*. 2009; 15, 1546–1558.

23. Carvalho B.M., Guadagnini D., Tsukumo D.M., Schenka A.A., Latuf-Filho P., vASSALLO j., *et al.* Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signaling in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 2012; 55:2823-2834.
24. Casanova C.D., Sanabria A.M., Cabrera R.E. & Pérez P.J.. Anticuerpos antiislotes pancreáticos en diabéticas gestacionales: problemas maternos y complicaciones neonatales. *Rev Cubana Ginecol*. 2001;27(1):46-52.
25. Cervantes G.A., (2014). Probióticos y salud humana. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
26. Chillarón, J.J., Flores Le-Roux, J.A., Benaiges, D., & Pedro-Botet, J.. Type 1 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2014; 63(2), 181-187.
27. Claesson M.J., Jeffery I.B., Conde S., Power S.E., O'Connor E.M., Cusack S., Harris H.M., Coakley M., Lakshminarayanan B., O'Sullivan O., *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 2012; 488:178-84; PMID:22797518; nature11319.
28. Clark, P., & McDonald, T.. (2013). *Diabetes mellitus*.
29. Clausen, M., Jorgensen, J., & Mortensen, P.B. Comparison of diarrhea induced by ingestion of fruc-tooligosaccharide Idolax and disaccharide lactulose: role of osmolarity versus fermentation of malabsorbed carbohydrate. *Digestive Diseases and Sciences*. 1998; 43, 2696–2707.
30. Cole J.R., Chai B., Marsh T.L., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., Chandra S., McGarrell D.M., Schmidt T.M., Garrity G.M., Tiedje J.M.. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31: 442-443.
31. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R.. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009;326(5960):1694-7.
32. Culligan E.P., Sleator R.D., Marchesi J.R., Hill C.. Metagenomics and novel gene discovery: Promise and potential for novel therapeutics. *Virulence*. 2014;5(3).
33. Cummings J.H., Englyst H.N.. What is dietary fiber?. *Trends in Food Science and Technology*. 1991;2:99–103.
34. Cummings J.H., Macfarlane G.T.. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991;70:443–59.

35. De La Cochetière M.F., Durand T., Lepage P., Bourreille A., Galmiche J.P. and Doré J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short course antibiotic challenge. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43(11):5588-5592.
36. Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A.. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008. 6:e280.
37. De vrese, M., & Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 2008; 111, 1–66.
38. Diamant M., Blaak E.E., de Vos W.M.. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity Reviews.* 2011;12(4):272-81.
39. Di Gioia D., Aloisio I., Mazzola G. and Biavati B.. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probióticos in infants. *Appl. Microbiology and Biotechnology.*2014; 98: 563-577.
40. Duseja, A., & Chawla, Y. K.. Obesity and NAFLD. the role of bacteria and microbiota. *Clinics in Liver Disease.* 2014; 18(1), 59-71.
41. Elia M, Cummings JH. Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. *Eur. J. Clin. Nutr.*2007; 61(Suppl. 1):S40–74.
42. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012). Resultados nacionales. Citado el 14 de mayo 2014.
43. Euzéby, J.P.. "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature; page on minimal standards". Retrieved 16 March 2011.
44. Everard A. & Cani P.D.. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2013; 27:73-83.
45. Fallani M., Amarri S., Uusijarvi A., Adam R., Khanna S., Aguilera M., Gil A.,
46. Vieites J.M., Norin E., Young D., Scott J.A., Doré J., Edwards C.A., INFABIO team. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology* 2011; 157:1385–1392.
47. Fallucca, F., Porrata, C., Fallucca, S., & Pianesi, M.. Influence of diet on gut microbiota, inflammation and type 2 diabetes mellitus. first experience with macrobiotic ma-pi 2 diet. *Diabetes/metabolism Research and Reviews.* 2014; 30(S1), 48-54.

48. Frayling T.M.. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nature Reviews.Genetics*. 2007; 8: 657-662.
49. Flint H.. The impact of nutrition on the human microbiome. *International Life Sciences Institute*. 2012; 70: S10–S13.
50. Gabert L., Vors C., Louche-Péllissier C., Sauvinet V., Lambert-Porcheron S., Draï J., *et al.* ¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1- ¹³C3]tripalmitin and [1,1,1- ¹³C3]triolein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2011;25:2697–703.
51. García G.M., Quintero R.A. y Munguía- López C.A..*Bioteconología alimentaria* (2009). 5º edición. México. Editorial Limusa.
52. García-Ríos A., Meneses M. E., Pérez-Martínez P., Pérez-Jiménez F. Omega-3 and cardiovascular disease: beyond the risk factors. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. 2009; 29(1):4-16.
53. Gardner D.G. y Shoback D.. (2012). Greenspan. Endocrinología básica y clínica. 9º edición. México. Editorial McGraw-Hill.
54. Gautam D., Morten O.A. Sommer, Patrick H. Degnan, and Andrew L. Goodman. Experimental approaches for defining functional roles of microbes in the human gut. *Annu. Rev. Microbiol.* 2013; 67:459–75.
55. Gibson, G.R., Prfobert, H.M., Van Loo J.. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 2004; 17: 259–275.
56. Gilliam L.K., Binder K.A., Banga J.P., Madec A., Ortqvist E., Kockum I., Luo D., Hampe C.S.. Multiplicity of the antibody response to GAD65 in type I diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2004;138(2):337-41.
57. Goh K.I., Cusick M.E., Valle D., Childs B., Vidal M., Barabasi A.L.. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(21):8685–90.
58. Goldsmith R. & Sartor B.. The rol of diet on intestinal microbiota metabolism: downstream impacts on host immune function and health, and therapeutic implications. *Gastroenterol*. 2014; 49:785-798.
59. Gonzalez A., Clemente J.C., Shade A., Metcalf J.L., Song S., Prithviraj B., Palmer B.E., Knight R.. Our microbial selves: What ecology can teach us. *EMBO Rep*. 2011;12(8):755-84.
60. Guarner F., Schaafsma G.J.. Probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1998; 39: 237-238.

61. Gugliucci A.. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc*. 2000; 100:621-633.
62. Hamra F.K.. Advances in stem-cell technology have broken the barrier to gen targeting in mammals other than mice. A wide array of research opportunities now opens up, especially in studies involving the laboratory rat. *Nature*. 2010; 467: 162-163.
63. Harmsen H.J., Gibson G.R., Elfferich P., Raangs G.C., Wildeboer-Veloo A.C., Argaz A., Roberfroid M.B., Welling G.W.. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 183: 125-129.
64. Higashida, B. (2005). *Ciencias de la Salud*. 5^o edición. México. Editorial McGraw-Hill.
65. Hirsch, I. B., Buse, J. B., Leahy, J., McGill, J. B., Peters, A., Rodbard, H. W., Riddle, M. C.. Options for prandial glucose management in type 2 diabetes patients using basal insulin: Addition of a short-acting GLP-1 analogue versus progression to basal-bolus therapy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2014; 16(3), 206-214.
66. Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, Sentrix, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, VeraCode, the pumpkin orange color, and the Genetic Energy streaming bases design. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2013; 770-2012-008.
67. Jialal I., Huet B.A., Kaur H., Chien A., Deveraj S.. Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2012; 35:900-904.
68. Kamlesh S., Basavaraj K., Ajay K. and Vidhi T.. Probiotics: a Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011; 287-290.
69. Kelly C.J., Colgan S.P., Frank D.N.. Of microbes and meals: The health consequences of dietary endotoxemia. *Nutrition in Clinical Practice*. 2012;27(2):215-25.
70. King C., Sarvetnick N.. The incidence of type-1 diabetes in NOD mice is modulated by restricted flora not germ-free conditions. *PLoS One*. 2011; 6:e17049.
71. Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G.. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 1998; 41: 103-125.
72. Kolida S., Saulnier D.M., and Gibson G.R. Gastrointestinal Microflora: Probiotics. *Advances in Applied Microbiology*. 2006. 59: 187-219.

73. Kovacic, J.C., Castellano, J.M., Farkouh, M.E., and Fuster, V.. The relationships between cardiovascular disease and diabetes: Focus on pathogenesis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2014; 43(1), 41-57.
74. Larsen N., Vogensen F.K., van den Berg F.W., Nielsen D.S., Andreasen A.S., Pedersen B.K., *et al*. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, 2010; 5:e9085.
75. La Serre, de, C.B., Ellis, C.L., Lee, J., Hartman, A.L., Rutledge, J.C., and Raybould, H.E.. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 299, G440– G448.
76. Lastra, G., Syed, S., Kurukulasuriya, L.R., Manrique, C., and Sowers, J.R.. Type 2 diabetes mellitus and hypertension: An update. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2014; 43(1), 103-122.
77. Lau K., Benitez P., Ardisson A. *et al*. Inhibition of type 1 diabetes correlated to a Lactobacillus johnsonii N6.2-mediated Th17 bias. *J Immunol*. 2011; 186:3538–3546.
78. Layman, Donald K., Boileau, R.A.; Erickson D.J., Painter J.E., Shiue H., Sather C., Christou D.D.. A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women. *The Journal of Nutrition*. 2003; 133 (2): 411–7.
79. Lazo M.L. & Fernandez-Mejia C.. Beta-Cell Function and Failure in Type 1 diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2011; 953-307-362.
80. Leroux, C., Brazeau, A. -, Gingras, V., Desjardins, K., Strychar, I., & Rabasa-Lhoret, R.. Lifestyle and cardiometabolic risk in adults with type 1 diabetes: A review. *Canadian Journal of Diabetes*. 2014; 38(1), 62-69.
81. Li D., Yang M., Edwards S., Ye S.. Nonalcoholic fatty liver disease: For better or worse, blame the gut microbiota? *J Parenter Enteral Nutr*. 2013;37(6):787-93.
82. Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M.. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;2012.
83. Louis P. and FlintH.J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett*.2009; 294:1–8.

84. Louis P., Scott K. P., Duncan S. H., & Flint H. J. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 102(5), 1197-1208.
85. Lourens A. and Vijoën B.C.. Dosis minima terapéutica. *International Dairy Journal*. 2001; 11: 1-17.
86. Manco M., Putignani L., Bottazzo G.F.. Gut microbiota, lipo-polysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr Rev*. 2010; 31 (6): 817-44.
87. Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Guigas C., Franz C., Holzapfel W.H.. Functional Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Maasai Traditional Fermented Milk Products in Kenya. *Curr Microbiol*. 2008; 56: 315-321.
88. Mayrhofer M., Rabin D.U., Messenger L., Standl E. & Ziegler A.G.. Value of ICA512 antibodies for prediction and diagnosis of type 1 diabetes. *Thieme eJournals*. 1996;104(3):228-34.
89. Mehal W.Z.. The gordian knot of dysbiosis, obesity and nafld. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2013;10(11):637-44.
90. Membrez M., Blancher F., Jaquet M., Bibiloni R., Cani P.D., Burcelin R.G., et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J*. 2008;22(7):2416–2426.
91. Merck Sharp & Dohme I.A. Corp.. ¿Qué sucede en la diabetes tipo2?. 2012. Citado el 30 de mayo del 2014.
92. Moreira A.P.B., Texeira T.F.S., Ferreira A.B., Do Carmo Gouveia Peluzio M., De Cássia Gonçalves Alfenas R.. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012;108(5):801-9.
93. Moreno-Indias, I., Cardona, F., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I.. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5(APR).
94. Musso G., Gambino R., Cassader M.. Interactions Between Gut Microbiota and Host Metabolism Predisposing to Obesity and Diabetes. *Diabetes Care*. 2010; 33: 2277–2284.
95. O'Connell, K., & Brasel, K.. Bile metabolism and lithogenesis. *Surgical Clinics of North America*. 2014; 94(2), 361-375.
96. Ordoñas JM, Mooser V. Metagenomics: the role of the micro-biome in cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 157–161.

97. O'Sullivan D.J.. Methods for analysis of the intestinal microflora. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2000; 1: 39-50.
98. Padmanabhan R., Mishra A.K., Raoult D., Fournier P.. Genomics and metagenomics in medical microbiology. *J Microbiol Methods.* 2013;95(3):415-24.
99. Peterfreund G.L. (2012). Bacterial and microeukaryotic succession in the gut microbiome during infection by *Clostridium difficile*. Thesis. Cell and Molecular Biology Presented to the Faculties of the University of Pennsylvania.
100. Polychronakos C. & Li Q.. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nature Reviews. Genetics.* 2011; 12:781-792.
101. Possemiers S., Rabot S., Espín J.C., Bruneau A., Philippe C., González-Sarrías A., Heyerick A., Tomás-Barberán F.A., Keukeleire D.D., Verstraete W.. *Eubacterium limosum* activates isoxanthohumol from hops (*humulus lupulus* L.) into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in rat intestine. *J Nutr* 2008;138(7):1310-6.
102. Power S.E., O'Toole P.W., Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F.. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr.* 2014;111(3):387-402.
103. Proal A.D., Albert P.S., Marshall T.. Autoimmune disease in the era of metagenome. *Autoimmunity Reviews.* 2009; 8:677-681.
104. Raetz C.R.H., Whitfield C.. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71: 635-700.
105. Rajilić-Stojanović M. Function of the microbiota. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology.* 2013;27(1):5-16.
106. Requena T., Burton J., Matsuki T., Munro K., Simon M.A., Tanaka R., Watanabe K., Tannock G.W.. Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 2420-2427.
107. Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Gordon, J.I.. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science.* 2013; 341(6150).
108. Robinson C.J., Bohannan B.J.M., Young V.B.. From structure to function: The ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2010;74(3):453-76.
109. Roche. Diabetes mellitus: Agenda 2001. *España: Atlas Medical Publishing Ltd;* 2001: 1-78.

110. Rosado-Pérez J. & Mendoza-Núñez V.M.. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 2007; 32: 58-69.
111. Salonen A. and Vos W.M.. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *The Annual Reviews of Food Science and Technology*. 2014; 5:6.1-6.24.
112. Sánchez de Rivas C.. Antibióticos, ayer, hoy y mañana. *Revista química viva*. 2006; 5(2).
113. Sánchez-Zamora, Y. I., & Rodríguez-Sosa, M.. The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2014.
114. Sapone A., de Magistris L., Pietzak M., Clemente M.G., Tripathi A., Cucca F., Lampis R., Kryszak D., Carten`i M., Generoso M., Iafusco D., Prisco F., Laghi F., Riegler G., Carratu R., Count S.D., Fasano A.. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*. 2006; 55:1443–1449.
115. Sathyabama S., Khan N. and AgrewalaJ.N.. Friendly pathogens: prevent or provoke autoimmunity. *Critical Reviews in Microbiology*. 2014; 40(3): 273-280.
116. Secretaría de Salud. Presupuesto de Egresos de la Federación (PEF) 2012. Citado el 14 de mayo del 2014.
117. Schwitzgebel V.M.. Many faces of monogenic diabetes. *Journal of Diabetes Investigation* 2014;5(2):121-33.
118. Scott K., Gratz S.W., Sheridan P.O. and Flint H.J. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*. 2013; 69, 52-60.
119. Solomon K.V., Haitjema C.H., Thompson D.A., O'Malley M.A.. Extracting data from the muck: Deriving biological insight from complex microbial communities and non-model organisms with next generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;28:103-10.
120. Stanton C., Desmond C., Coakley M., *et al.* (2003). Handbook of fermented functional foods. Ed. In E.R. Franworth (pp. 27-58). Boca Raton, USA.
121. Stepanov V., Stankov K. and Mikov M. The bile acid membrane receptor TGR5: a novel pharmacological target in metabolic, inflammatory and neoplastic disorders. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2013; 13(4), 213-223.
122. Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D., Doré J.. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65: 4799-4807.

123. Sun Z., Liu W., Gao W., Yang M., Zhang J., Wu L., Wang J., Menghe B., Sun T. & Zhang H.. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: The naturally fermented yak milk in Qinghai, China. *Gen. Appl. Microbiol.* 2010; 56,1-10.
124. Sweet, M.J., and Hume, D.A.. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biology.* 1996; 60, 8–26.
125. Toubal A., Treuter E., Clément K., and Venteclef N.. Genomic and epigenomic regulation of adipose tissue inflammation in obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2013; 24(12): 625-634.
126. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027– 1031.
127. Vaarala O.. Is the origin of type 1 diabetes in the gut?. *Immunology and Cell Biology.* 2012; 90, 271–276.
128. Vaarala, O., Atkinson, M.A., & Neu, J.. The "perfect storm" for type 1 diabetes: The complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes.* 2008; 57(10), 2555-2562.
129. Van den Abbeele P., Gérard P., Rabot S., Bruneau A., El Aidy S., Derrien M., Kleerebezem M., Zoetendal E.G., Smidt H., Verstraete W., van de Wiele T., Possemiers S.. Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ Microbiol* 2011;13(10):2667-80.
130. Vaughan E.E., Schut F., Heiling H.G.H.J., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Akkermans A.D.L.. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2000 1: 1-12.
131. Venema K., Van Den Abbeele P.. Experimental models of the gut microbiome. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 2013;27(1):115-26.
132. Vijay-Kumar M., Aitken J.D., Carvalho F.A., Cullender T.C., Mwangi S., Srinivasan S., *et al.* Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science.* 2010;328(5975):228–231.
133. Vipperla K, O’Keefe SJ. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutr Clin Pract.* 2012; 27(5):624–35.
134. Volker M.. Dietary Modification of the Intestinal Microbiota. *International Life Sciences Institute.* 2004; 10: 235–242.

135. Walker A.W., Ince J., Duncan S.H., *et al.* Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME Journal* 2011;5:220–30.
136. Wall R, Ross RP, Shanahan F, *et al.* Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 89:1393–401.
137. Welling G.W., Elfferich P., Raangs G.C., Wildeboer-Veloo A.C., Jansen G.J., Degener J.E.. 16S Ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1997; 222: 17-19.
138. Wen L., Ley R.E., Volchkov P.Y. *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature.* 2008; 455:1109–1113.
139. Westerholm-Ormio M., Vaarala O., Pihkala P., Ilonen J., Savilahti E.. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52:2287–2295.
140. World Health Organization (WHO) 2013. *10 facts about diabetes.* Citado el 13 de mayo de 2014.
141. World Health Organization (WHO) & Food and Agriculture Organization (FAO) 2001. Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos.
142. World Health Organization (WHO) & Food and Agriculture Organization (FAO) 2002. Expert Consultation. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
143. Witkin S.S., Linhares I.M., Giraldo P.. Bacterial flora of the female genital tract: Function and immune regulation. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2007;21(3):347-54.
144. Wos-Oxley M.L., Plumeier I., Von Eiff C., Taudien S., Platzer M., Vilchez-Vargas R., Becker K., Pieper D.H.. A poke into the diversity and associations within human anterior nares microbial communities. *ISME Journal.* 2010;4(7):839-51.
145. Zhang C., Zhang M., Pang X., Zhao Y., Wang L., Zhao L.. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME Journal* 2012;6(10):1848-57.
146. Zoetendal E.G., Akkermans A.D., de Vos W.M.. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 3854- 3859.

147. Zoetendal E.G., Collier C.T., Koike S., Mackie R.I., Gaskins H.R.. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* 2004; 134: 465-472.

148. Zoetendal E.G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D., de Vos W.M.. Mucosa- associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 3401-3407.