



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES
OBESOS CON Y SIN HIPERTENSIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ADRIANA ALVÍTER PLATA

CDMX

2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: GARZA VELASCO RAÚL

VOCAL: PROFESOR: CERVANTES PEREDO ALICIA BEATRIZ

SECRETARIO: PROFESOR: AGUIRRE GARCÍA MARÍA MAGDALENA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN UNAM-INC, LABORATORIO DE
INMUNOBIOQUÍMICA MOLECULAR Y CARDIOPATÍAS. INSTITUTO NACIONAL
DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ.**

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

SUSTENTANTE: ADRIANA ALVÍTER PLATA

Proyectos que financiaron esta investigación:

De manera parcial, por el Fondo Sectorial **SEP-CONACyT, 2016/284018: "Análisis funcional de proteínas fosfatasa secretadas por promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* de aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea y el efecto en la inmunomodulación de células innatas"** y totalmente, por el proyecto IN218619 DGAPA-PAPIIT-UNAM **"Identificación de la microbiota oral y biomarcadores inflamatorios en pacientes que presentan algún tipo de enfermedad cardiovascular"**. Ambos apoyos otorgados a la Dra. María Magdalena Aguirre García y el presente estudio es parte de este último protocolo.

Agradecimientos:

A la Dra. Magda que me permitió ser parte del equipo de laboratorio. A la Dra. Alma que ha sido el mayor ejemplo de como ser una mujer en la ciencia. No pude haber elegido a mejores mentoras.

A mis compañeros de laboratorio, sin sus risas, su paciencia y apoyo incondicional este proyecto nunca hubiera sido posible. En especial a Paulina, quien me enseñó que todos los resultados no esperados también generan avance.

A mis papás, que aguantaron todos cambios de humor y quejas durante mi estancia en la Universidad. Son mi mayor motivación y mi ejemplo de vida.

A mis hermanos, Raúl y Noemí que han llenado mi vida de risas y diversión.

A Canu, eres mi compañero en todo momento. Gracias por estar en todos mis desvelos y por sacarme una sonrisa después de sentir que no hay luz en mi camino. Eres ese rayito de sol en mis días fríos.

Gracias a mis amigos, Emely, Octavio y Xiadani por ser la risa de la mañana antes de cada clase, el abrazo después de cada lágrima de estrés y el cobijo que necesitaba todos los días en la facultad.

Mi amor y mi cariño está con cada uno de ustedes.

*"As always in life, people want a simple answer... and it's
always wrong"*
-Susan Greenfield

Índice:

Listado de figuras:	9
Listado de tablas:	11
Listado de abreviaturas:	12
Resumen:	14
1. Antecedentes:	16
1.1. Anatomía y fisiología del intestino grueso:	16
1.2. Microbiota	17
1.3. Microbiota Intestinal	18
1.3.1. Factores geográficos, alimenticios y genéticos que la modifican:	18
1.3.2. Microbiota intestinal en la generación de metabolitos:	19
1.4. Papel de la microbiota en el estado de salud y enfermedad	22
1.4.1. Tipos de disbiosis:	23
1.4.2. Diabetes mellitus	24
1.4.3. Síndrome de colon irritable	25
1.4.4. Obesidad	26
1.4.5. Hipertensión Arterial Sistémica	31
1.5. Microbiota intestinal e Hipertensión	32
1.5.1. Estudios de la microbiota en sujetos con hipertensión realizados en diferentes poblaciones humanas	33
1.6. Métodos de estudio de la microbiota	34

1.6.1.	Historia del estudio de la microbiota	34
1.6.2.	Secuenciación de Nueva Generación	34
1.6.3.	Técnicas bioinformáticas enfocadas en el uso de los genes para RNA ribosomal 16S (rRNA, ribosomal RNA, por sus siglas en inglés).....	38
2.	Objetivos:	41
2.1.	Objetivo general:	41
2.2.	Objetivos específicos:.....	41
3.	Hipótesis:.....	41
4.	Métodos:	42
4.1.	Selección de pacientes:	42
4.2.	Recolección y conservación de la muestra de heces del paciente.....	45
4.3.	Extracción del DNA	45
4.3.1.	Cuantificación de DNA y análisis de pureza	46
4.3.2.	Análisis de integridad	46
4.4.	Conservación del DNA.....	46
4.5.	Análisis de las secuencias.....	48
4.5.1.	Recepción de secuencias	48
4.5.2.	Comprobación de la calidad	50
4.6.	Limpieza de las secuencias.....	51
4.7.	Curvas de rarefacción	51
4.8.	Diversidad- α	52
4.9.	Diversidad- β	52
4.10.	Análisis estadístico.....	52
5.	Resultados:	53
1.	Selección de pacientes:	53
2.	Análisis de la calidad del DNA:.....	55
2.1.	Cuantificación y pureza del DNA:	55
2.2.	Integridad del DNA extraído:	56
3.	Análisis de la secuenciación.....	57
3.1.	Comprobación de la calidad de las secuencias	57
4.	Limpieza de las secuencias:.....	61
5.	Curvas de rarefacción:	63
6.	Diversidad- α :	64
7.	Diversidad- β :.....	65
8.	Perfiles taxonómicos:	66
9.	Significancia a nivel de phyla y género:	74

10. LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size)	77
6. Discusión	78
7. Conclusiones:.....	85
8. Perspectivas	85
9. Bibliografía:	87

Listado de figuras:

Figura 1. Anatomía del tracto gastrointestinal y capas que conforman al intestino grueso. *pág. 16*

Figura 2. Contribución de la microbiota intestinal a la disminución de la presión arterial cuando la ingesta de la fibra dietética es alta. *pág. 22*

Figura 3. Proceso de secuenciación llevado a cabo en los equipos Illumina. *pág. 37*

Figura 4. Ribosoma bacteriano y gen 16S rRNA. *pág. 38*

Figura 5. Diagrama de flujo de la extracción de DNA a partir de muestras de heces colectadas por los pacientes. *pág. 47*

Figura 6. Diagrama descriptor de la información contenida por lectura en los archivos fastq. *pág. 49*

Figura 7. Análisis de integridad del DNA: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Tinción con Bromuro de etidio. *pág. 56*

Figura 8. Calidad promedio por base de las secuencias del paciente H001. *pág. 59*

Figura 9. Calidad promedio por lectura de secuencias del paciente H001. *pág. 60*

Figura 10. Curvas de rarefacción por paciente. *pág. 63*

Figura 11. Diagramas de cajas y bigotes de los diferentes índices utilizados para el análisis de diversidad- α . *pág. 64*

Figura 12. Gráfica de coordenadas principales de la métrica de Bray Curtis para el análisis diversidad- β . *pág. 65*

Figura 13. Perfil taxonómico a nivel de *phyla* por paciente incluido en el estudio (*phyla* con una frecuencia relativa > 1%). *pág. 68*

Figura 14. Perfil taxonómico a nivel de *phyla* por grupo de estudio clasificado de acuerdo con el estado de salud. *pág. 69*

Figura 15. Perfil taxonómico a nivel de género por paciente del protocolo de estudio. (Géneros con una frecuencia relativa >1%). *pág. 72*

Figura 16. Perfil taxonómico a nivel de género por grupo de estudio clasificado de acuerdo con el estado de salud (Géneros con una frecuencia relativa > 1%). *pág. 73*

Figura 17. Significancia a nivel de *phyla* entre grupos de estudio. *pág. 75*

Figura 18. Significancia a nivel de género entre grupos de estudio. *pág.76*

Figura 19. Análisis LEfSe a nivel de todos los géneros presentes en los diferentes grupos de estudio. *pág.77*

Figura 20. Modelo de la posible contribución de la disminución y aumento de ciertos géneros bacterianos al desarrollo de hipertensión arterial, en el grupo obeso-hipertenso, por las concentraciones bajas de SCFA *pág. 84*

Listado de tablas:

Tabla 1. Resumen de los estudios realizados para analizar la composición de la microbiota intestinal y su relación con la obesidad en pacientes infantiles mexicanos. *pp. 29-30.*

Tabla 2. Criterios clínicos y demográficos de selección de los pacientes en estudio. *pp. 43-44*

Tabla 3. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación de las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA. *pág. 48*

Tabla 4. Datos clínicos generales de los pacientes incluidos en el protocolo. *pág. 54*

Tabla 5. Datos de cuantificación y pureza del DNA extraído de heces de 4los pacientes en estudio. *pág. 57*

Tabla 6. Calidad promedio por base de las secuencias de los pacientes en estudio. *pág. 58*

Tabla 7. Calidad promedio de las secuencias por lectura de los pacientes incluidos en el estudio. *pág.61*

Tabla 8. Secuencias iniciales contenidas por archivo y reporte de secuencias aprobadas una vez realizada la limpieza final. *pág. 62*

Tabla 9. Comparación entre los resultados obtenidos y las diferencias entre los perfiles bacterianos reportados en diferentes poblaciones. *pág. 82*

Listado de abreviaturas:

- **cdNA**- DNA complementario
- **CDC**- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (*Center for Disease Control and Prevention*, por sus siglas en inglés)
- **DM II**- Diabetes mellitus tipo II
- **HAS**- Hipertensión Arterial Sistémica
- **IBS**- Síndrome del colon irritable, (*Irritable bowel syndrome*, por sus siglas en inglés)
- **IMC**- Índice de masa corporal
- **LDA**- Análisis linear discriminante (*Linear discriminant analysis*, por sus siglas en inglés)
- **LfSe**- Análisis linear discriminante sobre el efecto de tamaño (*Linear discriminant analysis Effect Size*, por sus siglas en inglés).
- **LPS**- Lipopolisacárido
- **NGS**- Secuenciación de Nueva Generación, (*Next-generation sequencing*, por sus siglas en inglés)
- **NO**- Óxido nítrico
- **OMS**- Organización Mundial de la Salud
- **PA**- Presión arterial
- **PCR**- Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*, por sus siglas en inglés)
- **rRNA**- RNA ribosómico (*Ribosomal RNA*, por sus siglas en inglés)
- **SCFA**- Ácidos grasos de cadena corta (*Short-chain fatty acids*, por sus siglas en inglés)
- **SHR**- Ratas hipertensas espontáneas, (*Spontaneous Hypertensive Rats*, por sus siglas en inglés)
- **SIDA**- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido
- **TMA**- Trimetilamina
- **TMAO-N**-óxido de trimetilamina

- **TRL-** Receptores tipo Toll, (*Toll like receptors*, por sus siglas en inglés)

Resumen:

Se le conoce como microbiota al conjunto de células bacterianas que habitan en el organismo de una persona, las cuales, en general, establecen una relación mutualista con el hospedero. La microbiota intestinal cumple con funciones muy particulares que en un estado óptimo de salud generan en el hospedero un balance adecuado de nutrientes y un estado de homeostasis. Sin embargo, esta es considerada como un órgano sumamente lábil y puede cambiar su composición y funcionalidad cuando existen cambios del estilo de vida de las personas. Debido a esto y al periodo corto de desarrollo de sus generaciones en comparación con las células eucariontes se ha determinado que la microbiota tiene un papel fundamental en el desarrollo de diferentes enfermedades de carácter multifactorial, siendo la hipertensión y la obesidad unas de estas.

En México la caracterización de la microbiota intestinal en pacientes con hipertensión arterial sistémica no ha sido reportada, al igual que la composición de esta en pacientes obesos en edad adulta. A su vez, poco se sabe acerca de las diferencias que existen en los perfiles taxonómicos cuando se tienen 1 o más comorbilidades asociadas a la obesidad.

En el presente proyecto se realizó un estudio piloto en el cual se caracterizó la microbiota intestinal en pacientes con obesidad e hipertensión arterial sistémica a través de extracción de DNA de muestras de heces y posterior envío a secuenciación de estas. Los resultados de los análisis de secuencias obtenidos se compararon con individuos que solo presentaban obesidad, con el propósito de obtener información relevante acerca de los *phyla* y géneros predominantes en la microbiota de ambos grupos.

En este estudio, no se observaron resultados con significancia estadística en cuanto a las diferencias de abundancia y riqueza entre los dos grupos de estudio. Sin embargo, si fue posible determinar que existe una tendencia a una mayor riqueza (de acuerdo con el índice Chao1) en el grupo hipertenso-obeso.

De igual manera, no fueron apreciadas diferencias significativas entre los diversos géneros presentes en los grupos de estudio. Sin embargo, algunos géneros que contribuyen a la disminución de la presión arterial por la producción de ácidos grasos de cadena corta tuvieron una menor frecuencia relativa en el grupo hipertenso-obeso en comparación con el grupo obeso; tal fue el caso de *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

1. Antecedentes:

1.1. Anatomía y fisiología del intestino grueso:

El intestino grueso forma parte del tubo digestivo o tracto gastrointestinal. Este, al igual que los demás órganos del tracto, está compuesto por cuatro capas: la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa. Cada una de estas capas contiene un tipo de tejido predominante y en estas se llevan a cabo funciones específicas. De adentro hacia afuera, la mucosa es la primera capa y es considerada como la capa de absorción y secreción principal (*Figura 1*). Células especializadas en forma de copa (caliciformes) de la mucosa secretan moco a lo largo de la mayor parte del tubo digestivo. La segunda capa es la submucosa. Esta es una capa muy vascularizada que contiene, además de vasos sanguíneos, glándulas y plexos nerviosos (*Figura 1*). Las moléculas absorbidas que pasan a través de las células epiteliales de la mucosa (colonocitos), entran a los vasos sanguíneos y linfáticos de la submucosa¹.

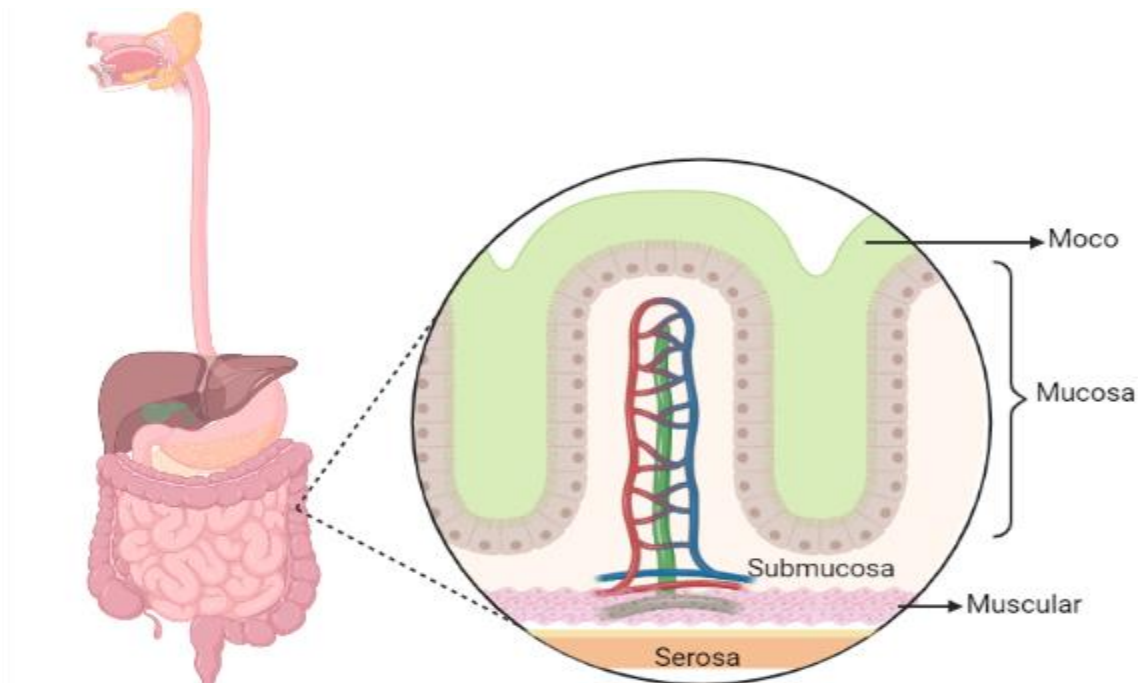


Figura 1. Anatomía del tracto gastrointestinal y capas que conforman al intestino grueso. Modificado de Ira Fox, 2014

La capa muscular, produce las contracciones segmentarias y el movimiento peristáltico que recorre todo el tubo digestivo (*Figura 1*). Finalmente, la serosa es la capa de unión y protección del colon y de la mayor parte del tracto gastrointestinal y está formada por tejido conjuntivo (*Figura 1*)^{1,2}.

Al comparar con el intestino delgado es posible decir que en el intestino grueso se llevan a cabo pocas o nulas funciones digestivas, ya que solo se absorben electrolitos, agua y algunas vitaminas. Sin embargo, este presenta un área superficial privilegiada para albergar a las bacterias comensales y patógenas potenciales¹.

1.2. Microbiota

En el organismo de una persona sana habitan cerca de 3.8×10^{13} células bacterianas, de las cuales, la mayor parte de ellas residen en el colon y por lo general establecen una relación mutualista con su hospedero³. A este conjunto de células bacterianas que residen en nuestro organismo se le conoce como microbiota o microbioma¹.

La composición de la microbiota que acompaña al individuo en su vida adulta es moldeada desde la infancia, cuando es colonizado por los microorganismos que habitan en el ambiente y por aquellos que residen en las personas que se encargan de él en las etapas tempranas de vida⁴. Estos primeros colonizadores son los que delimitarán en gran medida a las bacterias que se encontrarán en el individuo en la vida adulta.

Se han realizado diversos estudios de caracterización de la microbiota en un estado de salud aparente y gran parte de ellos se han enfocado en sitios anatómicos como el tracto gastrointestinal, tracto urogenital (principalmente la vagina), pulmones, boca y piel. En todos estos, se ha

revelado una gran variabilidad, en términos de diversidad, riqueza y composición, entre los sitios de estudio, así como entre las personas seleccionadas⁵.

1.3. Microbiota Intestinal

1.3.1. Factores geográficos, alimenticios y genéticos que la modifican:

En el intestino grueso, residen el mayor número bacterias y es uno de los nichos más caracterizados y estudiados. A pesar del gran número de bacterias presentes en este nicho son cuatro los *phyla* más abundantes que lo habitan: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*⁶.

El colon, es uno de los primeros sitios en ser colonizado. Las primeras especies que lo habitan son determinadas por el método del parto; es decir, parto vaginal o cesárea⁷. Sin embargo, la microbiota intestinal de los recién nacidos cambia rápidamente ya que su alimentación sufre modificaciones en periodos muy reducidos. Una vez que el ser humano llega a la adultez la microbiota se mantiene, relativamente estable, siempre y cuando no se presenten cambios importantes en el estilo de vida del hospedero⁸.

Por otro lado, las comunidades bacterianas que residen en el colon pueden ser delimitadas por factores genéticos. Por ejemplo, en un estudio realizado en gemelos se reportó una mayor tasa de concordancia en la presencia de *Methanobrevibacter smithii* en los gemelos monocigotos en comparación con el grupo de gemelos dicigotos⁹.

En la adultez, diversos factores contribuyen al moldeo de la microbiota siendo uno de los principales la alimentación que se lleva en el espacio

geográfico; por lo tanto, la composición de esta varía de acuerdo con la región que se habite y con la disponibilidad de alimentos⁸.

En personas aparentemente sanas originarias de las regiones urbanas de los Estados Unidos de América la composición de la microbiota intestinal, sin reporte de uso previo de antibióticos de por lo menos un mes antes a la toma de muestra, se encuentra principalmente, conformada por los géneros *Ruminococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Faecalibacterium spp.* y *Dorea spp.*¹⁰. Mientras que, en personas, aparentemente, sanas de China la composición de la microbiota es principalmente por los géneros *Faecalibacterium spp.*, *Oscillibacterium spp.*, *Roseburia spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Coprococcus spp.* y *Butyrivibrio spp.*¹¹.

1.3.2. Microbiota intestinal en la generación de metabolitos:

1.3.2.1. *N*-óxido de trimetilamina

El *N*-óxido de trimetilamina (TMAO) es una molécula pequeña generada por el metabolismo de la colina y de la fosfatidilcolina realizado por la microbiota intestinal, además del catabolismo de la L-carnitina. Alimentos como la carne roja, los huevos, y los lácteos son ricos en colina, fosfatidilcolina y carnitina. Por lo cual, estos son considerados como fuentes principales para la síntesis de TMAO¹².

Estos precursores de TMAO, incluidos en la dieta, son procesados por las bacterias comensales del intestino a trimetilamina (TMA). La cual, se absorbe en el intestino y es transportada al hígado por medio de la circulación portal. Es ahí donde, por acción de monooxigenasas de flavina o por monooxigenasas hepáticas, la TMA es transformada a TMAO¹². Se ha reportado que las bacterias pertenecientes a los *phyla Firmicutes* y

Proteobacteria pueden utilizar la carnitina o colina como fuentes de energía y por tanto producir el TMAO¹³.

El TMAO ha sido asociado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares tales como: isquemia, aterosclerosis, arritmias y falla cardíaca. Los mecanismos por los cuales participa en el desarrollo de estas enfermedades aún permanecen desconocidos. Sin embargo, diversos estudios han reportado que concentraciones altas de TMAO inducen la activación de genes que codifican para las citocinas pro-inflamatorias, además de moléculas de adhesión y quimiocinas^{12,13}.

Actualmente, el TMAO es considerado como un biomarcador para enfermedades cardiovasculares. Además de encontrarse relacionado con el desarrollo de los eventos cardiovasculares severos¹⁴.

1.3.2.2. Ácidos Grasos de Cadena Corta

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA- *short-chain fatty acids*, por sus siglas en inglés) son moléculas que pueden ser producidas por las bacterias que residen en el colon o que son incluidos directamente en la dieta de las personas. Estos cumplen un gran número de funciones que promueven el estado homeostático de los individuos. De manera general, los SCFA actúan como mensajeros para ejercer su función en aquellos tejidos o células que expresan los receptores propios para ellos, además de actuar como la fuente de energía principal para los colonocitos³.

En los últimos años se ha demostrado una correlación entre la concentración de los SCFA, principalmente el acetato, butirato y propionato, y las enfermedades cardiovasculares, además de los padecimientos metabólicos como la hipertensión y obesidad¹⁵.

La mayor parte de los SCFA producidos son utilizados para funciones metabólicas y solo 5-10% de estos son excretados en las heces. En una

dieta con un contenido normal de fibra, la microbiota se encarga de su metabolismo ya que los vertebrados no contamos con las enzimas necesarias para su procesamiento. Si el consumo de fibra es alto, se aumenta la abundancia de bacterias que generan SCFA y por tanto la concentración de estos aumenta³. Los SCFA son transportados hacia el hígado y liberados hacia el torrente sanguíneo por medio de la circulación portal (*Figura 2*). A partir de la cual pueden llegar a diferentes tejidos involucrados en la regulación de la presión arterial por medio de la unión a receptores acoplados a proteínas G presentes en los riñones^{3,16}. Estos receptores permiten la regulación del eje renina-angiotensina-aldosterona y contribuyen al control de la presión arterial¹⁶.

Los SCFA, principalmente el acetato, por su tamaño puede cruzar la barrera hematoencefálica y actuar disminuyendo el apetito por medio de la estimulación del sistema nervioso simpático¹⁷.

Por otra parte, el butirato promueve el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal. Se ha demostrado que cuando baja la concentración de este SCFA se permite la translocación de lipopolisacárido (LPS) a torrente sanguíneo, lo cual resulta en inflamación sistémica en el hospedero¹⁸.

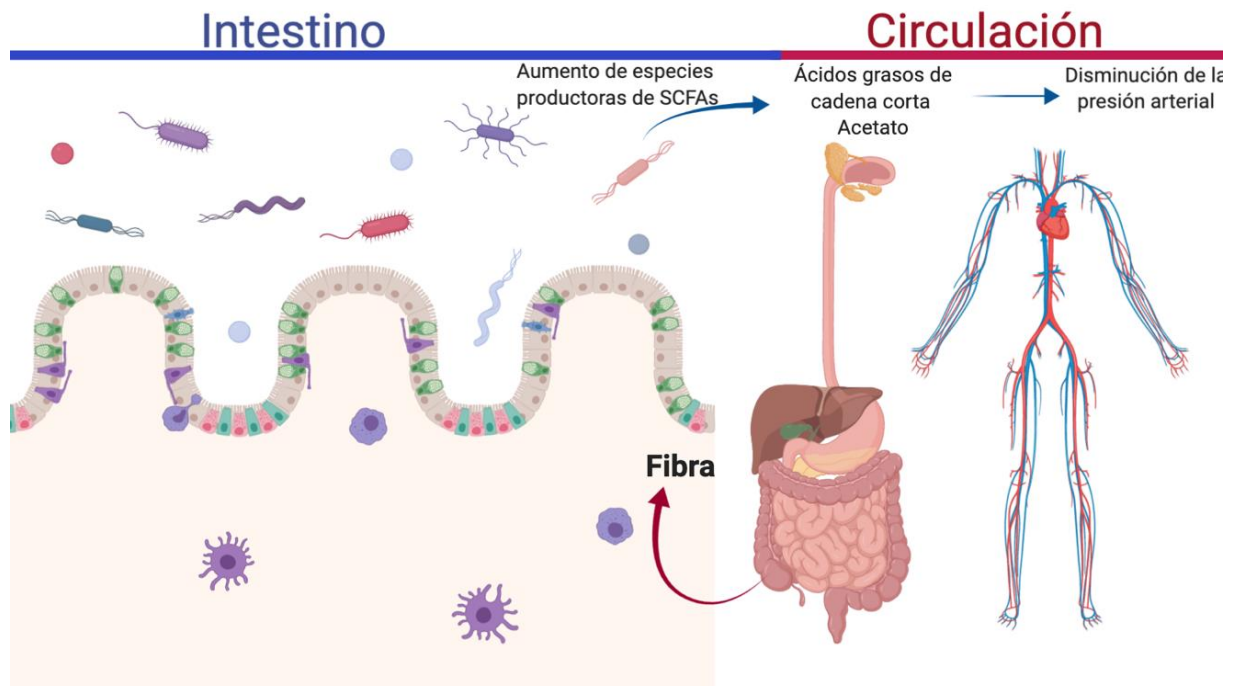


Figura 2. Contribución de la microbiota intestinal a la disminución de la presión arterial cuando la ingesta de la fibra dietética es alta. Modificado de: Marques et al., 2018.

1.4. Papel de la microbiota en el estado de salud y enfermedad

Las bacterias que residen en el colon ofrecen un gran número de ventajas al hospedero, como fortalecer la integridad y dar forma al epitelio intestinal. A su vez, protegen contra infecciones potenciales y regulan el sistema inmune del hospedero. Bajo ciertas condiciones que resultan de los cambios ambientales de los hospederos se presenta una disbiosis; es

decir, estas funciones se ven afectadas y no es posible revertirlas de manera natural¹⁹.

La microbiota ha coevolucionado con el hospedero, sin embargo, sus generaciones son considerablemente más cortas en relación con las células eucariotas. Por lo cual, la microbiota se adapta de manera más rápida a los diferentes cambios del ambiente. Algunas causas de la disbiosis han sido reportadas como factores contribuyentes al desarrollo de diferentes enfermedades multifactoriales, tales como: síndrome de colon irritable, depresión, obesidad e hipertensión; mismas en las que en los últimos años se ha visto un aumento en su incidencia. Por lo cual, la alteración de la microbiota intestinal ha sido considerada como el nexo entre estos factores y el desarrollo de estas patologías con etiología multifactorial. La disbiosis no contribuye únicamente al desarrollo de alguna enfermedad; sino que puede contribuir de manera funcional con su etiología, diagnóstico o tratamiento¹⁹

1.4.1. Tipos de disbiosis:

En la disbiosis, cada una de las siguientes características pueden ocurrir de manera individual o todas al mismo tiempo; de manera que no son excluyentes en cuanto a las restantes.

1.4.1.1. Aumento de bacterias consideradas patobiontes

La abundancia relativa de las bacterias patógenas potenciales es frecuentemente poca. Sin embargo, aumenta cuando en el hospedero ocurren alteraciones a nivel del ecosistema intestinal. Se ha reportado que en estados de inflamación en el intestino, el origen puede localizarse en posibles disbiosis, particularmente cuando se incrementan de manera considerable los integrantes de

la familia de las Enterobacterias, a las cuales se les considera como patobiontes²⁰.

1.4.1.2. Pérdida de comensales

En un estado de disbiosis, es común observar la disminución en la abundancia relativa o la completa desaparición de las bacterias que usualmente forman parte de la microbiota intestinal²¹.

Se sabe que al recuperar a las bacterias que se perdieron en la disbiosis, las condiciones previas se pueden restablecer o simplemente disminuir la severidad de los efectos causados^{19,21}.

1.4.1.3. Pérdida de la diversidad

Al perderse las bacterias comensales, también se reduce la *diversidad- α* (descripción de la riqueza de especies en un nicho determinado), como se ha reportado en condiciones como: diabetes mellitus tipo I y II y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido (SIDA), entre otras²².

1.4.2. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus tipo II (DM II) es un desorden de carácter metabólico complejo en el que factores genéticos, ambientales y del estilo de vida de las personas fungen como factores desencadenantes^{23,24}.

La DM II contribuye al desarrollo de otras enfermedades, principalmente a las cardiovasculares y renales, que deterioran la calidad de vida de las personas, imposibilitándolas para el desarrollo de sus actividades diarias. En México, la DM II se encuentra dentro de las diez principales causas de muerte en adultos entre los 25 y 64 años²³.

La microbiota intestinal se ha propuesto como uno de los principales factores ambientales que influyen en el metabolismo energético, e inclusive, se le ha asociado a la patogénesis de la DM II²⁵.

Algunos autores han reportado la caracterización de la microbiota en pacientes de diferentes poblaciones con DM II. En la población China se observó que ocurre un aumento de *Clostridium bolteae* y *C. hathewayi* en el grupo con DM II, en comparación con los controles sanos²¹. A su vez, en población mexicana se ha reportado la disminución de *Bacteroidetes* en el grupo con DM II sin tratamiento farmacológico, en comparación con el grupo control, además de una disminución en términos de riqueza y diversidad en los enfermos²⁵.

1.4.3. Síndrome de colon irritable

El síndrome de colon irritable (IBS, *Irritable Bowel Syndrome*, por sus siglas en inglés) es un desorden gastrointestinal común que afecta a cerca del 13% de la población a nivel global. La fisiopatología asociada al IBS aún se desconoce. Sin embargo, se ha propuesto que podría deberse al aumento en la expresión de receptores de la respuesta inmune, particularmente de los receptores tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors* por sus siglas en inglés) los cuales se encargan de mediar la respuesta inmune intestinal hacia la microbiota^{19,26}.

La mayoría de los estudios de caracterización de la microbiota intestinal en pacientes con IBS han revelado una disminución en la diversidad y riqueza microbianas, además de la reducción en la frecuencia relativa del género *Bifidobacterium*²⁶.

Por otro lado, se ha reportado, al compararse con controles sanos, un aumento en la frecuencia de la familia *Enterobacteriaceae* en aquellos

pacientes con IBS caracterizada por diarrea, así como la disminución en la frecuencia del género *Faecalibacterium*²⁶.

1.4.4. Obesidad

La obesidad es considerada como una enfermedad multifactorial en la cual influyen los patrones del estilo de vida. Se caracteriza por la acumulación anormal o excesiva de grasa en los tejidos, representando un riesgo importante para la salud de quienes la padecen^{27,28}. De acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un índice de masa corporal (IMC) en adultos de 25 o más se considera como sobrepeso, mientras que uno mayor o igual a 30 indica obesidad²⁹.

Según la OMS, cerca de 650 millones de personas en el mundo padecen de obesidad, siendo los países de ingresos medios y bajos los lugares de mayor concentración, especialmente en las zonas urbanas. La obesidad es el principal factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades crónicas como la hipertensión arterial sistémica (HAS) y la DM II, las cuales ocasionan a nivel mundial el 10% de las muertes anuales²⁹.

Diversos estudios han reportado diferencias en la frecuencia relativa de algunos géneros bacterianos de la microbiota entre las personas que padecen de obesidad con aquellas que tienen un peso adecuado. De igual manera, en los pacientes con obesidad se ha observado una pérdida de la diversidad microbiana; es decir, el número de especies presentes, pero una mayor riqueza o cantidad de microorganismos, en comparación con personas aparentemente sanas^{30,31}. Por otra parte, se ha propuesto que la microbiota de los pacientes con obesidad puede facilitar la extracción y/o almacenamiento de energía en forma de tejido adiposo. En estudios realizados en ratones libres de gérmenes y en ratones criados de manera tradicional se observó que los ratones libres de gérmenes tenían un peso

más bajo en comparación con los que eran criados de manera tradicional. A su vez, al momento de realizar un trasplante fecal al grupo libre de gérmenes con heces del grupo criado de manera tradicional se observó un aumento considerable de la grasa corporal en ese grupo³².

El perfil de la microbiota intestinal de las personas con obesidad tiene variaciones importantes ya sea por motivos interindividuales o por cuestiones de sexo. A pesar de esto, algunos géneros bacterianos han sido asociados a diversas características de la obesidad; por ejemplo, la disminución del género *Bifidobacterium* se relaciona con un aumento en la grasa corporal, además de encontrarse en una menor frecuencia relativa en personas con un índice de masa corporal alto³³.

Por otro lado, el consumo de antibióticos en las primeras etapas de la vida altera la colonización y desarrollo de la microbiota intestinal infantil. Esta posible disbiosis se ha correlacionado con el aumento de peso en la población infantil y el desarrollo de la obesidad. Un estudio realizado en población pediátrica reveló que la exposición a antibióticos disminuía casi por completo a ciertas especies del género *Eubacterium*. A su vez, se encontró que ciertas especies de este género se encuentran relacionadas de manera inversa con el IMC³⁴.

Se ha sugerido la posibilidad de que la obesidad presente en pacientes con hipertensión esté asociada a cambios en la composición de la microbiota intestinal. En población China, se encontró una disminución del género *Bacteroides* en aquellos pacientes con hipertensión y obesidad, en comparación con el grupo con un IMC normal, pero con diagnóstico de hipertensión. Por otro lado, en ambos grupos se reportó un aumento considerable del género *Clostridium*, en comparación con el grupo control, el cual mostraba un IMC normal y no presentaban diagnóstico de hipertensión³⁵.

Cabe resaltar, que cuando existe una susceptibilidad genética para el desarrollo de hipertensión y obesidad, los cambios en algunos factores ambientales y de estilo de vida han producido modificaciones a nivel de los géneros de la microbiota, lo que hace menos propensos a dichos sujetos al desarrollo de estas enfermedades³⁶.

En nuestro país, la mayoría de los estudios de caracterización de la microbiota intestinal y su relación con la obesidad y el sobrepeso han sido realizados en población pediátrica (Tabla 1). Su principal hallazgo suele incidir en la disminución de la frecuencia relativa del *phylum Bacteroidetes* en pacientes con obesidad, en comparación con los controles correspondientes³⁷⁻³⁹(Tabla1).

Por otro lado, en un reporte reciente sobre la composición de la microbiota intestinal en población Latina (mexicanos, mexicano-americanos, puertorriqueños y cubanos) se reportó que una diversidad- α menor (Shannon) se encuentra asociada a la obesidad. Además, se detectó aumento en el género *Prevotella* en población mexicana con obesidad en comparación con aquellas personas obesas nacidas en EUA o que llegaron a ese país con menos de 18 años⁴⁰.

Tabla 1. Resumen de estudios de análisis de la composición de la microbiota intestinal y su relación con la obesidad en pacientes infantiles mexicanos

Población	Hallazgos	Referencia
Pacientes pediátricos ¹ (6-12 años). Grupos de estudio: <ul style="list-style-type: none"> • Obesos • Peso normal 	↑ <i>Bacteroides eggerthi</i> en el grupo Obeso.	37
	↓ <i>Bacteroides plebeius</i> en el grupo Obeso	
Pacientes en edad ² escolar (8.4 ± 1.6 años) de comunidades rurales Grupos de estudio: <ul style="list-style-type: none"> • Peso normal • Sobrepeso • Obesidad 	Asociación de una ↓ en las familias <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Porphyromonadaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> con obesidad, inflamación y grasa corporal total.	38
	↑ <i>Lactobacillaceae spp.</i> en el grupo obeso en comparación con el grupo de peso normal.	

¹ Clasificación del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*, por sus siglas en inglés)

² Clasificación de la OMS

↑ Aumento

↓ Disminución

Tabla 1. Resumen de estudios de análisis de la composición de la microbiota intestinal y su relación con la obesidad en pacientes infantiles mexicanos (*Continuación*)

<p>Pacientes pediátricos² en edad escolar (9-11 años) de familias de bajos recursos.</p> <p>Grupos de estudio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bajo peso • Obesidad 	<p>↓ diversidad-α (Shannon) en el grupo obeso en comparación con el grupo de peso bajo.</p> <hr/> <p>↓ En del microbiota intestinal <i>phylum Bacteroidetes</i> en el grupo obeso en comparación con el grupo de peso bajo.</p>	<p>39</p>
<p>Pacientes infantiles (9-11 años)</p> <p>Grupos de estudio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peso normal • Obesidad 	<p>↑<i>Megamonas spp.</i> en el grupo obeso en comparación con el grupo de peso normal.</p>	<p>40</p>

↑ Aumento

↓ Disminución

1.4.5. Hipertensión Arterial Sistémica

La hipertensión arterial sistémica (HAS) cursa, generalmente, en forma asintomática y, de acuerdo con el PROY-NOM-030-SSA2-2017, consiste en una elevación crónica de la presión sistólica a valores mayores de 140 mmHg y/o a una elevación crónica de la presión diastólica a niveles mayores de 90 mmHg⁴¹.

Se estima que la HAS provoca cerca de 50 mil muertes al año en nuestro país. Asimismo, se cree que cada año son diagnosticados alrededor de 45,000 nuevos casos y que la cifra podría ser aún más alta si se considera que la mayoría de los pacientes con esta afección desconoce que la padece^{42,43}.

Si bien la etiología de la HAS aún permanece desconocida, su desarrollo puede atribuirse a factores genéticos y al estilo de vida de cada paciente. Factores tales como la inactividad física, obesidad, consumo alto de alcohol, tabaquismo, niveles altos de estrés y dietas inadecuadas, en las que el consumo de sal, grasa o azúcares es superior al recomendado, contribuyen al aumento de la presión arterial^{43,44}.

De manera natural, la presión arterial se ve regulada por un gran número de mecanismos, destacando los asociados al sistema autónomo, el eje renina-angiotensina-aldosterona, las concentraciones de sodio en el líquido extracelular o cualquier otro que altere el gasto cardíaco o la resistencia vascular periférica¹.

El aumento acelerado en la incidencia de esta enfermedad ha permitido identificar que los factores genéticos son insuficientes para explicar todos los casos de HAS³. Estudios recientes han demostrado diferencias en la composición de la microbiota intestinal en pacientes con HAS, en

comparación con las personas sanas. En estas últimas se reportó una menor frecuencia relativa del *phylum Bacteroidetes* y, en el grupo HAS, el aumento en el género *Prevotella*^{3,11,45}.

Por otro lado, productos del metabolismo de las bacterias del colon han mostrado tener acción directa sobre la presión arterial; tal es el caso del óxido nítrico (NO), además de los SCFA y TMAO, previamente mencionados^{1,15,46}. El NO difunde rápidamente, hacia el interior de las células epiteliales de los vasos sanguíneos, actuando como un potente vasodilatador y, por lo tanto, disminuyendo la presión arterial¹.

1.5. Microbiota intestinal e Hipertensión

Estudios realizados en ratas hipertensas espontáneas (SHR, *spontaneous hypertensive rats* por sus siglas en inglés), han demostrado un enriquecimiento del *phylum Actinobacteria* en comparación con lo observado en ratas sanas. La microbiota de ratas hipertensas también evidenció una disminución en especies productoras de acetato y butirato⁴⁷.

Por otra parte, las SHR mostraron deficiencias en la estructura de su barrera intestinal, con un aumento en la permeabilidad de esta y en los marcadores fibróticos e inflamatorios. Esta estructura intestinal deficiente se restauró cuando la presión arterial fue controlada⁴⁸.

En el caso contrario, al realizarse un trasplante fecal en las SHR con muestras provenientes de ratas con una presión arterial normal, se observó una disminución en la presión arterial. En el mismo sentido, al realizarse el trasplante fecal a una rata normotensa, a partir de una SHR, aumentó la presión arterial⁴⁹. La combinación de ambos estudios demuestra que un estado de disbiosis es determinante para el desarrollo de hipertensión en modelos animales³.

Por otra parte, en un gran número de reportes se ha confirmado que el uso de antibióticos genera una alteración considerable en la microbiota intestinal. Sin embargo, también resulta interesante que nuevos reportes señalen la probabilidad de que los propios antibióticos pudieran tener un efecto sobre la presión arterial. En un estudio realizado en ratas SHR y Dahl sensibles a la sal se encontró un aumento en la presión arterial de las ratas Dahl tras el consumo de neomicina, vancomicina y minociclina por 3 semanas. Es importante señalar que aun cuando estos hallazgos son considerados de alta relevancia, no todos los modelos responden de la misma manera (lo que también probablemente pueda ocurrir en los pacientes): en el mismo trabajo, el uso de vancomicina y minociclina favoreció la disminución de la presión arterial en las ratas SHR⁴⁵.

1.5.1. Estudios de la microbiota en sujetos con hipertensión realizados en diferentes poblaciones humanas

En población China se comprobó que en pacientes con hipertensión, la microbiota intestinal se encuentra enriquecida con los géneros *Klebsiella* y *Prevotella*; por otra parte, los géneros *Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus* y *Butyrivibrio* disminuyen, en comparación con lo observado en personas aparentemente sanas¹¹.

Por lo que se refiere a la población brasileña hipertensa, se ha observado una disminución en la abundancia relativa de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, además de la reducción de los géneros *Roseburia* y *Faecalibacterium*. Cabe agregar que la disminución de estas familias contribuye a la baja importante de la producción de SCFA, en especial a la de butirato⁵⁰.

En la población finlandesa se detectó una relación inversa entre la cantidad de las especies del género *Lactobacillus* y la presión arterial de los individuos. A su vez, se evidenció una afectación importante en el *phylum* de los *Firmicutes* entre los pacientes hipertensos, en comparación con su contraparte aparentemente sana⁵¹.

1.6. Métodos de estudio de la microbiota

1.6.1. Historia del estudio de la microbiota

La caracterización de la microbiota en la década de los años 60 era realizada por diversas técnicas de cultivo. Sin embargo, cerca de 70% de los microorganismos que la conforman son considerados como no-cultivables lo cual resultaba en la subestimación de la diversidad bacteriana presente⁵². Grandes avances fueron logrados en la década de los 70 cuando Frederick Sanger desarrolló el método que lleva su nombre, el cual permitió la secuenciación del genoma completo de un bacteriófago. Este método fue utilizado durante muchos años. A pesar de esto, no fue sino hasta finales de la década de los 90 cuando esta técnica, en conjunto con la generación de clones por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase chain reaction* por sus siglas en inglés) empezó a ser utilizada para el estudio de la microbiota⁵³. Sin embargo, las limitaciones propias del mismo hicieron notoria la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que permitieron la generación de un mayor número de lecturas a partir de fragmentos de DNA de menor tamaño⁵².

1.6.2. Secuenciación de Nueva Generación

A inicios del siglo XXI, la compañía Lynx Therapeutics lanzó al mercado la primera de las tecnologías considerada como secuenciación de nueva generación; en los años posteriores fueron introducidas nuevas tecnologías

al mercado, impulsando la disminución de los costos de secuenciación hasta seis veces⁵².

En el 2005, la introducción de la plataforma de secuenciación Roche por el método de pirosecuenciación y sus diferentes variantes de equipos condujo a la secuenciación de segmentos de DNA cada vez más grandes y a la mejora de los tiempos y rendimiento de los equipos⁵².

A inicios de la década pasada, Illumina revolucionó la secuenciación de nueva generación (NGS, *Next-generation sequencing*, por sus siglas en inglés) incluyendo nuevos equipos cuyo principio de funcionamiento está basado en la secuenciación por síntesis, utilizando terminados reversibles⁵².

Todos estos avances permitieron el desarrollo del Proyecto del Microbioma humano. Desarrollado en el 2007, diversos grupos de estudio caracterizaron la composición microbiana de nichos como la piel, la boca, intestino y vagina. El proyecto permitió demostrar las grandes variaciones que existen entre las comunidades bacterianas de los individuos de una misma comunidad y sugerir o comprobar el papel principal que ocupa la microbiota en el origen de diferentes enfermedades⁵⁴.

1.6.2.1. Secuenciación con Illumina

La secuenciación de nueva generación con la plataforma Illumina sigue cuatro pasos básicos: (*Figura 3*)

a) Preparación de bibliotecas

La preparación de bibliotecas es generada a través de la fragmentación aleatoria del DNA o del cDNA (*complementary DNA*, por sus siglas en inglés)

de prueba, seguido de la ligación de los cebadores de los extremos 5' y 3'. Los cebadores unidos al DNA son, posteriormente, amplificados por PCR⁵⁵.

b) Amplificación de agrupamientos (*clusters*)

Para la generación de agrupamientos, las bibliotecas generadas son cargadas en una celda de flujo donde los fragmentos son capturados por una base de oligonucleótidos fijados a la celda. Por complementariedad, los cebadores de las bibliotecas se unen a los oligonucleótidos fijados en la celda. Una vez alineadas, las cadenas se doblan y se alinean con otros oligonucleótidos formando un puente. Se genera la cadena complementaria y se repite el proceso generando la amplificación del agrupamiento⁵⁵.

c) Secuenciación

Los equipos Illumina utilizan el método de terminación reversible; el cual consiste en la detección de las bases, marcadas por fluorescencia, que son incorporadas a las cadenas base de DNA por el extremo 3'-OH. Al ser excitadas con un láser, el equipo es capaz de detectar el fluoróforo correspondiente al nucleótido. Una vez detectado el fluoróforo este es removido liberando el extremo 3'-OH para poder incorporar el siguiente nucleótido. Este ciclo es repetido hasta formar una secuencia correspondiente a la longitud del fragmento de 75-100 bp^{55,56}.

d) Alineamiento y análisis de datos

Las lecturas generadas son alineadas con una secuencia de referencia utilizando programas bioinformáticos. Después del alineamiento, la diferencia entre la secuencia de referencia y la secuencia generada puede ser identificada⁵⁵. En el caso de análisis de microbioma, estas son identificadas por medio de bases de datos⁵⁶.

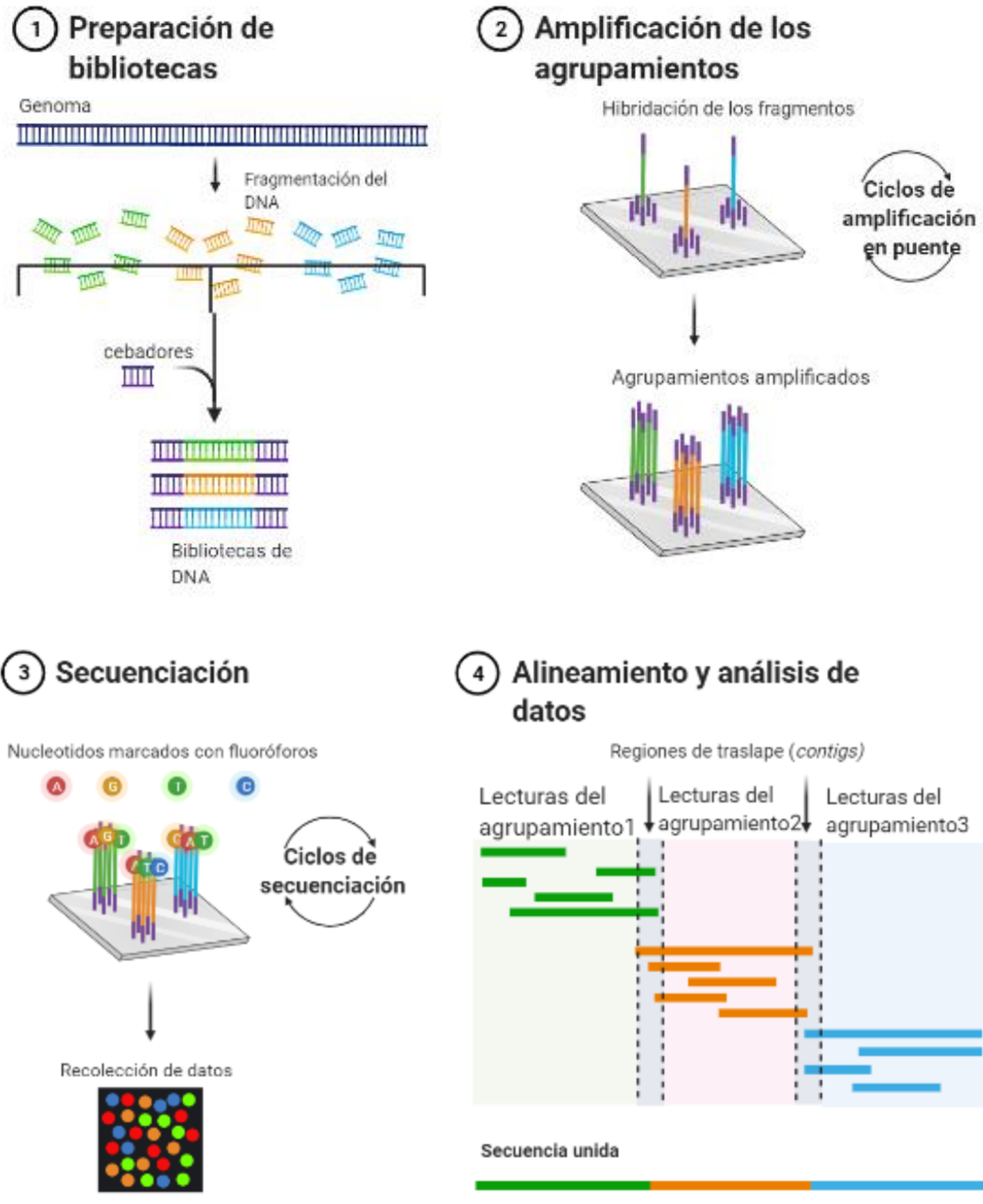


Figura 3. Proceso de secuenciación llevado a cabo en los equipos Illumina. **(1)** Proceso de preparación de bibliotecas. **(2)** Generación/amplificación de agrupamientos. **(3)** Secuenciación. **(4)** Análisis de datos/ Alineamiento de secuencias. Modificada de: (Illumina, 2015)

1.6.3. Técnicas bioinformáticas enfocadas en el uso de los genes para RNA ribosomal 16S (rRNA, ribosomal RNA, por sus siglas en inglés)

El ribosoma bacteriano está formado por dos subunidades; una pequeña de 30S y una grande de 50S, en su composición tiene aproximadamente 66% de rRNA. Las subunidades, a su vez, pueden trazarse en unidades discretas, siendo una de las más importantes la que corresponde al rRNA 16S presente en la subunidad pequeña del ribosoma ⁵⁷ (Figura 4 A).

El rRNA 16S es el componente estructural central de la subunidad 30S y este es requerido para iniciar la síntesis de proteínas y la estabilización de la unión codón-anticodón en el sitio A del ribosoma durante la traducción ⁵⁸.

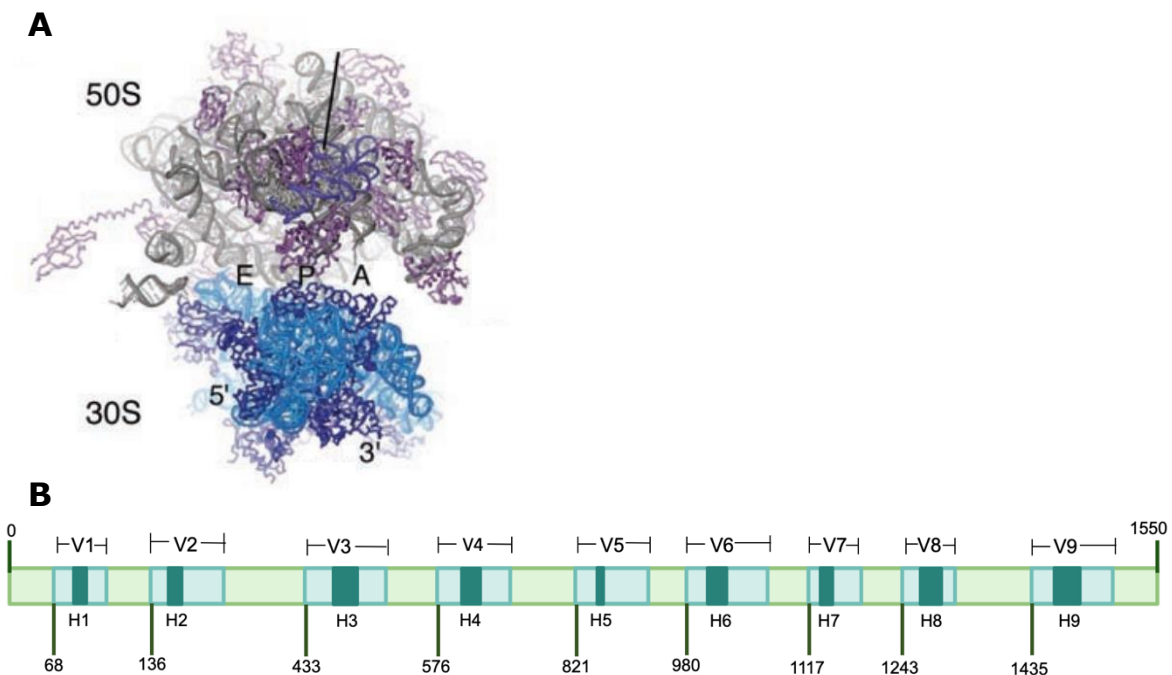


Figura 4. Ribosoma bacteriano y gen 16S rRNA. **(A)** Diagrama computarizado del ribosoma bacteriano con señalamientos en los sitios A, P y E. Modificado de: Center of Molecular Biology, UCSC. **(B)** Diagrama de la estructura general del gen 16S RNA. Se muestran las regiones variables con la etiqueta V y las hipervariables con la etiqueta H, además de los nucleótidos que abarca cada una de estas. Modificado de: Schuwirth et al., 2005

En la década de los 60 se notó una conservación en la secuencia de los genes 16S rRNA en el género *Bacillus spp.* Estos hallazgos, entre muchos otros, permitieron dar forma al trabajo de Carl Woese, el cual estableció que la relación filogenética de los organismos podía ser determinada al comparar las regiones estables de su genoma⁵⁹.

En microorganismos como las bacterias, pocos genes están tan conservados como el del rRNA 16S. Por lo cual, en conjunto con las técnicas de NGS han permitido la elaboración de estudios de caracterización y comparación de la diversidad de la microbiota⁵⁴.

El gen 16S rRNA tiene una longitud de aproximadamente 1550 pb y se encuentra formado por nueve regiones variables que contienen, a su vez, nueve regiones hipervariables y regiones conservadas⁶⁰ (*Figura 4, B*).

Las regiones hipervariables han demostrado una diversidad considerable, entre diferentes especies bacterianas, lo cual permite su uso para su identificación. Mientras que las regiones altamente conservadas permiten el diseño de cebadores que puedan usarse en diversas técnicas como la secuenciación⁶¹.

Sin embargo, una sola región no permite distinguir entre todos los tipos de bacterias, ya que algunas no cuentan con la longitud suficiente o no muestran el grado de diversidad en las secuencias que se requiere. De igual manera, algunas regiones hipervariables son relativamente más conservadas entre especies, por lo cual su uso para fines de identificación no es tan conveniente. Cabe mencionar que cualquier análisis metagenómico por secuenciación de alguna de las regiones hipervariables del gen 16S rRNA carece de una confiabilidad aceptable al generarse los resultados a nivel de especie. Es decir, para obtener resultados confiables de las especies presentes en cierto ecosistema, debe realizarse un análisis

*shotgun*⁶⁰. Este análisis consiste en la fragmentación de un genoma para después ordenarlo transitoriamente de forma individual y proceder a buscar coincidencias para ordenarlo en forma correcta. Sin embargo, el costo de este es considerablemente más alto que la secuenciación del gen 16S rRNA. Por tal razón, para fines de caracterización, la secuenciación por amplificación de regiones del gen 16S rRNA sigue siendo una de las técnicas más utilizadas⁶².

Cabe mencionar que algunos estudios, han demostrado que al combinarse la información de diversas regiones hipervariables es posible identificar, a nivel de género, a un mayor número de bacterias presentes en una muestra⁶¹.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo general:

Caracterizar la microbiota intestinal de pacientes con hipertensión arterial sistémica y obesidad.

2.2. Objetivos específicos:

1. Purificar DNA a partir de muestras de heces provenientes de pacientes obesos con y sin hipertensión.
2. Comprobar que las muestras de DNA cumplan con los estándares de calidad para la secuenciación genómica.
3. Analizar las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas de las muestras de los pacientes.
4. Correlacionar la composición de la microbiota intestinal con la condición clínica de los dos grupos de pacientes.
5. Comparar los datos obtenidos con los reportados en la literatura.

3. Hipótesis:

La diversidad de la microbiota intestinal en pacientes obesos con hipertensión arterial sistémica será diferente en comparación con la de los pacientes con solo obesidad.

4. Métodos:

4.1. Selección de pacientes:

Los pacientes fueron seleccionados a partir de una base de datos de pacientes que ingresaron al protocolo **FM/DI/030/SR/2019 “Impacto de las dietas DASH y cetogénica en la microbiota oral e intestinal y su correlación con el control de la presión arterial sistémica en jóvenes obesos e hipertensos”** aceptado por el comité de ética de la Facultad de Medicina y del Instituto Nacional de Cardiología (Anexo 1). Los pacientes que ingresaron al estudio firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 2). Para la selección de los pacientes no se realizó ninguna distinción étnica ni análisis previos de ancestría y fueron utilizados los criterios clínicos y demográficos de la tabla 2.

Todos los pacientes seleccionados eran considerados como con sobrepeso u obesidad de acuerdo con los criterios de la OMS y para incluirse en el grupo obeso-hipertenso mostrar valores de PA superiores a lo establecido en PROY-NOM-030-SSA2-2017 “Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de Hipertensión arterial sistémica”.

Tabla 2. Criterios clínicos y demográficos de selección de los pacientes en estudio

Criterios de aceptación		Criterios de exclusión		Criterios de eliminación (para ambos grupos)
Obeso- Hipertenso	Obeso	Obeso-Hipertenso	Obeso	<ul style="list-style-type: none"> - Abandono del proyecto. - Diagnóstico repentino de cualquiera de las enfermedades señaladas en los criterios de exclusión.
<ul style="list-style-type: none"> - Ambos géneros. - Edad 18-49 años. - Diagnóstico de obesidad o sobrepeso -HAS primaria en estadios 1 y 2. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ambos géneros. - Edad 18-49 años. - Diagnóstico de obesidad o sobrepeso 	<ul style="list-style-type: none"> - HAS secundaria - Historial de cáncer o tratamiento oncológico - DM tipo I o II - VIH/SIDA - Ingesta de antibiótico 2 meses previos al estudio 	<ul style="list-style-type: none"> - HAS primaria o secundaria - Historial de cáncer o tratamiento oncológico - DM tipo I o II - VIH/SIDA - Ingesta de antibiótico 2 meses previos al estudio 	

Tabla 2. Criterios clínicos y demográficos de selección de los pacientes en estudio (*Continuación*)

		<ul style="list-style-type: none"> - Ingesta crónica de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos o cualquier otro medicamento diferente a los antihipertensivos - Creatinina sérica ≥ 1.3 mg/dL 	<ul style="list-style-type: none"> - Ingesta crónica de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos o cualquier otro medicamento diferente a los antihipertensivos - Creatinina sérica ≥ 1.3 mg/dL 	
--	--	---	---	--

4.2. Recolección y conservación de la muestra de heces del paciente

La muestra fue recolectada por los pacientes, siguiendo las siguientes instrucciones de recolección:

- En caso de ser mujer, no estar en su periodo menstrual.
- Defecar sobre una superficie limpia, tales como: papel de estraza, cartón o periódico.
- Recolectar una muestra del tamaño de una nuez (aproximadamente 5g) de una zona que no esté en contacto directo con el papel.
- Una vez colocada la muestra en el recipiente, mantener en refrigeración o en un lugar fresco. La muestra fue entregada por los pacientes al personal que se encuentra en el laboratorio, posteriormente, fue dividida en tres partes; dos de ellas fueron conservadas a -70°C y una de ellas a 4°C .

4.3. Extracción del DNA

Una de las muestras conservadas a -70°C fue sometida al proceso de extracción de DNA con el estuche QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Mainz) con modificación de las instrucciones del fabricante, que consistió en ampliar el período inicial de agitación con la solución amortiguadora de lisis de 1 min a 60h a 25°C (*Figura 5*).

4.3.1. Cuantificación de DNA y análisis de pureza

El DNA extraído fue cuantificado por medio del equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000c (Fisher Scientific, Wilmington) el cual, permitió la evaluación de pureza del material genético obtenido considerando como una pureza aceptable un valor $260/280 \geq 1.8$.

4.3.2. Análisis de integridad

La evaluación de integridad del DNA extraído y cuantificado fue realizada por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

4.4. Conservación del DNA

El material genético extraído fue conservado en tubos de microcentrífuga estériles a -20°C .

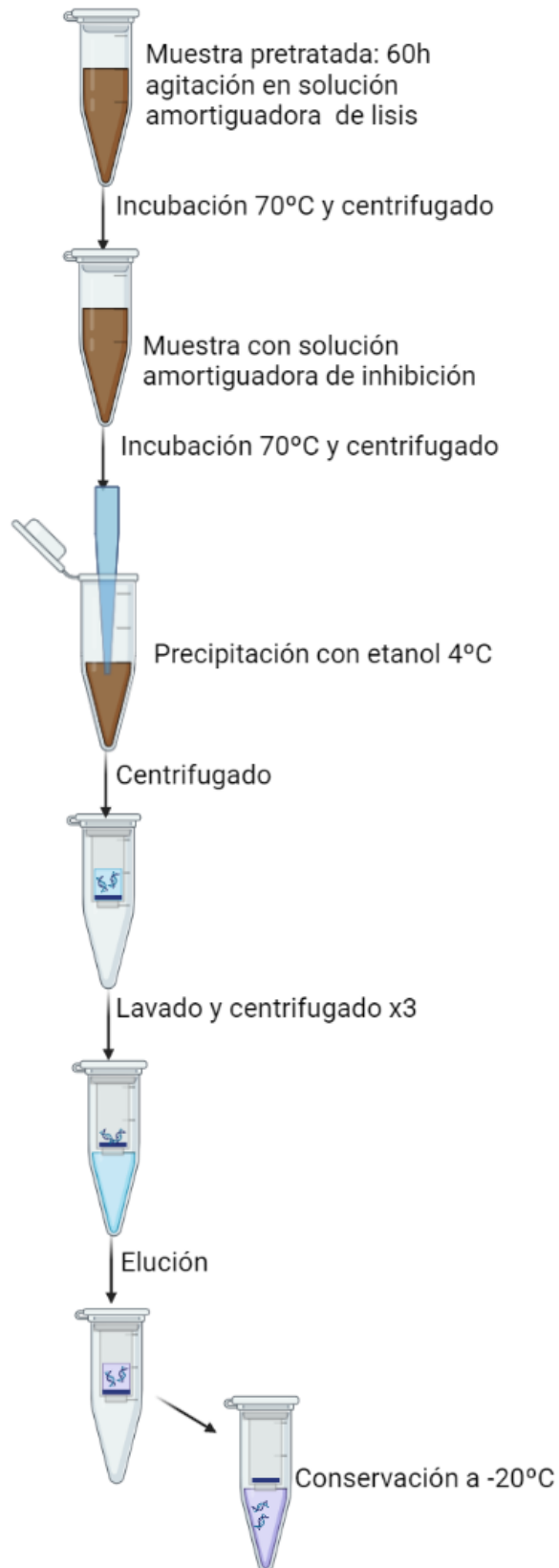


Figura 5. Diagrama general del proceso de extracción de DNA a partir de las muestras de heces.

4.5. Análisis de las secuencias

Las muestras que cumplieron con el parámetro de pureza e integridad fueron enviadas para ser secuenciadas por medio de la plataforma Illumina Novaseq 600 (Novogene, Beijing) utilizando los cebadores 341F y 806R (Tabla 3).

Tabla 3. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación de las regiones V3-V4

341F	CCTAYGGGRBGCASCAG
806R	GGACTACNNGGGTATCTAAT

4.5.1. Recepción de secuencias

La secuenciación de las muestras fue realizada de manera pareada. Por lo cual fueron recibidos dos archivos por muestra uno correspondiente a las lecturas en paralelo (*forward*) y otro en antiparelo (*reverse*), mismas que se encontraban en formato *fastq*. Este tipo de archivos contiene la información de todas las lecturas identificadas y de manera general cada lectura se compone de 3 partes. La primera contiene información general de la lectura; esta es interpretada por los *softwares* y no contiene información biológica relevante (*Figura6*). La segunda contiene la representación de los nucleótidos que conforman al fragmento amplificado. La secuenciación realizada para el presente protocolo fue de un fragmento de longitud de 250 bp, el cual corresponde a las regiones hipervariables V3 y V4 (*Figura6*).

La representación con nucleótidos utiliza presenta la siguiente simbología:

- A- Adenina
- T- Timina

- G- Guanina
- C- Citosina
- R- Cualquier base púrica (Adenina, Guanina)
- Y- Cualquier base pirimídica (Citosina, Timina)
- N- Cualquier nucleótido
- B- Citosina, Guanina o Timina
- S- Guanina o Citosina

Finalmente, la última parte corresponde al carácter ASCII que posteriormente es traducido al *PhredScore*, Puntaje de Calidad o *QScore*, los cuales indican la probabilidad de error de que el nucleótido reportado no sea el correcto. Cabe resaltar que estos caracteres son asignados de manera individual a cada uno de los nucleótidos del fragmento. Por lo cual, en el caso particular de nuestras lecturas se cuenta con 250 caracteres ASCII por lectura (*Figura6*).

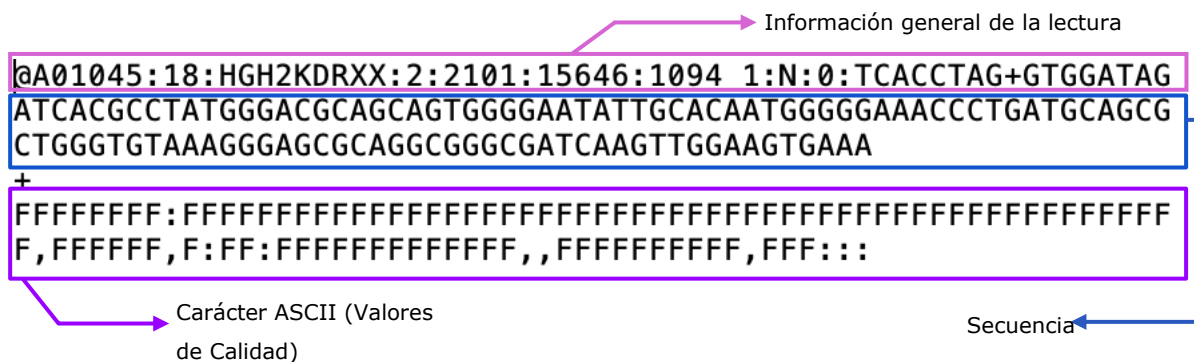


Figura 6. Diagrama descriptor de la información contenida por lectura en los archivos fastq. (El presente esquema fue obtenido por medio de un editor de texto y representa una lectura encontrada en el paciente H001)

La traducción de los caracteres ASCII al *PhredScore* permite a los *softwares* utilizados en el presente trabajo traducir la información y la visualización de esta en gráficas que permiten analizar de manera general: la calidad por base promedio en todas las lecturas, la calidad promedio por lectura,

además de la identificación de nucleótidos no identificados por parte de la plataforma.

4.5.2. Comprobación de la calidad

El análisis de calidad de las secuencias obtenidas fue realizado por medio del *software FastQC Versión 0.11.9*.

La verificación de la calidad de las secuencias fue realizada con el fin de identificar las zonas de corte, en caso de que existan, por decaimiento excesivo de la calidad.

La calidad promedio por base es generada a partir de la traducción del carácter ASCII a un *PhredScore* de cada una de las posiciones por lectura y permite la identificación de regiones de baja calidad en las lecturas. Esta representación es observada por medio de una gráfica de cajas y bigotes. En esta se observa una línea azul que describe la calidad promedio por base a lo largo de todas las lecturas.

Por otra parte, los valores de la mediana de la calidad promedio por base son representados por medio de una línea roja.

Como fue mencionado, la secuenciación de las muestras fue realizada de manera pareada. Por lo cual, dos archivos fueron recibidos por muestra enviada. De tal manera que fueron generados dos gráficos de calidad promedio por base los cuales presentan el mismo tipo de información, sin embargo; representan el sentido de lectura, *forward* y *reverse*.

A su vez, la traducción de los caracteres ASCII a *PhredScore* permite la generación de gráficas promedio de la calidad a lo largo de todas las lecturas del segmento amplificado. Estas permiten la identificación en conjunto de lecturas con valores de calidad bajos o muy bajos; es decir dos picos a lo

largo de estas gráficas y aun cuando estos pueden ser eliminados tras el proceso de limpieza, es necesario verificar su existencia.

4.6. Limpieza de las secuencias

Posterior a la comprobación de la calidad de las secuencias, las lecturas fueron sometidas a un proceso de limpieza extensivo; en el cual se realiza un proceso de filtrado mayor y corte por medio del *pipeline dada2* del *software QIIME 2 v.2019.10*, utilizando el método de consenso para la identificación y eliminación de quimeras.

A grandes rasgos, de manera inicial se realiza un filtrado en el que todas aquellas secuencias de muy baja calidad son eliminadas; ya que la probabilidad de error hace que esta sea en una mayor proporción errónea que verdadera. Posteriormente, las lecturas con la misma secuencia son agrupadas en una secuencia única y así se eliminan las réplicas; es decir se realiza una desreplicación. Previo a la remoción de quimeras, todas las secuencias que son consideradas como ruido son eliminadas, ya que estas pueden alterar el resultado de la asignación. Finalmente, las quimeras son eliminadas ya que estas son consideradas como artefactos y no como lecturas que aportan información al estudio.

4.7. Curvas de rarefacción

Ya que el número de lecturas aprobadas no fue el mismo en todos los pacientes del protocolo fue necesario realizar una rarefacción a una profundidad de 75000, es decir, un total de 75000 lecturas por muestra, fueron utilizadas para realizar los análisis de diversidad subsecuentes. Cabe señalar, que este proceso es realizado de manera automática y aleatoria por parte del *software* utilizado (*QIIME2 V.2019.10*)

La profundidad de la rarefacción realizada debe permitir la máxima identificación de especies posibles, lo cual es observable en las curvas de rarefacción. El resultado de la rarefacción utilizada para las muestras incluidas en el proyecto permitió la identificación del mayor número de especies posible.

4.8. Diversidad- α

Existen diferentes índices para realizar el análisis de diversidad- α (diversidad dentro de una muestra), algunos de los cuales miden la riqueza de especies; es decir el número de especies presentes dentro de una muestra. Otros que se basan en la abundancia de especies y otros que toman los dos parámetros previamente mencionados.

En el presente proyecto se tomaron en cuenta tres índices diferentes: Shannon, el cual considera la riqueza y abundancia dentro de la muestra, y Chao1 y OTUS Observados, los cuales toman como parámetro principal la riqueza en la muestra.

4.9. Diversidad- β

El análisis de diversidad- β fue realizado utilizando la métrica de Bray Curtis; la cual considera las diferencias microbianas entre los grupos de estudio. Finalmente, para determinar la significancia se realizó un análisis por PERMANOVA

4.10. Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas realizadas fueron ejecutadas en el *software RStudio v. 1.4* y bajo la prueba no- paramétrica de Mann-Whitney.

5. Resultados:

1. Selección de pacientes:

Un total de 7 pacientes fueron incluidos en el presente estudio. Cuatro de ellos corresponden al género masculino y tres al femenino; uno de cada género pertenecía al grupo "obeso" y todos los demás al grupo "obeso-hipertenso". Los pacientes en estudio se encontraban en el rango de edades de 24 a 48 ($\bar{x}_{Obeso-Hipertenso} \pm IQR = 43 \pm 6$) y ($\bar{x}_{Obeso} \pm IQR = 28 \pm 4$). La mayoría de los pacientes presentaron de un IMC ≥ 30 y en aquellos que pertenecían al grupo obeso-hipertenso reportaron valores de presión arterial (PA) $\geq 140/90$ mmHg, mientras que en el grupo obeso esta se encontraba por debajo de 120/90 mmHg (*Tabla 4*).

Tabla 4. Datos clínicos generales de los pacientes incluidos en el protocolo

Paciente	Sexo	Estado de Salud	Edad (años)	IMC	PA (mmHg)
H001	Mujer	Obeso- Hipertenso	47	30.0	170/110
H002	Mujer	Obeso- Hipertenso	41	54.0	175/105
H003	Hombre	Obeso- Hipertenso	48	34.0	155/103
H004	Hombre	Obeso- Hipertenso	36	34.0	145/88
H005	Hombre	Obeso- Hipertenso	42	39.0	150/92
$\bar{x} \pm IQR$			43±6	38±5	159/84±20/13
H006	Mujer	Obeso	24	29.0	108/81
H007	Hombre	Obeso	31	27.0	124/94
$\bar{x} \pm IQR$			28±4	28±1	116/88±8/7

2. Análisis de la calidad del DNA:

2.1. Cuantificación y pureza del DNA:

Los valores de concentración y pureza fueron determinados para todas las muestras de DNA extraído. La concentración del DNA osciló entre los valores de 153.47 y 15.63 [ng/μL], mientras que en el radio de pureza 260/280 en todas las muestras se reportó un valor superior a 1.80 ($\bar{x} \pm IQR = 2.03 \pm 0.15$) (Tabla 5).

Tabla 5. Datos de cuantificación y pureza del DNA extraído de heces

Paciente	Estado de Salud	Concentración (ng/μL)	260/280
H001	Obeso-Hipertenso	153.47	1.98
H002	Obeso-Hipertenso	80.87	1.94
H003	Obeso- Hipertenso	27.77	2.12
H004	Obeso- Hipertenso	15.63	2.17
H005	Obeso- Hipertenso	20.57	2.02
H006	Obeso	46.93	2.09
H007	Obeso	28.33	1.92
$\bar{x} \pm IQR$			2.03±0.15

2.2. Integridad del DNA extraído:

Posterior a la cuantificación del DNA, se realizó el análisis de integridad. En dicho análisis, ninguna de las muestras presentó barridos o líneas dobles que mostraran degradación del DNA (*Figura 7*). Las muestras de DNA de este estudio fueron enviadas a la empresa Novogene (Beijing, China) para la secuenciación del DNA, se confirmó la calidad de las muestras obtenidas en el laboratorio y todas fueron aceptadas para realizar el proceso de secuenciación.

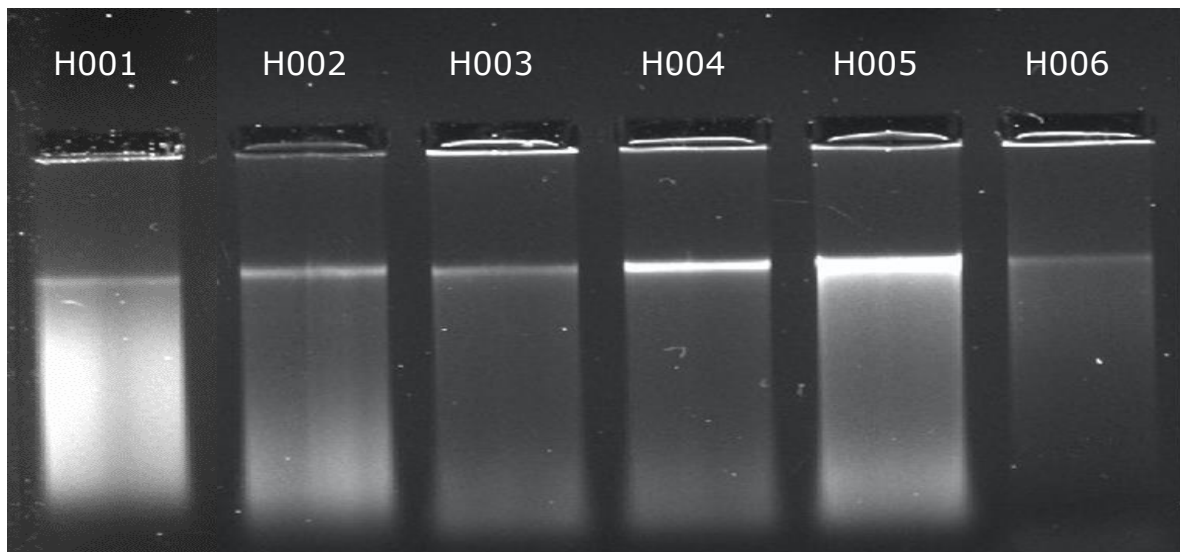


Figura 7. Análisis de integridad del DNA: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Tinción con Bromuro de etidio, cantidad de DNA ajustada a 50ng (calculada por medio de valores de concentración promedio).

3. Análisis de la secuenciación

3.1. Comprobación de la calidad de las secuencias

La calidad promedio por base de las secuencias de los pacientes incluidos en el protocolo se mostró siempre dentro de un *score* de calidad superior a 30 (*Tabla 6*). En la figura 8 A y B se puede observar que la calidad promedio por base en las lecturas del paciente H001, se mantiene por arriba de un *QScore* de 32 a lo largo de los 250 pb que forman al segmento amplificado tanto en el sentido de lectura *forward* como en el *reverse*. Por otro lado, en todas las posiciones del segmento amplificado el valor de la mediana se encuentra por arriba de un *score* de calidad de 36, además de no observarse decaimientos en la calidad al principio o al final, en ninguno de los sentidos de lectura.

En la calidad promedio por lectura del paciente H001 se reportó un valor promedio de 36 en ambos sentidos de lectura; es decir, una probabilidad de error menor a 1 en 1000 (*Figura 9 A y B*). A su vez, no se reportan picos intermedios que revelen conjuntos de lecturas con baja calidad.

De manera general, todas las secuencias mostraron comportamientos de calidad similares (*Tabla 7*). En el caso de la calidad promedio por lectura se reportó como valor mínimo un *PhredScore* de 33 pero en todas las lecturas de los pacientes de estudio la probabilidad de error fue menor a 1 en 1000.

Tabla 6. Calidad promedio por base de las secuencias de los pacientes del estudio

Paciente	<i>QScore</i> por base <i>forward</i> ≥ 30	<i>QScore</i> por base <i>reverse</i> ≥ 30
H002	✓	✓
H003	✓	✓
H004	✓	✓
H005	✓	✓
H006	✓	✓
H007	✓	✓

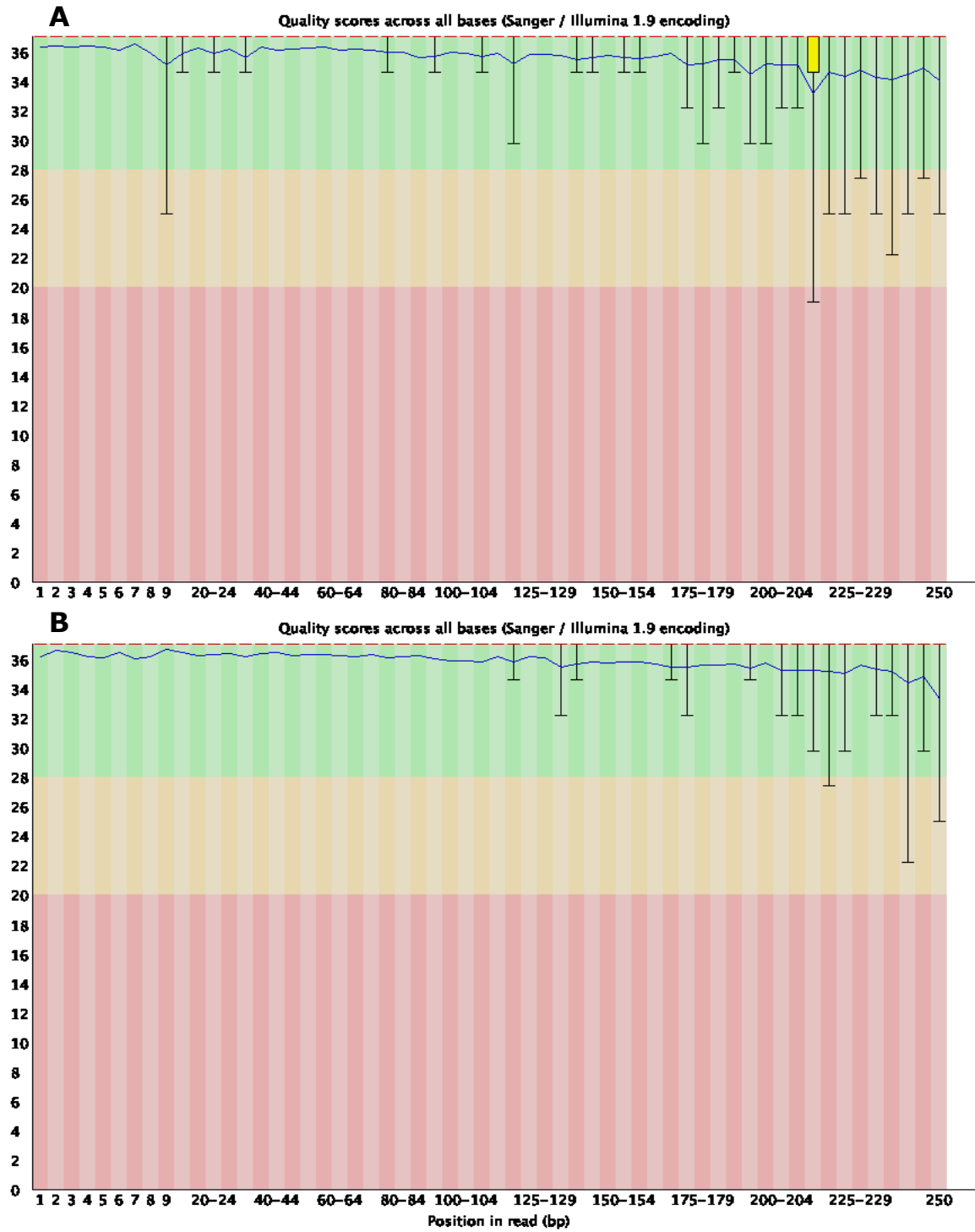


Figura 8. Calidad promedio por base de las secuencias del paciente H001. **A.** Calidad promedio por base de la lectura *forward*. **B.** Calidad promedio por base de la lectura *reverse*.

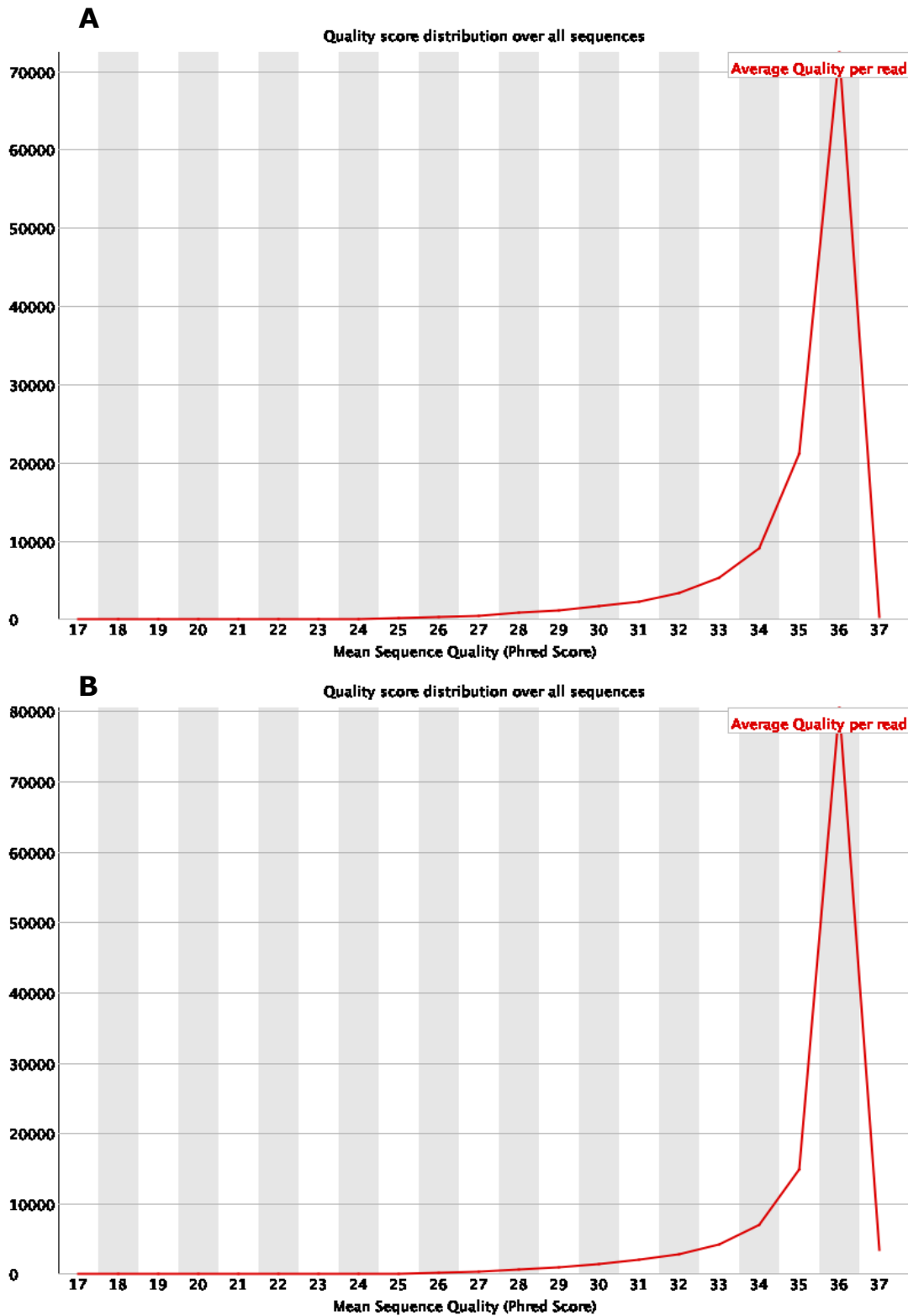


Figura 9. Calidad promedio por lectura de secuencias del paciente H001. **A.** Calidad promedio por lectura de secuencias *forward*. **B.** Calidad promedio por lectura de secuencias *reverse*.

Tabla 7. Calidad promedio por lectura de los pacientes del estudio

Paciente	QScore por base <i>forward</i> ≥ 30	QScore por base <i>reverse</i> ≥ 30
H002	✓	✓
H003	✓	✓
H004	✓	✓
H005	✓	✓
H006	✓	✓
H007	✓	✓

4. Limpieza de las secuencias:

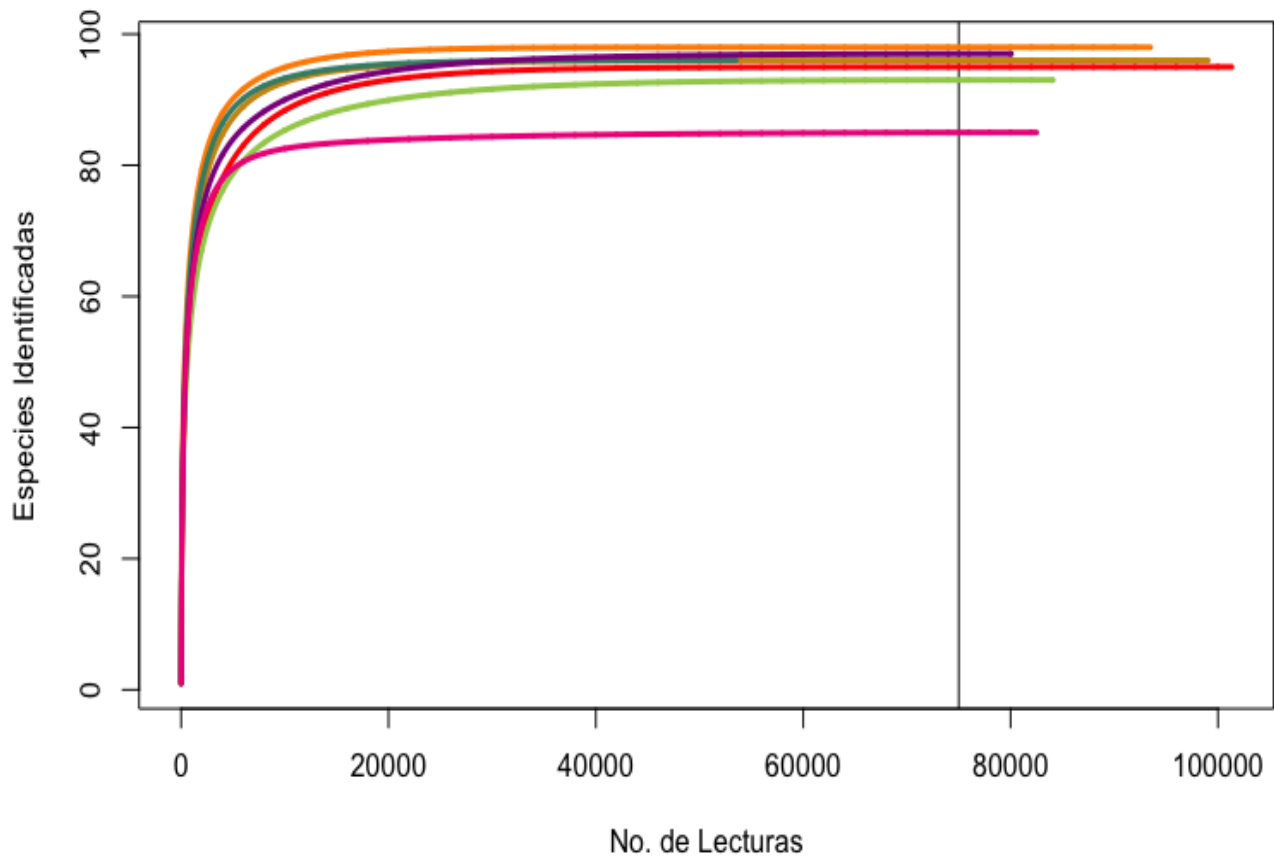
El número de lecturas iniciales, es decir el número contenido en los archivos *fastq* antes de realizar el proceso de limpieza intensiva tuvo un valor promedio de 173313 lecturas (*Tabla 8*). Posterior a la eliminación de artefactos, eliminación de lecturas de baja calidad y desreplicación y, de acuerdo con el algoritmo utilizado por el *pipeline dada2*, cerca del 42% de las lecturas iniciales fueron aprobadas ($\bar{x} = 9474$ lecturas).

Tabla 8. Secuencias iniciales contenidas por archivo y reporte de secuencias aprobadas una vez realizada la limpieza final.

Paciente	Lecturas iniciales	Lecturas aprobadas
H001	172229	104516
H002	168395	98161
H003	178331	103394
H004	176119	111330
H005	165024	79097
H006	168662	81921
H007	184430	84655
\bar{x}	173312	94724

5. Curvas de rarefacción:

Cada paciente fue representado por una línea de diferente color (*Figura 10*) y la observación de mesetas a partir de las 20000 lecturas en cada una de estas, permiten identificar que a la rarefacción (*75000 lecturas*) realizada, se obtuvo la mayor identificación de especies posibles para cada uno de los pacientes.



— H001 — H002 — H003
— H004 — H005 — H006 — H007

Figura 10. Curvas de rarefacción por paciente. Profundidad de muestreo $n= 75000$ lecturas. La línea media en el eje de las x representa el corte a la cual la rarefacción fue realizada. Realizada en: *RStudio* 1.4 (vegan v 2.5-7) Modificado de: *QIIME2 V. 2019.10*.

6. Diversidad- α :

A pesar de que entre los pacientes del grupo obeso se observaron diferencias entre los valores de los índices utilizados, de manera general, las medianas muestran una tendencia a una menor diversidad- α en dicho grupo. (Figura 11 A, B y C).

De acuerdo con el índice de OTUS Observados (Figura 11 A) y Chao (Figura 11 B), el grupo obeso-hipertenso presenta una mayor riqueza que el grupo obeso. De igual manera, y de acuerdo con el índice de Shannon (Figura 11 C) el grupo obeso-hipertenso muestra una mayor abundancia y riqueza.

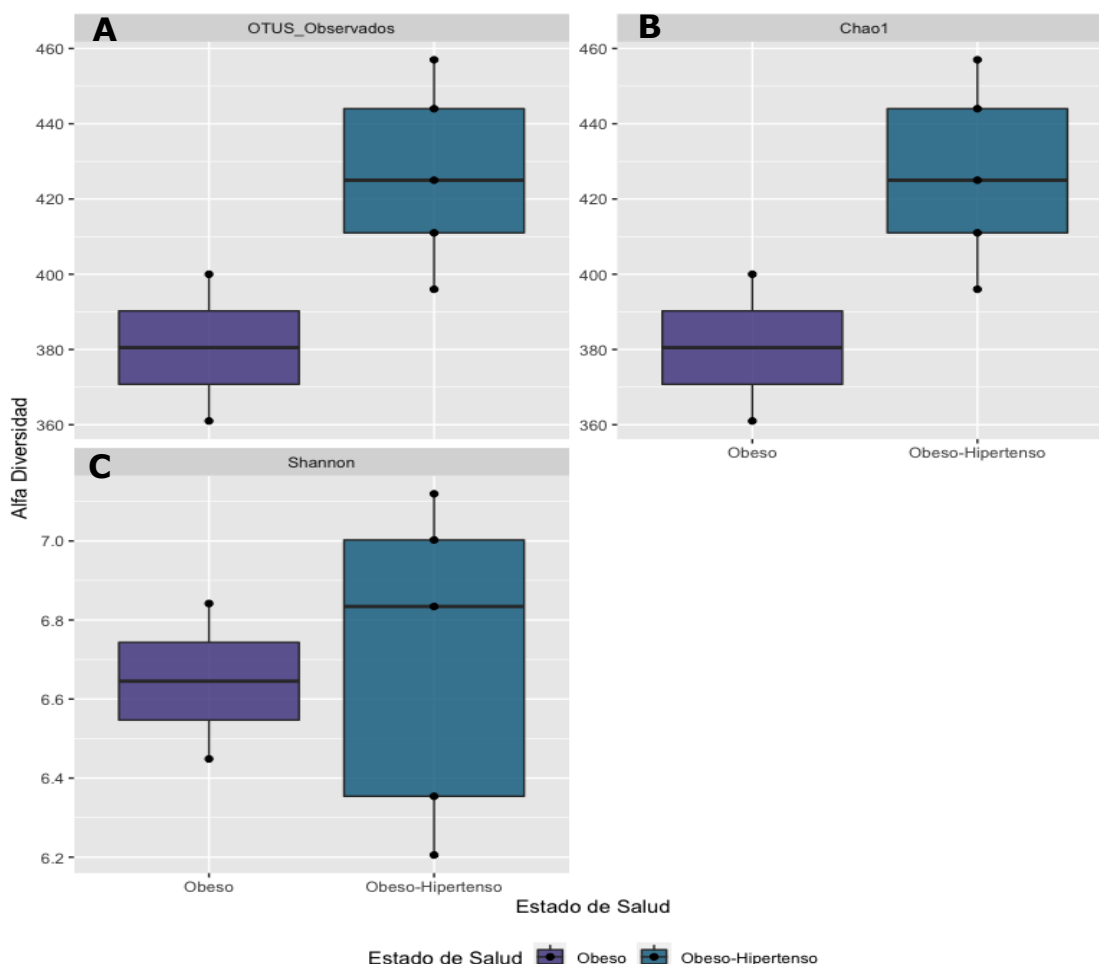


Figura 11. Diagramas de cajas y bigotes de los diferentes índices utilizados para el análisis de diversidad- α ($n_{total}=7$, $n_{obeso-hipertenso}=5$ y $n_{obeso}=2$). **A.** Análisis de diversidad- α por la métrica de OTUS observados. **B.** Análisis de diversidad- α por la métrica de Chao1. **C.** Análisis de diversidad- α por la métrica de Shannon. Realizado en RStudio v.1.4. Modificado de QIIME2 V.2019.10.

7. Diversidad-β:

El análisis de diversidad-β o de diferencias entre muestras, se realizó entre los dos grupos de estudio y se observó una tendencia a la separación entre ellos, además de cierto agrupamiento entre muestras pertenecientes al mismo grupo (*Figura12*), la significancia de este análisis fue realizado por medio de un análisis PERMANOVA ($p=0.097$)

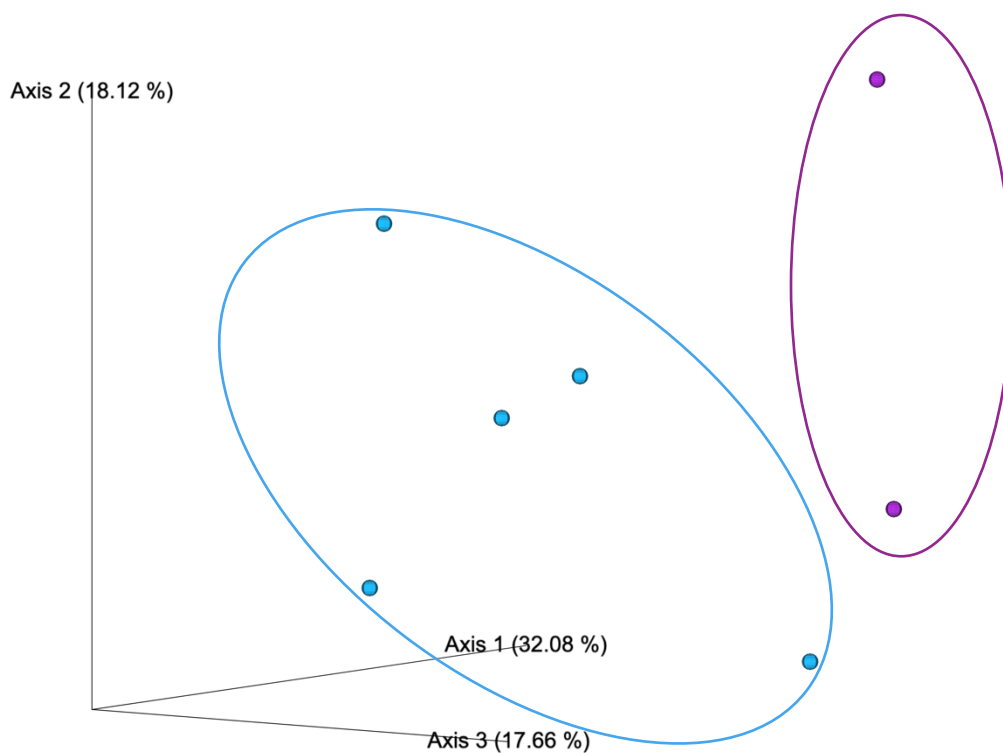


Figura 12. Gráfica de coordenadas principales de la métrica de Bray Curtis para el análisis diversidad-β. Los colores utilizados en el gráfico denotan los dos diferentes grupos de estudio; azul grupo obeso-hipertenso(n=5), morado grupo obeso(n=2).

Elaborado con: emperor plot in *QIIME2 V.2019.10*

8. Perfiles taxonómicos:

Una vez realizada la asignación taxonómica se encontraron la presencia de nueve *phyla*: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *TM7* y *Verrucomicrobia*; de los cuales los primeros seis representan una frecuencia absoluta > 99%.

Los *phyla* *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* fueron los que se observaron en una mayor proporción en todos los pacientes de estudio y solo el primero de estos representa más del 35% de la frecuencia relativa total. Mientras que, de manera general, el *phylum* con la menor frecuencia fue *Fusobacterium*. (Figuras 13 y 14).

En el grupo obeso; es decir en los pacientes H006 y H007 se observaron tendencias de frecuencia relativa similares en todos los *phyla* presentes, a excepción de *Actinobacteria*. El cual, se encontró en mayor proporción en el paciente H006. (Figura 13).

En el grupo obeso-hipertenso, en los pacientes H001, H002 y H005 se observaron frecuencias relativas similares en los *phyla* *Proteobacteria* y *Fusobacteria*. De igual manera, en los pacientes H001 y H005 se obtuvieron frecuencias similares en los *phyla* *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Dichos resultados también se encontraron en los pacientes H003 y H004. Por otro lado, en estos pacientes se obtuvo la mayor frecuencia del *phylum* *Proteobacteria*, con aproximadamente 40%, siendo este el más abundante en ellos.

Por otro lado, de todos los pacientes en estudio, el único con una frecuencia relativa >1% del *phylum* *Cyanobacteria* fue el H005. Del mismo modo, frecuencias considerables del *phylum* *Actinobacteria* fueron observadas únicamente en los pacientes H001 y H006 (Figura13).

La taxonomía a nivel de *phyla* por grupos de estudio mostró diferencias entre los *phyla Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria*; siendo la más marcada de ellas la observada en el *phylum Proteobacteria* pues la frecuencia relativa en el grupo obeso-hipertenso es casi 5 veces mayor a la reportada en el grupo obeso. Por otro lado, y al solo ser observado en el paciente H005, el *phylum Cyanobacteria* fue el único en donde se obtuvo una presencia, prácticamente, exclusiva en el grupo obeso-hipertenso.

Por otro lado, los *phyla Bacteroidetes y Firmicutes* presentaron una frecuencia relativa de, aproximadamente, 10% más en el grupo obeso en comparación con el grupo obeso-hipertenso con 48.8% y 42.7%, en cada *phylum* respectivamente (*Figura 14*).

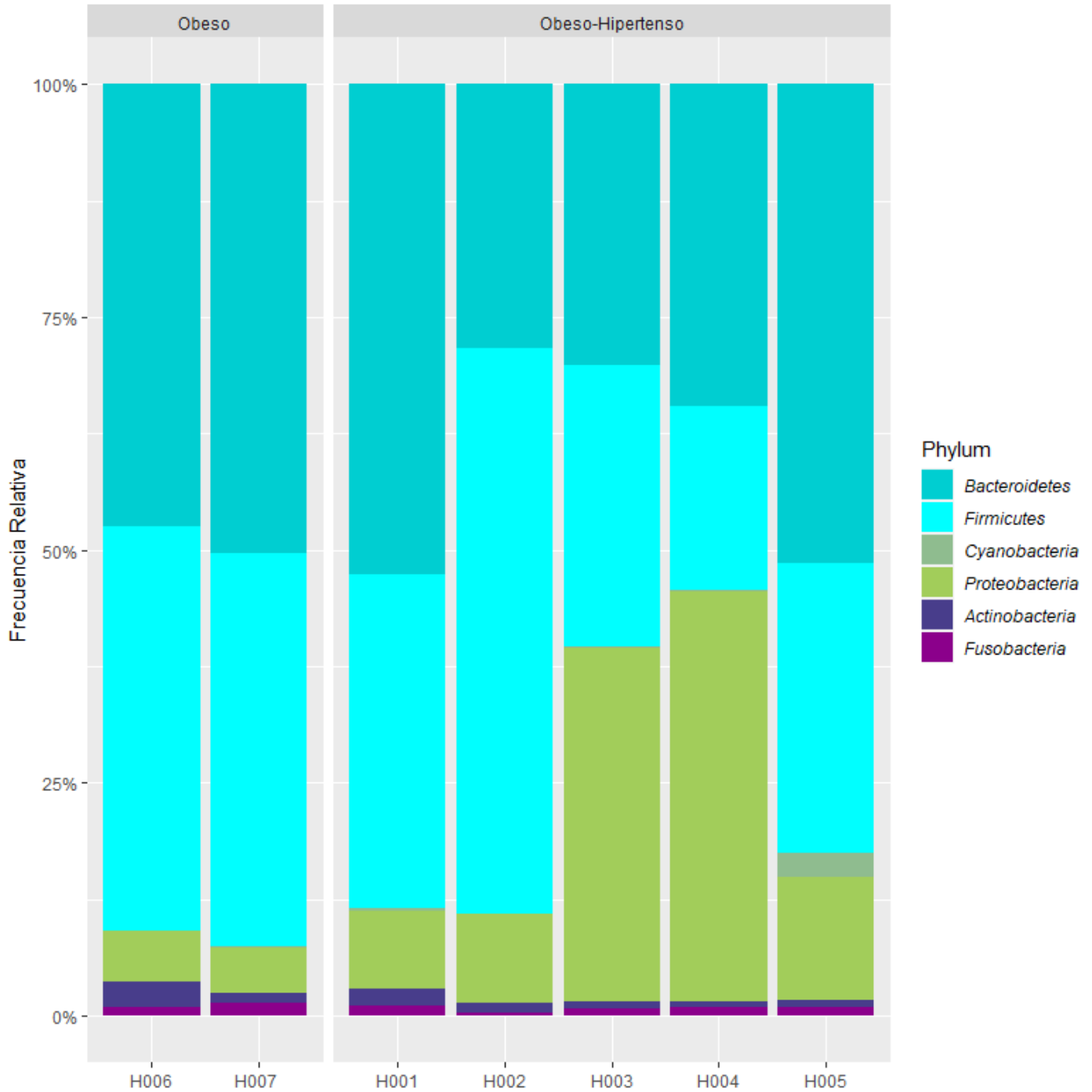


Figura 13. Perfil taxonómico a nivel de *phyla* por paciente incluido en el estudio (*Phyla* con frecuencias relativas >1%). Las características clínicas de cada paciente son reportadas en la **tabla 3**. Realizada en: *RStudio* 1.4. Modificado de: *QIIME 2 V.2019.10*. (Base de datos: *Greengenes v13_8*)

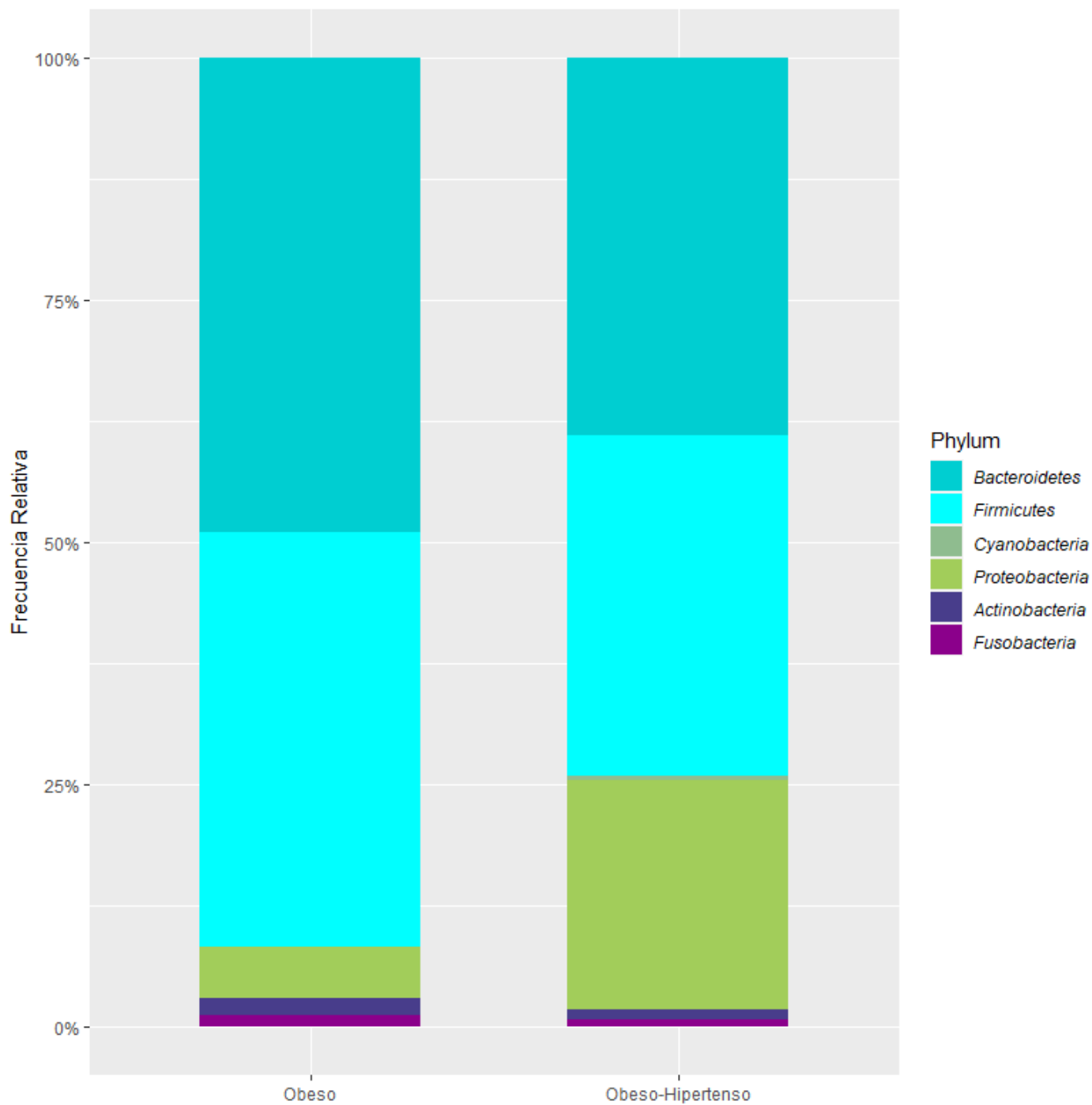


Figura 14. Perfil taxonómico a nivel de *phyla* por grupo de estudio clasificado de acuerdo con el estado de salud. (obeso-hipertenso n=5, obeso n=2). Realizada en: *RStudio* 1.4. Modificado de: *QIIME2 V.2019.10*. (Base de datos: *Greengenes v13_8*)

Un total de 18 géneros presentaron una frecuencia absoluta $> 1.2\%$; los cuales corresponden a una frecuencia absoluta de $> 80\%$ (Figura 15).

Los géneros *Prevotella* y *Faecalibacterium* al igual que aquellos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son los que se encuentran de manera predominante en todos los pacientes. Por otro lado, aquellos con la frecuencia menor fueron *Oscillospira*, *Lachnospira*, además de los pertenecientes al orden *Clostridiales* (Figura 15).

En el perfil taxonómico en el grupo obeso; es decir en los pacientes H006 y H007, se observaron tendencias de frecuencia relativa similares en todos los géneros presentes, con excepción de la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Dialister*, los que se encontraron en mayor proporción en el paciente H006.

Por otro lado, en el grupo obeso-hipertenso se observaron grandes variaciones interpersonales a nivel de género. Sin embargo, en todos los pacientes pertenecientes a este grupo se obtuvieron frecuencias relativas similares en los géneros *Lachnospira*, *Streptococcus* y *Oscillospira*.

En el grupo obeso-hipertenso, de manera particular, en los pacientes H003 y H004 se observó la mayor frecuencia relativa de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que en el resto de los pacientes de este grupo la frecuencia fue similar.

Finalmente, en el paciente H005 se observó la mayor frecuencia relativa del género *Paraprevotella* siendo aproximadamente 2% mayor que en el resto de los pacientes de estudio independientemente de su estado de salud. (Figura 15).

La taxonomía a nivel de género por grupos de estudio mostró diferencias importantes, principalmente entre los géneros *Prevotella*, *Faecalibacterium*

y aquellos pertenecientes a *Enterobacteriaceae*. Siendo la más marcada de estas, la diferencia en la familia *Enterobacteriaceae*, pues la frecuencia relativa en el grupo obeso-hipertenso es casi 17 veces mayor a la reportada en el grupo obeso. El género *Enterobacter*, únicamente tiene una frecuencia relativa considerable en el grupo obeso-hipertenso. Por el contrario, los géneros *Prevotella* y *Faecalibacterium* se presentaron con una frecuencia relativa cercana al doble en el grupo obeso en comparación con el grupo obeso-hipertenso con 51.7% y 13.78%, en cada uno de los géneros respectivamente (*Figura 16*).

Finalmente, géneros como *Haemophilus* y *Lachnospira*, a pesar de encontrarse en una frecuencia relativa <3% fueron más abundantes en el grupo obeso-hipertenso en comparación con el grupo obeso.

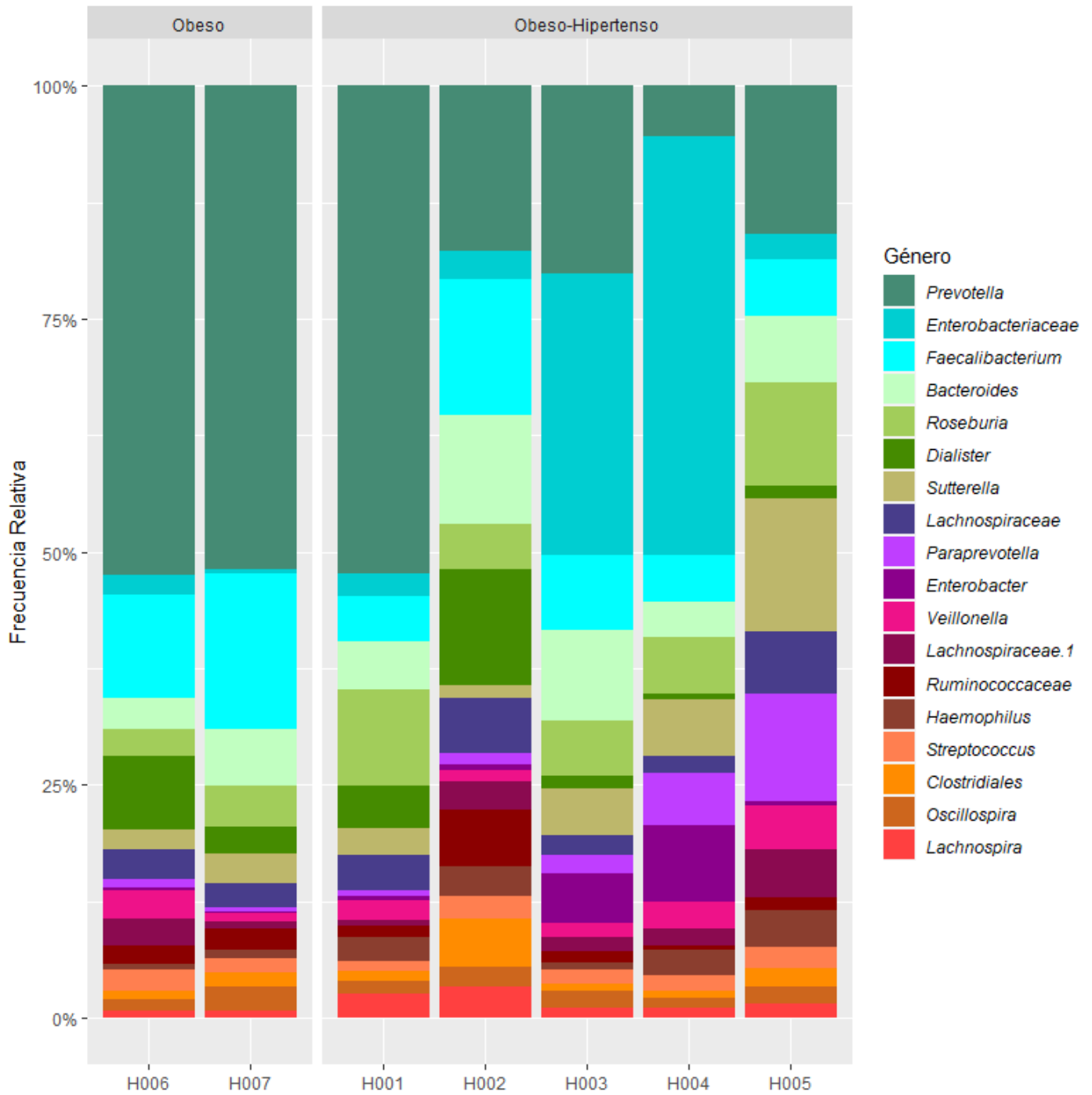


Figura 15. Perfil taxonómico a nivel de género por paciente de protocolo de estudio. (Géneros con frecuencias absolutas > 1.2%). Las características de cada paciente son reportadas en la **tabla 3**. Realizada en: *RStudio* 1.4 Modificado de: *QIIME2 V. 2019.10*. (Base de datos: Greengenes v13_8)

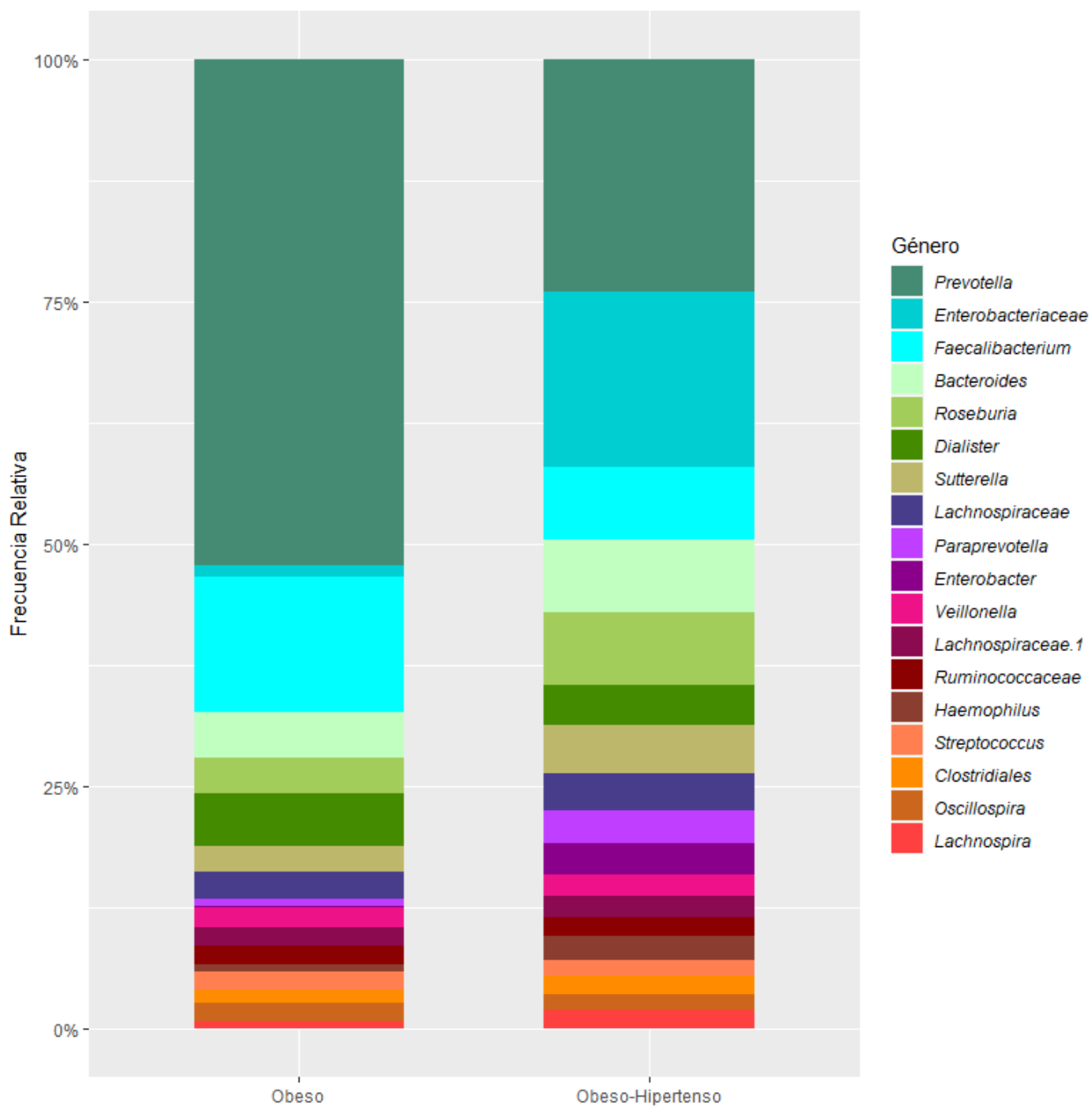


Figura 16. Perfil taxonómico a nivel de género por grupo de estudio clasificado de acuerdo al estado de salud. (Géneros con una frecuencia relativa > 1.2%). (obeso-hipertenso n=5, obeso=2). Realizada en: *RStudio* 1.4 Modificado de: *QIIME2 V. 2019.10*. (Base de datos: Greengenes v13_8)

9. Significancia a nivel de *phyla* y género:

No se obtuvieron diferencias significativas en la frecuencia en el perfil taxonómico a nivel de *phyla* y género entre los diferentes grupos de estudio. Sin embargo, se identificaron ciertas tendencias de una mayor frecuencia de ciertos *phyla* y géneros entre grupos.

En *phyla* como *Bacteroidetes* y *Fusobacteria*, las proporciones de frecuencia relativa en ambos grupos se mantuvieron similares (*Figura17 A y B*). Sin embargo, en el caso de *Proteobacteria*, una mayor frecuencia fue obtenida en el grupo obeso-hipertenso (*Figura17 D*). Por otro lado, la tendencia contraria fue observada en el *phylum Actinobacteria*, ya que el grupo obeso mostró una mayor frecuencia que el grupo obeso-hipertenso (*Figura17 E*).

En géneros como *Roseburia*, *Enterobacter* y *Haemophilus*, además de aquellos pertenecientes a *Enterobacteriaceae* se obtuvo una frecuencia mayor en el grupo obeso-hipertenso en relación con el grupo obeso (*Figura18 B, D, E y F*). Lo contrario fue observado para los géneros *Prevotella* y *Faecalibacterium*; en estos se reportó una frecuencia mayor en el grupo obeso en comparación con el grupo obeso-hipertenso (*Figura 18 A y C*).

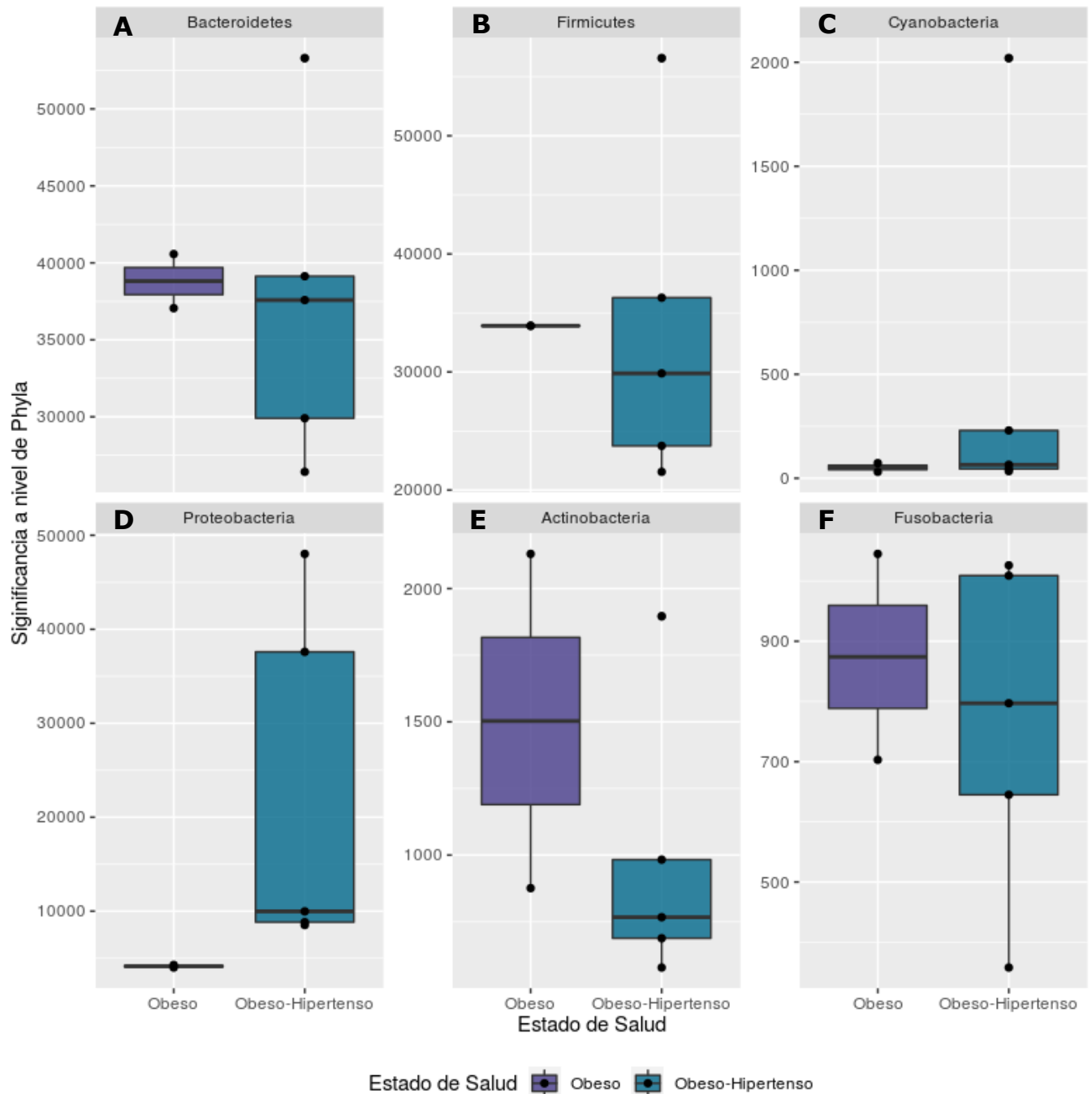


Figura 17. Significancia a nivel de *phyla* entre grupos de estudio. (obeso- hipertenso n=5, obeso n=2). **(A)**Significancia entre grupos del *phylum Bacteroidetes* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(B)**Significancia entre grupos del *phylum Firmicutes* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(C)**Significancia entre grupos del *phylum Cyanobacteria* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(D)**Significancia entre grupos del *phylum Proteobacteria* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(E)**Significancia entre grupos del *phylum Actinobacteria* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(F)**Significancia entre grupos del *phylum Fusobacteria* (Mann-Whitney $p > 0.1$). Realizada en: RStudio 1.4

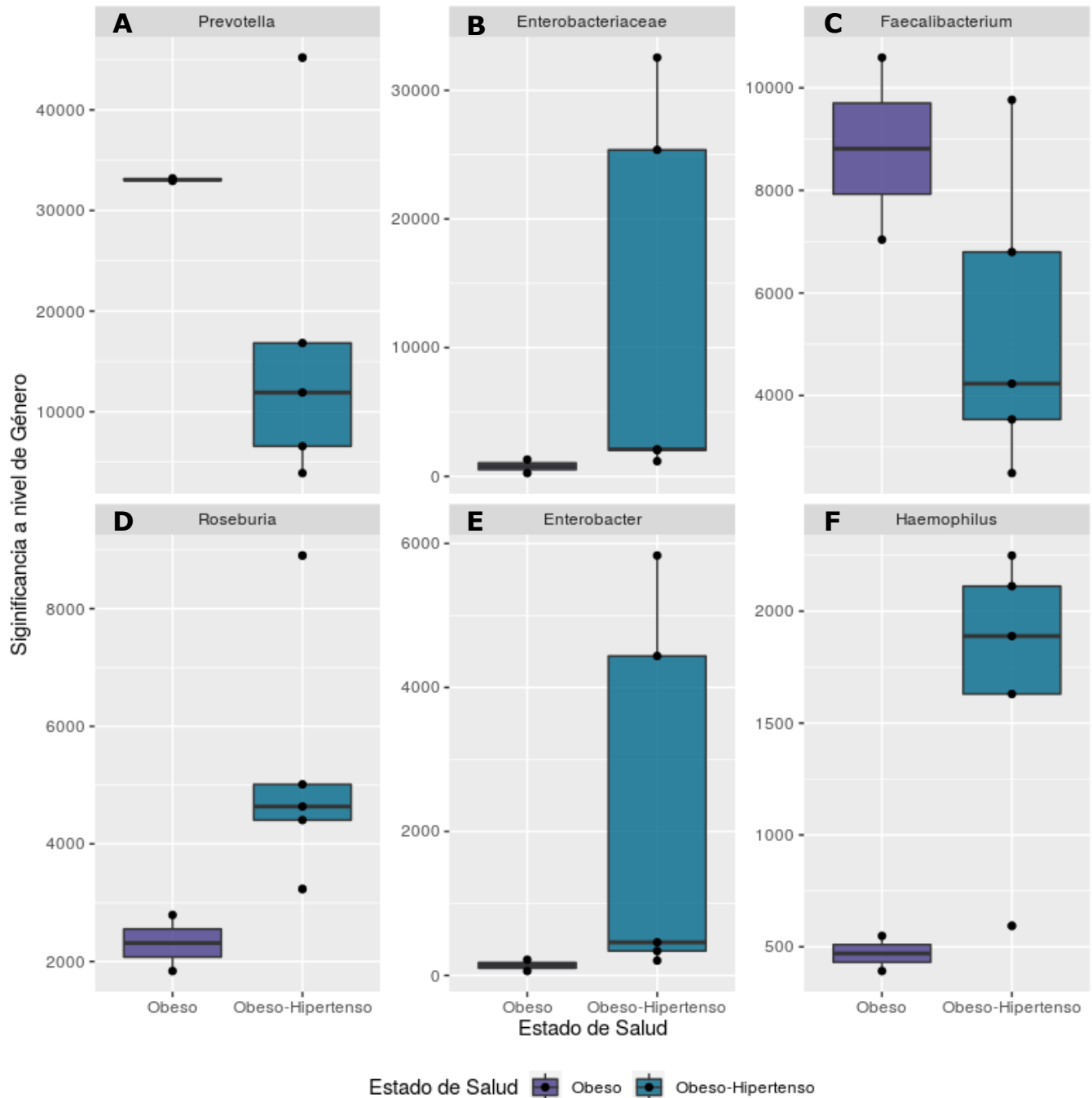


Figura 18. Significancia a nivel de género entre grupos de estudio. (obeso-hipertenso n=5, obeso n=2). **(A)**Significancia entre grupos del género *Prevotella* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(B)**Significancia entre grupos de la familia *Enterobacteriaceae* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(C)**Significancia entre grupos del género *Faecalibacterium* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(D)**Significancia entre grupos del género *Roseburia* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(E)**Significancia entre grupos del género *Enterobacter* (Mann-Whitney $p > 0.1$). **(F)**Significancia entre grupos del género *Haemophilus* (Mann-Whitney $p > 0.1$). Realizada en: RStudio 1.4

10. LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*)

Las comparaciones entre grupos de estudio mostraron enriquecimientos en la familia *Enterobacteriaceae*, al igual que en los géneros *Enterobacter* y *Roseburia* en el grupo obeso-hipertenso, siendo el presentado por la familia *Enterobacteriaceae* el que presenta un mayor efecto de tamaño (LDA Score, *Linear Discriminant Analysis Score*, por sus siglas en inglés).

Por otro lado, se determinaron disminuciones de enriquecimiento en las bacterias pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el grupo obeso (*Figura 19*).

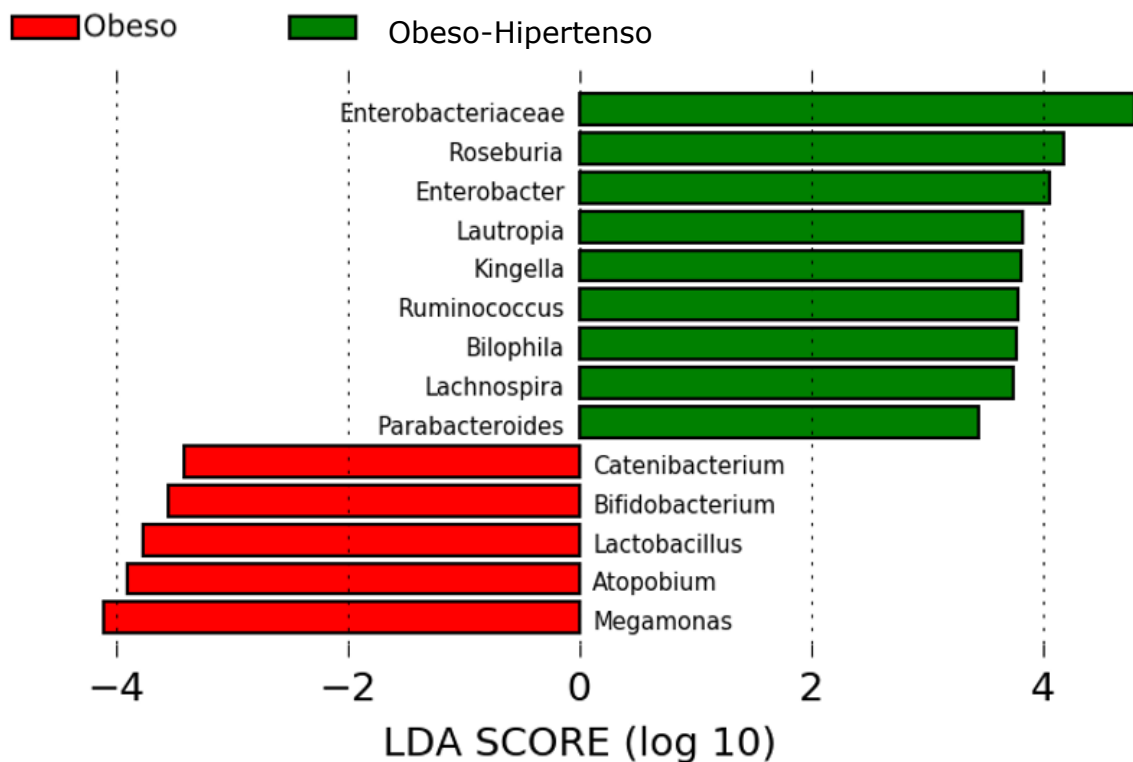


Figura 19. Análisis LEfSe a nivel de todos los géneros presentes en los diferentes grupos de estudio. Kruskal-Wallis ($p < 0.1$), Wilcoxon ($p < 0.1$), LDA > 1.0. Elaborado en: <https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>

6. Discusión

En las últimas décadas, ha habido un aumento en la incidencia de enfermedades multifactoriales a nivel mundial que no puede ser explicado en su totalidad por los factores genéticos ni por los ambientales. Por las características que son atribuidas a la fisiopatología de estas enfermedades y la relación que presentan con el ambiente se ha establecido un posible vínculo con el desarrollo de estas y la diversidad, riqueza y taxonomía de la microbiota^{19,20}.

Para el estudio de la microbiota intestinal, es posible utilizar diversos tipos de muestra; siendo el más común las heces. Los resultados obtenidos en el presente proyecto mostraron que la cantidad de DNA extraído de un mismo tipo de muestra puede variar considerablemente de persona a persona; ya que las bacterias del colon son incluidas en las heces por arrastre y estas no se distribuyen de manera homogénea en las mismas, ni existe la misma cantidad entre individuos. Sin embargo, por las características propias de los equipos secuenciadores no se requieren altas concentraciones de DNA, si no que este se encuentre lo más puro posible; es decir que no se encuentre contaminado por proteínas, tal como se demostró en el índice de calidad 260/280 que muestra que el material genético extraído contaba con una cantidad de proteínas mínima.

Para llevar a cabo el análisis del microbioma de manera correcta es necesario que tras la recepción de las secuencias se realice la comprobación de la calidad de estas. Una vez realizado lo anterior, los resultados mostraron números de lecturas diferentes en cada uno de los pacientes; es importante recalcar que aun cuando esto pueda ser considerado como un marcador de riqueza, no es posible comparar el número de lecturas en crudo ya que estas contienen información que no es biológicamente relevante (artefactos) o que no proporciona información confiable para

llevar a cabo análisis posteriores⁶³. En consecuencia, no es posible obtener ningún parámetro comparativo entre ellas sino hasta el momento en el que la rarefacción es realizada.

Las lecturas sin artefactos y filtradas son utilizadas para el análisis de diversidad. En el cual, en la mayoría de los casos, se observan valores menores cuando se considera que el nicho intestinal se encuentra en un estado de disbiosis²². De hecho, estas observaciones son reproducidas en la mayoría de las enfermedades multifactoriales asociadas con la abundancia y riqueza de la microbiota, siempre y cuando los pacientes de estudios sean comparados con grupos control considerados aparentemente sanos^{22,25}. Sin embargo, en un reporte de microbiota intestinal³⁵ en los pacientes con hipertensión arterial sistémica clasificados en dos grupos (obesos y con IMC normal), se observó un índice de Shannon mayor en los pacientes obesos con hipertensión en comparación con aquellos con un IMC normal e hipertensión. Los resultados del presente estudio concuerdan con lo previamente señalado, ya que en los análisis de diversidad- α realizados (índices: OTUS observados, Chao1 y Shannon) se observó una mayor riqueza en el grupo obeso-hipertenso en comparación con el grupo obeso. Sin embargo, entre los pacientes de este grupo se observaron diferencias entre los valores de dichos índices. Al evaluar los datos clínicos colectados, en el paciente H007 se reportó cierta elevación en la presión arterial diastólica haciéndola más cercana a la mediana del grupo obeso-hipertenso; lo cual puede verse relacionado con la similitud en los valores de diversidad- α de este con dicho grupo. No obstante, los resultados anteriores³⁵ y lo obtenido en el presente estudio permiten decir que al presentar dos o más enfermedades de carácter multifactorial no necesariamente se presenta una menor diversidad al compararlo con aquellos grupos que solamente presentan una.

Por otro lado, es posible apreciar en los datos clínicos que los pacientes muestran grandes variaciones en cuanto a su edad. Si bien es cierto, esta contribuye de manera importante en los cambios en algunos parámetros clínicos no es así en la microbiota intestinal. Ya que, tal y como fue mencionado, esta permanece relativamente estable a lo largo de la adultez⁸ y no se observan cambios importantes en cuanto a abundancia y riqueza (diversidad- α) sino hasta la tercera edad (65 años en adelante). Esta misma situación es reportada en los perfiles taxonómicos, ya que la frecuencia relativa de los principales *phyla* de la microbiota intestinal es similar en adultos desde los 20 hasta los 50^{64,65}. Dicho lo anterior, es posible asegurar que las edades de los pacientes en estudio no afectan de manera considerable los resultados en cuanto a diversidad, riqueza y abundancia.

Cabe resaltar, y tal como fue mencionado en los métodos, los pacientes pertenecientes al grupo obeso presentaron un IMC que permitía categorizarlos como obesos; mientras que los pacientes del grupo obeso-hipertenso, además de cumplir con dicho IMC presentaron un diagnóstico de HAS. Por lo cual, y de acuerdo a lo establecido en la literatura⁶⁶, ambos grupos de estudios se encontraban en un estado de inflamación crónica.

Bajo este mismo parámetro es imprescindible mencionar que existen pocos estudios donde se comparen los perfiles de la microbiota intestinal en pacientes con dos morbilidades y aún menos reportes donde una de estas se encuentre directamente relacionada con el desarrollo de la otra. Sin embargo, y de acuerdo con la tendencia de separación entre los grupos de estudio observada en la diversidad- β es posible decir que existen diferencias entre la composición de su microbiota dependiendo del estado de salud de los sujetos.

Por otro lado, y como ya fue previamente mencionado, los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) son los productos de fermentación de la microbiota

que permiten, entre muchas otras cosas, la disminución de la presión arterial cuando estos pasan a circulación. Algunos géneros bacterianos son los principales productores de estos y se ven disminuidos cuando el hospedero desarrolla hipertensión. Las principales diferencias entre las frecuencias relativas de los grupos de estudio fueron observadas en los géneros productores de SCFA. Tal es el caso de *Faecalibacterium spp.* y *Roseburia spp.*, que en diversos reportes han demostrado una disminución en los pacientes hipertensos en comparación con aquellos aparentemente sanos^{16,67}. Los resultados del presente estudio concuerdan con lo encontrado en la literatura para el género *Faecalibacterium spp.*, ya que en aquellos pacientes con diagnóstico de obesos-hipertensos se encuentra disminuido en comparación con los pacientes obesos. Sin embargo, en el caso de *Roseburia spp.* y a diferencia de lo previamente señalado, en este género se observó una mayor abundancia en el grupo hipertenso-obeso en comparación con el grupo obeso. De hecho, de acuerdo con lo obtenido en el análisis LEfSe el aumento de este género en el grupo obeso-hipertenso en comparación con el grupo obeso se encuentra correlacionado con el estado de salud de estos pacientes; es decir puede encontrarse relacionado con el desarrollo de hipertensión en estos. De igual manera, los resultados obtenidos concuerdan con la información disponible del perfil taxonómico de la microbiota intestinal en la población brasileña, la cual es la única latina de la que actualmente se cuenta con información (*Tabla 9*),⁵⁰ en ella se observó una disminución en el género *Faecalibacterium* en el grupo de pacientes con hipertensión.

Tabla 9. Comparación entre los resultados obtenidos y las diferencias entre los perfiles bacterianos reportados en diferentes poblaciones con hipertensión.

México (este estudio)	Brasil ⁵⁰	Finlandia ⁵¹	China ¹¹
↓ <i>Faecalibacterium spp.</i>	↓ <i>Faecalibacterium spp.</i>	Sin resultados reportados	↓ <i>Faecalibacterium spp.</i>
↑ <i>Roseburia spp.</i>	↓ <i>Roseburia spp.</i>	Sin resultados reportados	↓ <i>Roseburia spp.</i>
↓ <i>Prevotella spp.</i>	Sin resultados reportados	Sin resultados reportados	↑ <i>Prevotella spp.</i>
↓ <i>Bifidobacterium spp.</i>	Sin resultados reportados	Sin resultados reportados	Sin resultados reportados
↓ <i>Lactobacillus spp.</i>	Sin resultados reportados	↓ <i>Lactobacillus spp.</i>	Sin resultados reportados

A pesar de no tener una contribución clara en el metabolismo de los SCFA o en el desarrollo mismo de la hipertensión en un estudio de población China se reportó un aumento en el género *Prevotella* en pacientes con HAS en comparación con sujetos aparentemente sanos¹¹. Dichas observaciones contrastan con lo obtenido en el presente estudio ya que en el grupo obeso-hipertenso se obtuvo una frecuencia relativa, aproximadamente, 17 veces menor en comparación con el grupo obeso. Esta predominancia en personas obesas también ha sido reportada en población mexicana obesa, sin ninguna comorbilidad, residente de EUA⁴⁰

Por otro lado, algunos géneros son considerados como claves para la producción de SCFA, ya que a pesar de no producirlos algunos productos de su metabolismo son precursores para la síntesis de estos. Tal es el caso de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que son considerados como esenciales para la producción de estos ácidos y una disminución en los mismos, ha sido reportada en pacientes con hipertensión⁵¹. Los resultados obtenidos, a pesar de no ser mostrados en el perfil taxonómico por no representar un porcentaje mayor al 1% de la frecuencia relativa total de las especies del perfil, muestran, de acuerdo con lo obtenido en el análisis LEfSe, que su disminución en los pacientes hipertensos-obesos se encuentra relacionado con su estado de salud. Dichos resultados concuerdan con lo reportado en Finlandia⁵¹ pues se reportó que la frecuencia de este género presenta una relación inversamente proporcional a la presión arterial.

Finalmente, el aumento de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias clasificadas como patobiontes, es considerado como un indicador de una producción deficiente de butirato y, por ende, estos aumentan en pacientes hipertensos^{16,68} (*Figura 20*). Estos microorganismos son clasificados como anaerobios facultativos y su desarrollo, se ve favorecido cuando este SCFA no se produce.

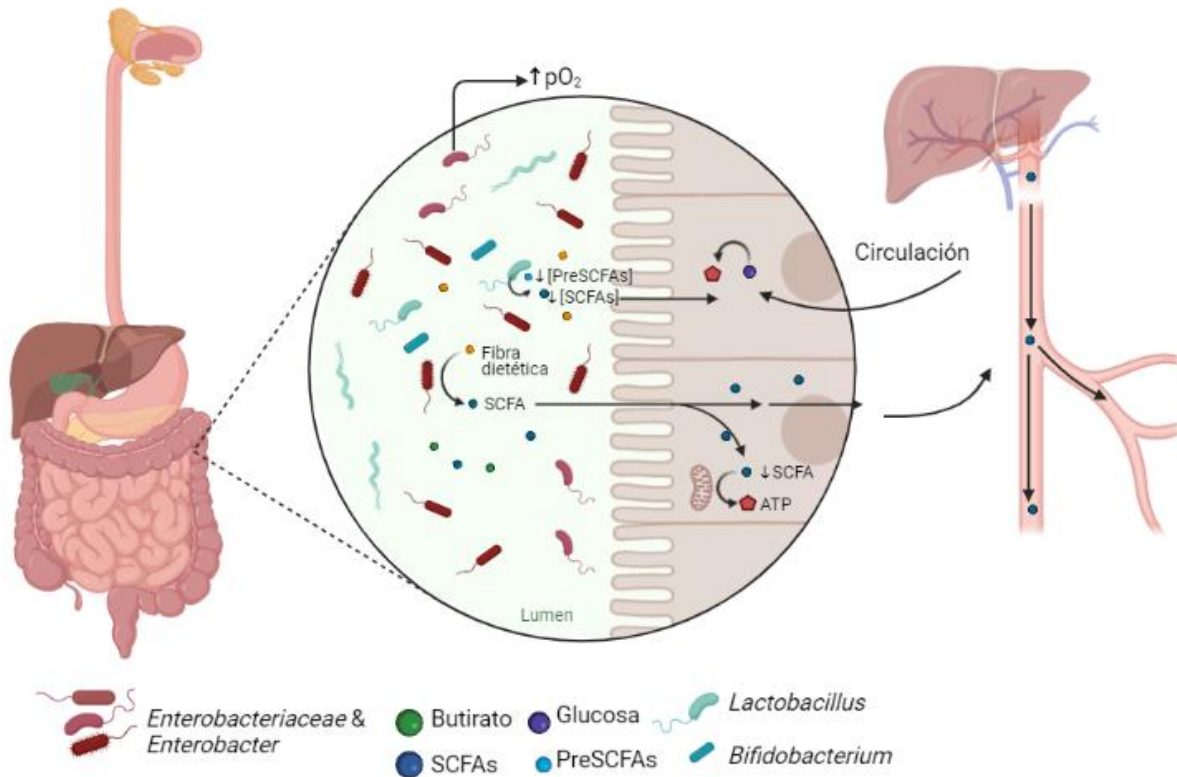


Figura 20. Modelo de la posible contribución de la disminución y aumento de ciertos géneros bacterianos al desarrollo de hipertensión arterial, en el grupo obeso-hipertenso, por las bajas concentraciones de SCFA.

Por acción indirecta, el butirato produce un ambiente de hipoxia que es revertido cuando hay aumentos en esta familia, que al igual que en diversos reportes previos⁶⁷, se presentó una mayor frecuencia relativa en el grupo obeso- hipertenso en comparación con el grupo obeso. A su vez, la disminución en los géneros precursores de SCFA como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* puede contribuir a que no exista una regulación a la baja de la presión arterial en dicho grupo.

7. Conclusiones:

Las muestras de DNA obtenidas cumplieron con los estándares de pureza e integridad, lo cual fue posible por la modificación a la metodología planteada.

A partir del análisis del gen 16S rRNA se identificaron los diferentes *phyla* y géneros presentes en los dos diferentes grupos de pacientes estudiados: obesos y obesos-hipertensos.

La tendencia a la separación entre grupos de estudio en el análisis de diversidad- β permitió determinar que existen diferencias entre la microbiota intestinal de los dos grupos.

Las diferencias entre las frecuencias relativas de algunas familias y géneros, como es el caso de *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter* y *Roseburia* parecen estar relacionadas con el estado de salud de los pacientes.

Finalmente, los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura, en particular, la disminución de todos los géneros que contribuyen a la producción de SCFA en los pacientes obesos-hipertensos, tales como: *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

8. Perspectivas

El presente estudio, es el uno de los varios primeros pasos requeridos para elaborar un régimen de tratamiento adecuado para pacientes mexicanos obesos-hipertensos y puede continuarse hasta recolectar una muestra considerable de pacientes que incluyan controles sanos. Lo anterior, con el

fin de tener un parámetro que permita tener un comparativo sin un estado de inflamación crónica y verificar la existencia de una posible disbiosis.

A su vez, de las muestras de heces recolectadas podría realizarse la cuantificación de los SCFA. Lo cual permitiría asegurar y demostrar la concentración baja en dichos metabolitos microbianos en los pacientes con hipertensión arterial sistémica y correlacionarla con la baja en las especies productoras.

9. Bibliografía:

1. Ira Fox S. *Fisiología Humana Stuart Ira Fox*. 13va ed. Mc Graw Hill; 2014: pp. 657-659.
2. Azzouz LL, Sharma S. *Physiology, Large Intestine*. StatPearls Publishing; 2018. Recuperado: 2021, junio 29, de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939634>
3. Marques FZ, Mackay CR, Kaye DM. Beyond gut feelings: How the gut microbiota regulates blood pressure. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(1):20-32. doi:10.1038/nrcardio.2017.120
4. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):35-56. doi:10.1038/s41575-018-0061-2
5. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009;326(5960):1694-1697. doi:10.1126/science.1177486
6. Corrigan M, Roberts K, Steiger, E. Capítulo 4:Gut Microbiome. En: Cresci GAM, Izzo K, ed. *Adult short bowel syndrome: Nutritional, medical, and surgical management*. Elsevier; 2018:45-54. doi:10.1016/B978-0-12-814330-8.00004-4
7. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):690-703. doi:10.1016/j.chom.2015.04.004
8. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*. 2017;46(4):562-576. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008
9. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the

gut microbiome. *Cell*. 2014;159(4):789-799.
doi:10.1016/j.cell.2014.09.053

10. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
doi:10.1038/nature08821

11. Kang Y, Cai Y. Gut microbiota and hypertension: From pathogenesis to new therapeutic strategies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2018;42(2):110-117. doi:10.1016/j.clinre.2017.09.006

12. Velasquez MT, Ramezani A, Manal A, Raj DS. Trimethylamine N-oxide: The good, the bad and the unknown. *Toxins (Basel)*. 2016;8(11).
doi:10.3390/toxins8110326

13. Yang S, Li X, Yang F, et al. Gut microbiota-dependent marker TMAO in promoting cardiovascular disease: Inflammation mechanism, clinical prognostic, and potential as a therapeutic target. *Front Pharmacol*. 2019;10:1-14. doi:10.3389/fphar.2019.01360

14. Hoseini-Tavassol Z, Hasani-Ranjbar S. Targeting TMAO and its metabolic pathway for cardiovascular diseases treatment. *J Diabetes Metab Disord*. 2021;20(1):1095-1097. doi:10.1007/s40200-021-00819-x

15. Yang F, Chen H, Gao Y, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and hypertension: Mechanism and treatment. *Biomed Pharmacother*. 2020;130:110503. doi:10.1016/j.biopha.2020.110503

16. Overby HB, Ferguson JF. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids facilitate microbiota:Host cross talk and modulate obesity and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2021;23(2). doi:10.1007/s11906-020-01125-2

17. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun.* 2014;5:1-11. doi:10.1038/ncomms4611
18. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57(6):1470-1481. doi:10.2337/db07-1403
19. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):219-232. doi:10.1038/nri.2017.7
20. Chow J, Mazmanian SK. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe.* 2010;7(4):265-276. doi:10.1016/j.chom.2010.03.004
21. Korem T, Zeevi D, Suez J, et al. Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. *Science.* 2015;349(6252):1101-1106. doi:10.1126/science.aac4812
22. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe.* 2015;17(2):260-273. doi:10.1016/j.chom.2015.01.001
23. Moreno-Altamirano L, García-García JJ, Soto-Estrada G, Capraro S, Limón-Cruz D. Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Rev Médica Del Hosp Gen México.* 2014;77(3):114-123. doi:10.1016/j.hgmex.2014.07.002
24. Organización Mundial de la Salud. *Diabetes.* Recuperado: 2021, junio 30. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

25. Chávez-Carbajal A, Pizano-Zárate ML, Hernández-Quiroz F, et al. Characterization of the gut microbiota of individuals at different T2D stages reveals a complex relationship with the host. *Microorganisms*. 2020;8(1). doi:10.3390/microorganisms8010094
26. Pimentel M, Lembo A. Microbiome and its role in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*. 2020;65(3):829-839. doi:10.1007/s10620-020-06109-55
27. Barquera S, Hernández-Barrera L, Trejo-Valdivia B, Shamah T, Campos-Nonato I, Rivera-Dommarco J. Obesidad en México, prevalencia y tendencias en adultos. Ensanut 2018-19. *Salud Publica Mex*. 2020;62(6):682-692. doi:10.21149/11630
28. Chrysant SG. Pathophysiology and treatment of obesity-related hypertension. *J Clin Hypertens*. 2019;21(5):555-559. doi:10.1111/jch.13518
29. Organización Mundial de la Salud. *Obesidad y sobrepeso*. Recuperado: 2021, junio 30. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
30. De La Cuesta-Zuluaga J, Corrales-Agudelo V, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS. Body size phenotypes comprehensively assess cardiometabolic risk and refine the association between obesity and gut microbiota. *Int J Obes*. 2018;42(3):424-432. doi:10.1038/ijo.2017.281
31. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol*. 2015;15(1):1-10. doi:10.1186/s12876-015-0330-2

32. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-15723. doi:10.1073/pnas.0407076101
33. Pallister T, Jackson MA, Martin TC, et al. Untangling the relationship between diet and visceral fat mass through blood metabolomics and gut microbiome profiling. *Int J Obes*. 2017;41(7):1106-1113. doi:10.1038/ijo.2017.70
34. Chen LW, Xu J, Soh SE, et al. Implication of gut microbiota in the association between infant antibiotic exposure and childhood obesity and adiposity accumulation. *Int J Obes*. 2020;44(7):1508-1520. doi:10.1038/s41366-020-0572-0
35. Mushtaq N, Hussain S, Xu J. Characterization of gut microbiota in obese and lean hypertensive patients. *Bacteriol Parasitol*. 2018;9(5). doi:10.4172/2155-9597.1000345
36. Petriz BA, Castro AP, Almeida JA, et al. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1-13. doi:10.1186/1471-2164-15-511
37. López-Contreras BE, Morán-Ramos S, Villarruel-Vázquez R, et al. Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatr Obes*. 2018;13(6):381-388. doi:10.1111/ijpo.12262
38. Aguilar T, Nava GM, Olvera-Ramírez AM, et al. Gut bacterial families are associated with body composition and metabolic risk markers in school-aged children in rural Mexico. *Child Obes*. 2020;16(5):358-366. doi:10.1089/chi.2019.0312
39. Méndez-Salazar EO, Ortiz-López MG, Granados-Silvestre MDLÁ,

Palacios-González B, Menjivar M. Altered gut microbiota and compositional changes in firmicutes and proteobacteria in mexican undernourished and obese children. *Front Microbiol.* 2018;9(OCT). doi:10.3389/fmicb.2018.02494

40. Kaplan RC, Wang Z, Usyk M, et al. Erratum: Gut microbiome composition in the Hispanic community health study/Study of Latinos is shaped by geographic relocation, environmental factors, and obesity. *Genome Biol.* 2020;21(1):1-21. doi:10.1186/s13059-020-01970-z

41. Secretaría de Salud: Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-030-SSA2-2017, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. (PROY-NOM-030-SSA2-2017). 2020:
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5480159&fecha=19/04/2017.

42. Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Pedroza-Tobías A, Medina C, Barquera S. Hypertension in Mexican adults: Prevalence, diagnosis and type of treatment. Ensanut MC 2016. *Salud Publica Mex.* 2018;60(3):233-243. doi:10.21149/8813

43. Ramírez-Arias E, Santos-Martínez E, Díaz-Díaz E, Rodríguez M, Pérez-Ruiz CE, Raúl L. Consenso de hipertensión arterial sistémica en México. *Consenso Hipertens Arter Sistémica en México.* 2016;54(1):6-51.

44. Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Pedroza-Tobías A, Medina C, Barquera S. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. Ensanut MC 2016. *Salud Publica Mex.* 2018;60(3, may-jun):233. doi:10.21149/8813

45. Jama HA, Kaye DM, Marques FZ. The gut microbiota and blood

pressure in experimental models. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2019;28(2):97-104. doi:10.1097/MNH.0000000000000476

46. Jia Q, Li H, Zhou H, et al. Role and effective therapeutic target of gut microbiota in heart failure. *Cardiovasc Ther*. 2019; 2019:5164298. doi: 10.1155/2019/5164298

47. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65(6):1331-1340. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315

48. Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, et al. Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut. *Circ Res*. 2017;120(2):312-323. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309006

49. Adnan S, Nelson JW, Ajami NJ, et al. Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. *Physiol Genomics*. 2017;49(2):96-104. doi:10.1152/physiolgenomics.00081.2016

50. Silveira-Nunes G, Durso DF, Jr LRA de O, et al. Hypertension is associated with intestinal microbiota dysbiosis and inflammation in a Brazilian population. *Front Pharmacol*. 2020;11. doi:10.3389/fphar.2020.00258

51. Palmu J, Salosensaari A, Havulinna AS, et al. Association between the gut microbiota and blood pressure in a population cohort of 6953 individuals. *J Am Heart Assoc*. 2020;9(15). doi:10.1161/JAHA.120.016641

52. Barba M, Czosnek H, Hadidi A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*. 2013;6(1):106-136. doi:10.3390/v6010106

53. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding

16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4799-4807. doi:10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999

54. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449(7164):804-810. doi:10.1038/nature06244

55. Illumina. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2015;(illumina):1-16. Recuperado el 21 de junio de 2021; de: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf

56. Ram JL, Karim AS, Sendler ED, Kato I. Strategy for microbiome analysis using 16S rRNA gene sequence analysis on the Illumina sequencing platform. 2011;57(3):162-170. doi:10.3109/19396368.2011.555598

57. Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, et al. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science.* 2005;310(5749):827-834. doi:10.1126/science.1117230

58. Jay ZJ, Inskeep WP. The distribution, diversity, and importance of 16S rRNA gene introns in the order Thermoproteales. *Biol Direct.* 2015;10(1):1-10. doi:10.1186/S13062-015-0065-6/COMMENTS

59. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):840-862. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

60. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007;69(2):330-339.

doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005

61. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 2016;17(1):1-8. doi:10.1186/s12859-016-0992-y

62. Durazzi F, Sala C, Castellani G, Manfreda G, Remondini D, De Cesare A. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Sci Rep*. 2021;11(1):3030. doi:10.1038/s41598-021-82726-y

63. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-583. doi:10.1038/nmeth.3869

64. Xu C, Zhu H, Qiu P. Correction to: Aging progression of human gut microbiota. *BMC Microbiol*. 2021;21(1). doi:10.1186/S12866-021-02200-7

65. Badal VD, Vaccariello ED, Murray ER, et al. The Gut Microbiome, Aging, and Longevity: A Systematic Review. *Nutr*. 2020;12(12):3759. doi:10.3390/NU12123759

66. Tanaka M. Improving obesity and blood pressure. *Hypertens Res*. 2020;43(2):79-89. doi:10.1038/s41440-019-0348-x

67. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;294(1):1-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x

68. Li J, Zhao F, Wang Y, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017;5(1):1-19. doi:10.1186/s40168-016-0222-x

Anexos:

1) Dictamen de aceptación del protocolo



COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

OFICIO NO. FMEDI/CURGG/047/2019

ASUNTO: Registro Proyecto FM/DI/030/SR/2019

Dra. María Magdalena Aguirre García
Profesor Titular "B" T. C.
División de Investigación
Presente.

Estimada doctora Aguirre García:

Me complace informarle que su proyecto FM/DI/030/SR/2019 de título "Impacto de las dietas DASH y cetogénica en la microbiota oral e intestinal y su correlación con el control de la presión arterial sistémica en jóvenes obesos hipertensos" ha sido **REGISTRADO** por las Comisiones de Investigación y de Ética en sesión ordinaria de fecha **02 de abril de 2019** teniendo como base el dictamen APROBATORIO INACAR-DG-DI-CI-333-2018 emitido por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología, con una vigencia de 3 años a partir de la fecha de la sesión.

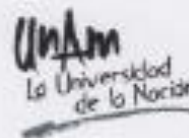
Para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual, en la División de Investigación de esta Facultad, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen. Asimismo, le solicitamos atentamente nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 04 de abril de 2019.

LA SECRETARIA TÉCNICA

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
RGG/ET



Comité de Investigación de la Facultad de Medicina-UNAM, con fecha 01 de Junio de 2015, se expide Registro COFEPRIS
Número: 15 CI 09 003 021

2) Consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
PROPUESTA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
IGNACIO CHÁVEZ



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

IMPACTO DE LAS DIETAS DASH Y CETOGÉNICA EN LA MICROBIOTA ORAL E INTESTINAL Y SU CORRELACIÓN CON EL CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTEMICA EN JOVENES OBESOS HIPERTENSOS.

Actualmente en el Instituto Nacional de Cardiología (INCIICH) se está llevando a cabo un estudio de investigación que tiene como objetivo conocer los cambios en la microbiota intestinal con 2 tipos de dieta distintos y un grupo sin dieta que será un grupo control. La intención es identificar cual es el tipo de dieta más efectivo para controlar la presión arterial y si además ayuda a disminuir de peso y los marcadores de inflamación. La microbiota intestinal y oral son el grupo de bacterias que habitan normalmente en nuestro cuerpo, pero en algunas ocasiones cambian por bacterias dañinas que aparentemente no nos dan ningún síntoma pero que contribuyen a enfermedades como obesidad, hipertensión arterial, cáncer etc. Este proyecto está registrado ante el Comité de Investigación del INC con el número:

Se me ha explicado que mi participación en este estudio consiste en:

- 1) Participar activamente y con real compromiso con las indicaciones de dieta que se me indiquen, las cuales serán especialmente calculadas según me corresponda de acuerdo a al azar.
- 2) Se me tomarán muestras de sangre para mejor control de mis factores de riesgo y mejoría de mi metabolismo, para evaluar que el tratamiento de la presión no me esté causando daño y para ver como está la inflamación en mi sangre.
- 3) Serán un total de 10 visitas en el estudio, en un total de 178 días, tiempo durante el cual se me controlara mi presión y factores de riesgo. Tendré que acudir en ayuno a cada visita.
- 4) Al inicio y al final del estudio tendré que traer de mi casa una muestra pequeña de heces para saber cuáles son las bacterias que habitan mi intestino y si estas cambiaron con la dieta.
- 5) Se me tomara una muestra de la boca que no me va a causar dolor ni ninguna lesión, para saber que bacterias habitan en mi boca al inicio y al final del estudio.
- 5) Acudiré a revisión en cada visita además de ajuste de tratamiento de la presión, me realizaran un recordatorio alimentario, corporales con cinta métrica en cintura y cadera y mediante una báscula especial verán cuanto musculo tiene mi cuerpo y cuanto grasa y agua tiene.

Todas las pruebas anteriormente mencionadas serán realizadas por personal capacitado del Instituto, cardiólogos especialistas, nutriólogos y odontólogos.

Se me ha explicado que mi participación en este estudio no conlleva ningún riesgo para mi salud, yo debo de tomar antihipertensivos independientemente de participar o no en este estudio. Los estudios de mediciones especiales (Inflamación, electrocardiograma, microbiota), serán cubiertos por el Instituto, el resto de los estudios forman parte del seguimiento convencional de mi Hipertensión. Mi participación implica que se me abra expediente en el Instituto Nacional de Cardiología con fines de investigación. Al finalizar el protocolo y si no hay otra indicación se me referirá a hospital de segundo nivel con todas mis indicaciones para continuar mi seguimiento.

Se me ha explicado que mi participación en este estudio es anónima y voluntaria y que tengo el derecho de retirarme del estudio si así lo deseara.

Para cualquier duda o aclaración que tenga puedo dirigirme con el Dra. Nydia Ávila Varzzini, Médico Adscrito de la consulta externa al teléfono 55732911 extensión .

Con fecha _____ declaro que de manera libre acepto participar en el estudio estipulado en esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del participante _____

Dirección y teléfono _____

Nombre y firma del Investigador principal: Nydia Ávila-Varzzini

Dirección y teléfono Juan Badiano No. 1 Sección XVI delegación Tlalpan CP 14080.

Nombre y firma de testigo _____

Dirección y teléfono _____

Nombre y firma de testigo _____