



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON LA
DIETA, LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y MARCADORES
BIOQUÍMICOS EN NIÑOS ESCOLARES**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M.N.H. Tania Aguilar López

Dirigida por:

Dra. Olga Patricia García Obregón

Querétaro, Qro. a Marzo 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON LA DIETA, LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y MARCADORES BIOQUÍMICOS EN NIÑOS ESCOLARES

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M.N.H. Tania Aguilar López

Dirigida por:

Dra. Olga Patricia García Obregón

Sinodales

Dra. Olga Patricia García Obregón
Presidente

Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Secretario

Firma

Dra Andrea Margarita Olvera Ramírez
Vocal

Firma

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
Suplente

Firma

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Suplente

Firma

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Marzo 2021
México

“Todas las enfermedades inician en el intestino”

Hipócrates



Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

A Emilia y Luisa

A quien me hizo amar las ciencias...

Mi papá

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a los profesores que formaron parte de mi comité. A la doctor Gerardo por su paciencia, a la doctora Andrea por sus consejos, al doctor Jorge Luis por su experiencia, a la doctora Karina por su ayuda y desde luego a la doctora Olga por siempre darme el apoyo que necesité en los momentos más complicados de este proyecto.

Agradezco de manera muy especial a Mariela Camacho y a Susana Sosa quienes me brindaron toda su paciencia y conocimiento durante la estandarización de las técnicas de laboratorio. A Karen Torres, Paulina Estrella y Gabriela Curiel quienes me asistieron en el laboratorio. A Ricardo Ahumada por siempre estar dispuesto a ayudar y por supuesto a Maricarmen Caamaño, por toda su ayuda y experiencia para la realización de los análisis estadísticos.

A mis alumnos de maestría Luis Reyes y Heidi Cederborg que aprendieron de mis errores y me dieron la confianza para seguir investigando la microbiota. Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido para la realización de mis estudios de doctorado.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	15
2.1 LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	15
2.1.1. Definición de microbiota.....	15
2.1.2. Adquisición de la microbiota	16
2.2. ESTRUCTURA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	18
2.2.1. Composición de la microbiota intestinal.....	18
2.2.2. Métodos de estudio de la microbiota	21
2.2.3. Funciones de la microbiota intestinal.....	23
2.3. INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA MICROBIOTA	30
2.3.1. La leche materna y su influencia en la microbiota	30
2.3.2. Influencia de la alimentación complementaria en la microbiota.....	31
2.3.3. Asociación entre componentes de la dieta y la microbiota	31
2.3.4. Efecto de diferentes tipos de dietas sobre la microbiota.....	34
2.3.5. Enterotipos	36
2.4. MICROBIOTA Y OBESIDAD.....	38
2.4.1. Panorama general de la obesidad	38
2.4.2. Estudios en animales.....	38
2.4.3. Estudios en humanos.....	40
2.4.4. Inflamación crónica	43
III. JUSTIFICACIÓN	45
IV. HIPÓTESIS	46
V. OBJETIVOS	47
VI. METODOLOGÍA	48
6.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48
6.2. CUESTIONARIOS.....	48
6.3. ANÁLISIS DE LA DIETA	49
6.4. EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA.....	49
6.5. COMPOSICIÓN CORPORAL.....	50
6.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	50
6.7. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA	51
6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
VII. RESULTADOS	55
7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN	55
7.2. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	55
7.4. COMPOSICIÓN DE LA DIETA.....	57
7.5. ASOCIACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y LA DIETA	58
7.4. ASOCIACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y LA COMPOSICIÓN CORPORAL	60
7.5. ASOCIACIÓN ENTRE LAS FAMILIAS BACTERIANAS Y FACTORES DE RIESGO METABÓLICO.....	61
7.6. DIFERENCIAS EN LA MICROBIOTA DE ACUERDO A CATEGORÍAS DE RIESGO METABÓLICO.....	61
VIII. DISCUSIÓN	63
IX. CONCLUSIÓN	69
XI. BIBLIOGRAFÍA	70

XII. ANEXOS 95

12.1 Carta de aprobación de Comité de Bioética	96
12.2. Carta de consentimiento informado	97
12.3. Historia clínica	99
12.4. Cuestionario Socio-Económico	103
12.5. Cuestionario de Seguridad Alimentaria	106
12.6. Frecuencia de alimentos	108
12.7. Recordatorio de 24 horas	113
12.8. Protocolo de extracción de ADN	114
12.9. Protocolo RPOB	115
12.10. Protocolo Familias	116
12.11. Curvas: amplificación, estandar y disociación.....	117
12.12. Eficiencia de las reacciones de qPCR.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microhábitats de tracto gastrointestinal del humano.....	20
Figura 2. Visión general de las dos estrategias de secuenciación. 22	22
Figura 3. Comparación de abundancias relativas y absolutas de la microbiota	23
Figura 4. Hidrólisis de carbohidratos por la microbiota. 24	24
Figura 5. Interconexión entre AGCC colónicos y diversos órganos periféricos. 25	25
Figura 6. Mecanismos inmunes que limitan la interacción de microorganismos con el epitelio intestinal	30
Figura 7. Impacto de la proteína animal y vegetal sobre la microbiota intestinal y sus metabolitos	32
Figura 8. Impacto de diferentes tipos de grasa sobre la composición y las funciones de la microbiota intestinal.....	33
Figura 9. Distribución de las principales familias bacterianas entre cada uno de los 93 participantes.....	57
Figura 10. Abundancia de las familias bacterianas de acuerdo entre las variables antropométricas y bioquímicas.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers utilizados para la medición de la abundancia de las familias bacterianas en heces de niños escolares	52
Tabla 2. Preparación de la reacción de 12µl utilizada en los ensayos de PCR.	52
Tabla 3. Protocolo de qPCR utilizado por 35 ciclos	53
Tabla 4. Principales características de los niños escolares estudiados	56
Tabla 5. Características de la dieta de los niños escolares	58
Tabla 6. Modelo lineal de la relación entre la dieta y la abundancia de las familias bacterianas.....	59
Tabla 7. Modelo lineal de la relación entre las variables antropométricas y los marcadores bioquímicos de acuerdo a cada familia bacteriana.....	60

ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonilglicerol
AEA: N-araquidonoiletanolamina
AGCC: Ácidos grasos de cadena corta
AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados
AOS: Arabiligosacáridos
BPP: Bacteroidaceae-Prophyromonadaceae-Prevotallaceae
CB1: Receptor endocanabinoide 1
chREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
CRP: Proteína C reactiva
DHA: Ácido docosahexaenoico
ECC: Enterococcaceae
FIAF: Factor adiposo inducido por ayuno
FOS: Fructooligosacáridos
FXR: Receptor X farnesoide
GLP-1: Proteína similar al glucagon 1
GOS: Galactooligosacáridos
GRP: Receptor acoplado a proteínas G
IGF-1: Factor similar a la hormona de crecimiento 1
IL-10: Interleucina 10
IL-6: Interleucina 6
LAC: Lactobacillaceae
LPL: Lipoproteína lipasa
LPS: Lipopolisacárido
LRC: Lachnospiraceae-Ruminococaceae
MUC2: Mucina
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PYY: Péptido tirosina-tirosina
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
sIgA: Inmunoglobulina A secretora
TMA: Trimetilamina
TMAO: N-óxido trimetilamina
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa
TRL: Receptor tipo Toll
XOS: Xilulooligosacáridos

RESUMEN

Las diferencias en la composición de la microbiota se han asociado con patrones dietéticos, obesidad y alteraciones metabólicas en niños. El objetivo de este estudio fue analizar la abundancia de las principales familias bacterianas del intestino entre los niños según su dieta, composición corporal y marcadores metabólicos. Se realizó un estudio transversal con 93 niños en edad escolar (8.4 – 1.6 años). La dieta se evaluó mediante un cuestionario de frecuencia alimentaria y recordatorios de 24 h. Se midieron variables antropométricas y de composición corporal y se tomó una muestra de sangre para determinar glucosa, insulina, perfil lipídico, proteína C reactiva, leptina y citocinas [interleucina 6, interleucina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral α (TNF α)]. Se extrajo ADN de muestras de heces y se determinó la abundancia de familias bacterianas: Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae (BPP), Lactobacillaceae (LAC), Enterococcaceae (ECC) y Lachnospiraceae-Ruminococcaceae (LRC) mediante qPCR. El consumo de fibra se asoció con menor abundancia de BPP en niños con peso normal y el magnesio se asoció positivamente con este grupo. La ingesta de calcio y riboflavina se asoció positivamente con la familia ECC y el consumo de azúcar se asoció negativamente con esta familia. En niños con sobrepeso/obesidad, la vitamina A y los alimentos de origen animal se asociaron con una mayor abundancia de BPP. La ingesta de energía, carbohidratos y lípidos se asoció negativamente con la ECC. En niños con sobrepeso/obesidad, la ingesta de fibra y legumbres mostró una asociación positiva con la abundancia de LRC. Los niños con obesidad y una relación cintura/estatura mayor tenían menor BPP y mayor LAC en comparación con los niños de peso normal. El TNF α se asoció negativamente y la IL-10 se asoció positivamente con BPP. Los triglicéridos mostraron una relación positiva con LRC y el colesterol HDL se asoció negativamente con LAC. En conclusión, en niños escolares de una zona rural de México la ingesta de energía, azúcar, grasa, fibra, legumbres, productos animales y lácteos se relaciona de manera diferente con la abundancia de las principales familias bacterianas. Mientras que una baja abundancia de BPP y una mayor abundancia de LAC se asocia con obesidad y alteraciones metabólicas.

Palabras clave: *microbiota, obesidad, familias bacterianas, metabolismo.*

ABSTRACT

Differences in gut microbiota composition have been associated to dietary patterns, obesity and metabolic alterations in children. The aim of this study was to analyze the abundance of the main bacterial families of the gut among children according to their diet, body composition and metabolic markers. A cross-sectional study was conducted with 93 school-aged children (8.4 – 11.6 years old). Diet was evaluated using a food frequency questionnaire and 24h recalls. Anthropometric and body composition variables were measured and a blood sample was collected to determine glucose, insulin, lipid profile, C-reactive protein, leptin, and cytokines [interleukin 6, interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor α (TNF α)]. DNA was extracted from stool samples and the abundance of bacterial families: Bacteroidaceae–Porphyromonadaceae–Prevotellaceae (BPP), Lactobacillaceae (LAC), Enterococcaceae (ECC), and Lachnospiraceae–Ruminococcaceae (LRC) was determined by qPCR assays. Fiber consumption was associated with a lower abundance of BPP in children with normal weight, while magnesium was positively associated with this group. In normal-weight children, calcium and riboflavin intake were positively associated with ECC, while sugar consumption was negatively associated with this family. In overweight/obese children, vitamin A and animal food products were associated with a higher abundance of BPP. Also energy, carbohydrate, and lipid intake were negatively associated with ECC. In overweight /obese children, fiber and legume intake showed a positive association with the abundance of LRC. Children with obesity and high waist/height ratio had lower BPP and higher abundance of LAC when compared with normal-weight children. TNF α was negatively associated and IL-10 was positively associated with BPP. Triglycerides showed a positive relationship with LRC whereas high-density lipoprotein-cholesterol was negatively associated with LAC. Conclusion: in rural Mexican school-aged children, intake of energy, sugar fat, fiber, legumes, animal and dairy products relate differently to the abundance of the main bacterial families of the gut microbiota, also a low abundance of BPP and a high abundance of LAC are associated with obesity and metabolic disturbances.

Key words: *microbiota, obesity, bacterial families, metabolism.*

INTRODUCCIÓN

México tiene una de las tasas más altas de obesidad infantil. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, existe una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 33,2% entre los niños en edad escolar (Instituto Nacional de Salud Pública, 2016). La obesidad es una enfermedad multifactorial y muchos estudios han observado que la microbiota intestinal puede ser un factor crucial en el desarrollo de la obesidad (López-Contreras et al., 2017; Riva et al., 2017; Tilg & Kaser, 2011).

Durante los últimos 15 años, los estudios se han centrado en identificar la microbiota en diferentes niveles taxonómicos, caracterizando las especies o comunidades que podrían estar jugando un papel en la aparición de la obesidad. Una mayor abundancia de Firmicutes y una menor abundancia de Bacteroidetes han sido asociados con la obesidad en adultos, adolescentes y niños (Bervoets et al., 2013; Ferrer et al., 2013; Ley et al., 2005).

La relación Firmicutes / Bacteroidetes se ha utilizado en una variedad de estudios como un nuevo biomarcador de alteraciones metabólicas; sin embargo, los resultados no son consistentes (Armougom et al., 2009; Duncan et al., 2008; Finucane et al., 2014; Payne et al., 2011; Sze & Schloss, 2016; Peter J. Turnbaugh et al., 2009; P. Xu et al., 2012). Por lo que el estudio a niveles taxonómicos menos generales, por ejemplo a nivel de familia o género, podría ser de gran ayuda para establecer asociaciones más concretas

Los estudios en niños mexicanos con obesidad han mostrado una menor abundancia de las familias bacterianas Christensenellaceae (López-Contreras et al., 2017), Lactobacillaceae (Nirmalkar et al., 2018), Bacteroidaceae (Maya-Lucas et al., 2019), y mayor abundancia de Peptoestreptococcaceae, Coriobacteriaceae, (Nirmalkar et al., 2018), Prevotellaceae (Maya-Lucas et al., 2019) y Lachnospiraceae (Murugesan et al., 2015).

En cuanto a la dieta, diversos estudios internacionales han mostrado una asociación entre las diferentes dietas (vegana, omnívora, mediterránea) y la presencia de grupos bacterianos específicos como *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus* (Tomova et al., 2019). El consumo de fibra, verduras y frutas se ha asociado a mejores perfiles bacterianos. Mientras que características más puntuales como la cantidad de grasa saturada y de proteína de origen animal, ha mostrado asociarse con perfiles inflamatorios y la producción de metabolitos que comprometen la barrera intestinal e incluso tienen efectos sistémicos (Bailey & Holscher, 2018; Cani et al., 2008).

La secuenciación del gen ARNr 16s obtenido de muestras fecales ha revelado que hay al menos siete familias de bacterias que son representativas del intestino humano. Dentro del filo Bacteroidetes, hay una mayor abundancia de Bacteroidaceae, Prevotellaceae y Por-phyromonadaceae, y entre el filo Firmicutes, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Lactobacillaceae y Enterococcaceae son las comunidades más predominantes (Lloyd-Price et al., 2016; Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014)18,19. todas las bacterias que se encuentran en el intestino humano pueden clasificarse dentro de estas siete familias (Nava et al., 2011a),

Con base en estas observaciones, el propósito de este estudio fue analizar la abundancia de las principales familias bacterianas en el intestino de los niños en edad escolar según su dieta, composición corporal y marcadores metabólicos utilizando primers validados para qPCR como un método sensible para analizar diferencias en la estructura de la microbiota.

II.

ANTECEDENTES

2.1 LA MICROBIOTA INTESTINAL

2.1.1. Definición de microbiota

El ser humano es un superorganismo en el que habitan miles de millones de microorganismos de los tres dominios de la vida: bacteria, arquea y eucaria (Nava & Stappenbeck, 2011). A esta relación armónica entre hospedero y sus simbioses se denomina "holobionte" (Adak & Khan, 2019). Los análisis del gen 16S rRNA derivados de biopsias, contenido luminal y heces han mostrado que los humanos poseemos cientos de especies diferentes que pueden ser clasificadas dentro de cuatro *phylum* bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria (Nava et al., 2011a). La relación que existe entre estas bacterias y el hospedero humano se ha descrito frecuentemente como comensal, aunque algunos autores refieren que es más bien una relación mutualista (Ley, Peterson, et al., 2006). A lo largo de miles de años, los seres humanos se han asociado a una diversidad de comunidades complejas de microorganismos, resultado de un proceso de coevolución entre las comunidades de microbianas y el hospedero (Doré & Corthier, 2010; Ley et al., 2005). Se ha hecho hincapié en la importancia de tener una visión ecológica más amplia en la relación del humano con los microorganismos. Desde este punto de vista, los humanos somos una amalgama de células tanto microbianas como humanas, donde la sobrevivencia de ambos es interdependiente (Ley, Turnbaugh, et al., 2006).

El término microbiota, se refiere a la colección de microorganismos presentes en un entorno definido, las bacterias son los organismos más estudiados de este conjunto. El cuerpo humano alberga múltiples microbiotas asociadas a superficies externas e internas como la piel, el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, el tracto respiratorio, el tracto genitourinario y la conjuntiva (Sender et al., 2016). Sin embargo, la mayor parte de la microbiota humana reside en el colon, donde su densidad se estima entre 10^{11} a 10^{12} células por mililitro, lo que representa uno de los hábitats microbianos más densamente poblados (Ley, Turnbaugh, et al., 2006). A pesar de que en la literatura, la mayoría de las declaraciones se inclinan hacia que la microbiota que habita en el organismo es diez veces más abundante que las células somáticas humanas, se ha reconocido que este número está subestimado, por lo que una razón de 1:1 es mucho más probable (Sender et al., 2016). En cuanto al microbioma, éste se reconoce como el conjunto de genes de los microorganismos que habitan un entorno definido, aunque una definición más general afirma que es “el hábitat entero, incluidos los microorganismos, sus genes y las condiciones ambientales exteriores” (Gut Microbiota for Health, 2020).

La microbiota intestinal humana está compuesta por microorganismos comensales residentes y transitorios (Nava & Stappenbeck, 2011). En este contexto, solo un número relativamente pequeño de patógenos oportunistas se consideran miembros de la microbiota intestinal y solo se convierten en una amenaza para la salud del hospedero, cuando se altera el ecosistema intestinal (Milani et al., 2017). La composición de la microbiota gastrointestinal puede verse afectada por una serie de factores ambientales, como el pH, los niveles de oxígeno, el estado redox, la disponibilidad de nutrimentos, la actividad del agua y la temperatura, lo que permite que una diversidad de poblaciones prospere y ejerzan diferentes funciones (Milani et al., 2017).

2.1.2. Adquisición de la microbiota

El primer paso en el entendimiento de la ecología microbiana humana es la caracterización de las primeras poblaciones bacterianas que se establecen en el neonato. La colonización del tracto gastrointestinal del bebé se establece durante los primeros días de vida y está dada principalmente por los microorganismos provenientes de la madre y del ambiente que lo rodea (Penders et al., 2007).

Microbiota materna: El embarazo produce una serie de cambios a nivel hormonal, inmunológico y metabólico (Koren et al., 2012). Recientemente se ha

identificado que durante el embarazo también hay cambios en la microbiota vaginal de la madre, los cuales son de particular relevancia dada su responsabilidad en la transmisión vertical de microorganismos durante el nacimiento (Mueller, Bakacs, Combellick, Grigoryan, & Dominguez-Bello, 2015a). La vagina es un ecosistema dominado por relativamente pocas especies bacterianas y los *Lactobacillus* constituyen más del 50% de estas (Ravel et al., 2011). Un aumento en la abundancia de este género bacteriano durante el curso de la gestación, ayuda a mantener un pH bajo mediante la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que ayudan limitando la diversidad bacteriana. De esta manera, se previene la proliferación de patógenos y se evita el ascenso de bacterias al útero que podrían infectar el líquido amniótico, la placenta y el feto (Mueller et al., 2015; Romero et al., 2014)

Colonización bacteriana del neonato: Al nacer, el bebé pasa a través del canal vaginal, el cual está densamente poblado por microorganismos. A pesar de que estudios han encontrado que existe presencia de bacterias en la placenta y el meconio (Aagaard et al., 2014), aun no se sabe si estas bacterias permanecen viables, si su presencia en el líquido amniótico es un indicador de una infección subclínica o si la detección de las mismas obedece a una contaminación en el momento de la toma de la muestra (Mueller et al., 2015a), de manera que la colonización del feto durante la vida intrauterina aun se discute (Wassenaar & Panigrahi, 2014). Es por esto, que el contacto con la microbiota vaginal durante el nacimiento, sigue considerándose como el primero y más importante inóculo al que se ve sometido el bebé (Dominguez-Bello et al., 2011).

Inmediatamente después del parto vaginal, las poblaciones microbianas del bebé se asemejan mucho a las de la vagina de su madre, con predominio de *Lactobacillus*. Debido a que las bacterias productoras de ácido láctico dominan tanto en la vagina como en la leche de la madre, la floración inicial de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal del bebé no puede considerarse accidental. Los *Lactobacillus* representan una comunidad pionera en humanos, en los que preparan el tracto gastrointestinal para sucesiones microbianas posteriores hasta alcanzar la madurez microbiana (Cho & Blaser, 2012).

Por otra parte, los bebés nacidos por cesárea poseen comunidades bacterianas que se asemejan a las encontradas en la piel, por lo que se pueden encontrar especies de *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*. Adicionalmente, la colonización bacteriana es provista por el ambiente y el personal hospitalario

(Bezirtzoglou, 1997). La falta del primer inóculo materno afecta el desarrollo bacteriano del tracto gastrointestinal del bebé y podría suponer un aumento en la susceptibilidad a ciertos patógenos (Dominguez-Bello et al., 2011). También cabe señalar que los bebés nacidos por cesárea requieren de estar en hospitalización más tiempo y reciben antibióticos más frecuentemente que los bebés que nacen vía vaginal, lo que también determina la composición de su microbiota (Penders et al., 2007). Estas diferencias en el desarrollo de la microbiota podrían tener importantes implicaciones en el desarrollo y la salud en la infancia, como por ejemplo contribuir al riesgo de enfermedades atópicas, alergias y asma (Dominguez-Bello et al., 2011), así como con un aumento en el riesgo de enfermedad celiaca, diabetes tipo 1 y obesidad (Mueller et al., 2015b).

Composición de la microbiota del bebé: Los neonatos tienen una comunidad bacteriana con relativamente pocas especies y linajes (Dominguez-Bello et al., 2011). A pesar de que es muy difícil definir una microbiota intestinal “normal”, el patrón clásico de desarrollo de ésta supone la colonización temprana por parte de anaerobios facultativos tales como *Escherichia coli* y otros tipos de Enterobacteriaceae. Cuando estas bacterias consumen todo el oxígeno disponible dentro de los primeros días, el tracto gastrointestinal se convierte en un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas tales como *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Bactroides* y en menor medida *Ruminococcus* (Matamoros et al., 2013). Conforme pasan los meses, la diversidad aumenta, posiblemente por la incorporación de nuevas bacterias provenientes de exposición al ambiente y también debido al crecimiento del tracto gastrointestinal, el cual provee distintos nichos para una mayor diversidad de bacterias (Dominguez-Bello et al., 2011), de manera que cuando el niño cumple 3 años, su microbiota tiene una composición muy similar a la de un adulto (Matamoros et al., 2013).

2.2. ESTRUCTURA DE LA MICROBIOTA INESTINAL

2.2.1. Composición de la microbiota intestinal

Una vez establecida la microbiota a los 3 años, esta permanece parcialmente estable en el adulto, ya que aproximadamente el 75% de la microbiota intestinal persiste durante al menos 1 año (Faith et al., 2013), mientras que se ha documentado que al menos el 60% de todas las cepas bacterianas dentro de un individuo persistieron

durante 5 años (Dethlefsen & Relman, 2011). Existen varios factores que determinan la composición de la microbiota, entre ellos, la biogeografía de los hábitas bacterianos a lo largo del intestino que influye directamente en la colonización de los principales grupos bacterianos de la microbiota (Donaldson et al., 2016). Variaciones fisiológicas a lo largo del intestino delgado y el colon como los gradientes químicos y de nutrientes, así como la actividad inmunitaria compartimentada del huésped, influyen en la composición de las comunidades bacterianas. Es importante señalar que, la composición de la microbiota se conserva extensamente a niveles taxonómicos altos, pero la variación aumenta a niveles taxonómicos progresivamente más bajos (Cho & Blaser, 2012).

Intestino delgado. Dentro de sus características se encuentran: un ambiente más ácido, niveles de oxígeno más altos y compuestos antimicrobianos más abundantes en comparación con el colon. Por esta razón, el intestino delgado está dominado por anaerobios facultativos de rápido crecimiento que toleran los efectos combinados de los ácidos biliares y los antimicrobianos. Al mismo tiempo compiten eficazmente con el huésped y otras bacterias por los carbohidratos simples provenientes de la dieta. En esta región del intestino, el exceso de ácidos biliares generalmente estimula el crecimiento de Firmicutes e inhibe el crecimiento de Bacteroidetes. En ratones, el intestino delgado alberga gran abundancia de familias bacterianas Enterobacteriaceae y Lactobacillaceae, como se muestra en la **Figura 1** (Donaldson et al., 2016).

Colon. Como se ha mencionado anteriormente, el colon es el sitio anatómico con mayor abundancia de microorganismos. Aquí las bacterias responsables de la degradación de la fibra que resistente a la digestión son más abundantes. Las concentraciones más bajas de antimicrobianos, el tiempo de tránsito más lento y la falta de fuentes de carbono simples facilitan el crecimiento de anaerobios fermentativos, en particular Bacteroidaceae y *Clostridia*. En el ratón, el ciego está abundantemente colonizado por las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae, mientras que en el colon se encuentran las familias Bacteroidaceae y Prevotellaceae como se muestra en la **Figura 1** (Donaldson et al., 2016).

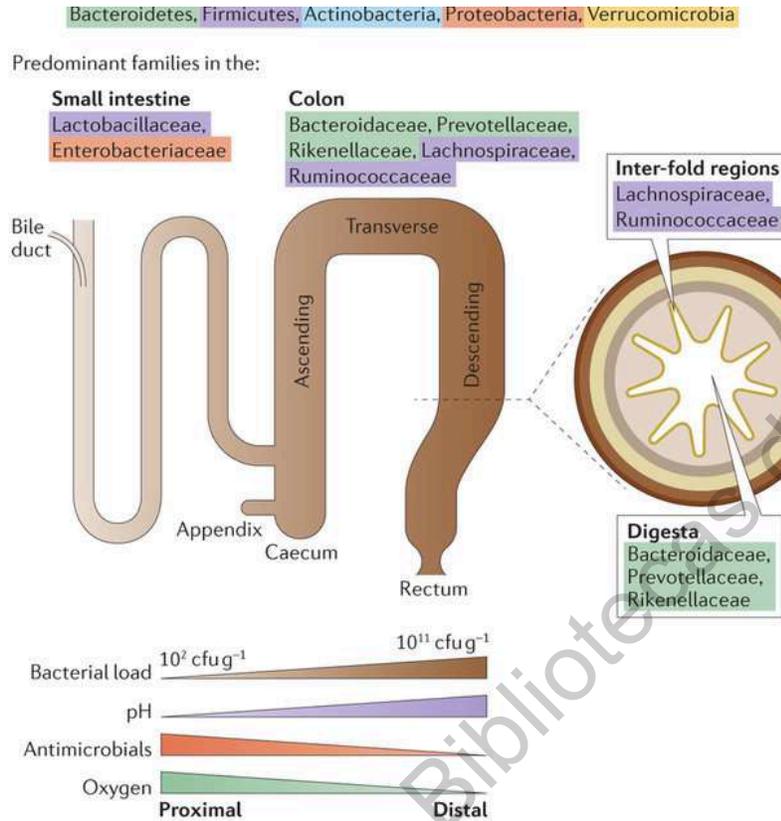


Figura 1. Microhábitats de tracto gastrointestinal del humano. Se muestran las diferencias entre las diferentes porciones del intestino y las poblaciones bacterianas asociadas a la mucosa y las presentes en la digesta (Donaldson et al., 2016).

En el colon, los microorganismos no están distribuidos de manera aleatoria. Toda la pared del colon se pliega sobre sí misma creando compartimentos entre los pliegues los cuales son distintos a los compartimento luminal central (digesta). Estudios sobre organización espacial de la microbiota intestinal señalan la existencia de microbiota autóctona (residente) y microbiota alóctona (transitoria). Se ha propuesto que las bacterias residentes están estrechamente asociados con la mucosa intestinal quizás en asociación con el moco que recubre el epitelio intestinal, mientras que las bacterias transitorias se encuentran en la luz intestinal como parte del flujo fecal (Nava & Stappenbeck, 2011). La microbiota asociada a la mucosa está altamente enriquecida en las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Mientras que en la región de la digesta, se encuentran las familias Bacteroidaceae, Enterococcaceae y Lactobacillaceae como se muestra en la **Figura 1** (Nava et al., 2011b). La secuenciación del gen ARNr 16s obtenido de muestras fecales ha revelado que hay al menos siete familias de bacterias que son representativas del intestino humano. Dentro

los Bacteroidetes: Bacteroidaceae, Prevotellaceae y Porphyromonadaceae, y entre los Firmicutes: Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Lactobacillaceae y Enterococcaceae. El 95% de todas las bacterias del intestino humano pueden clasificarse dentro de estas siete familias (Lloyd-Price et al., 2016; Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014).

2.2.2. Métodos de estudio de la microbiota

En 1881, Robert Koch comenzó a cultivar microorganismos en placas para identificarlos y caracterizar sus propiedades bioquímicas y fisiológicas. Los métodos basados en cultivo limitan mucho el estudio de la microbiota ya que detectan solo entre el 30 y el 50% de las bacterias que habitan en el intestino. Con la llegada de la secuenciación de Sanger en 1970, Carl Woese y sus colaboradores utilizaron al gen 16s rRNA para investigar los taxones bacterianos y su filogenia basándose en secuencias conservadas de la región hipervariable (V1-V9). En los siguientes 30 años, se desarrollaron técnicas moleculares como la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), SSCP (*Single Strand Conformation Polimorphism*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism*) y la PCR cuantitativa (qPCR) las cuales permitieron estudiar la diversidad de la microbiota.

Secuenciación: En 2005, se desarrolló la técnica de secuenciación de alto rendimiento (*high-throughput sequencing technique o next generation sequencing*) (Adak & Khan, 2019) con lo que se logró catalogar 9.8 millones de genes microbianos no redundantes a partir de los datos metagenómicos de 1,267 muestras provenientes de los proyectos MetaHIT (*METAgenomics of the Human Intestinal Tract*) y HMP (*Human Microbiome Project*). Cada muestra constó de 750.000 genes de los cuales 300.000 genes eran similares en más del 50% de los individuos (Li et al., 2014). El Proyecto del Microbioma Humano (HMP) de los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (NIH) ha producido un conjunto de datos metagenómicos de ARN ribosómico 16S de 2.3 terabytes de más de 35 mil millones de lecturas. Estas fueron tomadas de 690 muestras de 300 sujetos de EE. UU., de 15 sitios anatómicos con el fin de caracterizar la microbiota “normal” de humanos sanos (Cho & Blaser, 2012). En los últimos años, la secuenciación de todo el genoma (*Whole Genome Sequencing*) a través de la secuenciación “*shotgun*” ha permitido identificar el metagenoma y confirmar tanto el repertorio de genes filogenéticos como funcionales de la microbiota intestinal. Sin

embargo, una de las limitaciones de los enfoques metagenómicos es que los datos del microbioma no proporcionan información sobre si los genes se expresan o no en un momento dado. Actualmente, se han desarrollado otros enfoques ómicos para contrarrestar estas limitaciones, incluida la secuenciación de todo el conjunto de ARN microbiano, el análisis del contenido proteico general, así como la medición de los metabolitos producidos por los microorganismos (Milani et al., 2017). En la **Figura 2** se muestran las diferencias entre ambas técnicas de secuenciación, la basada en el gen 16s rRNA y la secuenciación del genoma completo.

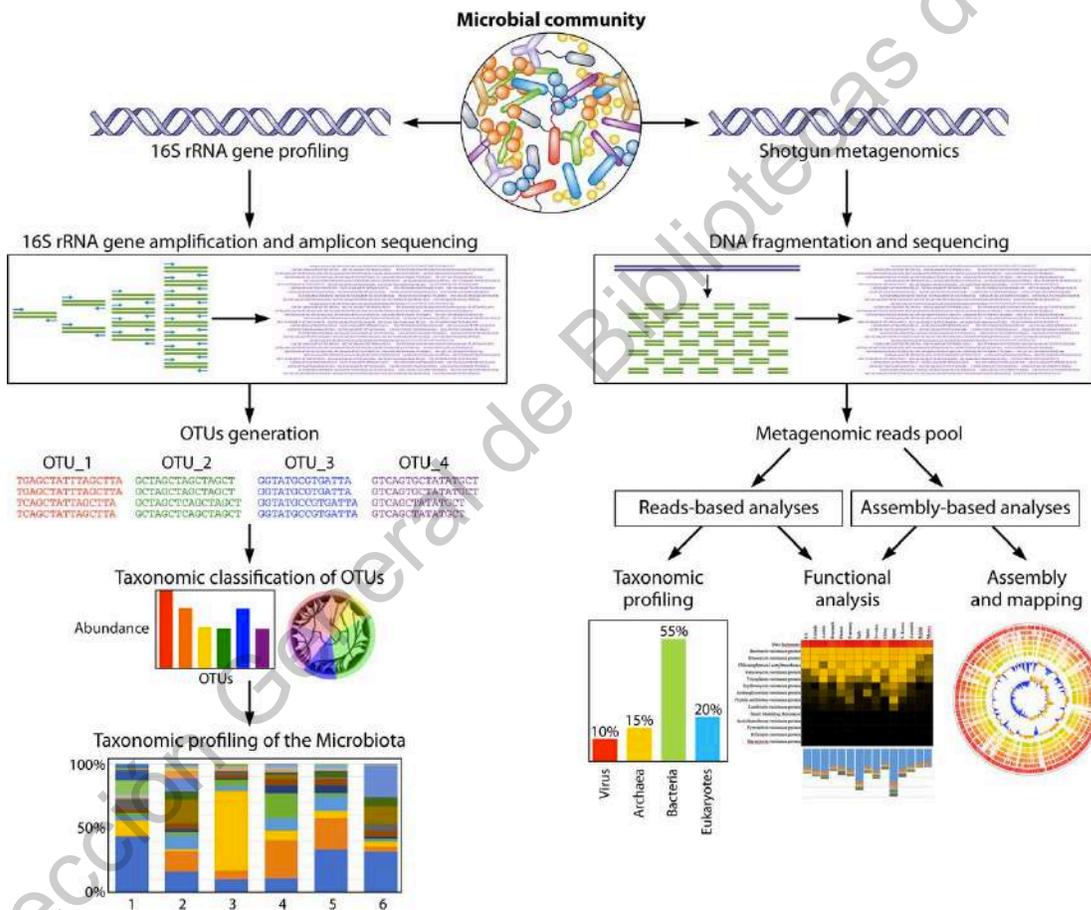


Figura 2: Visión general de las dos estrategias de secuenciación. Ambas técnicas han sido utilizadas para la caracterización de la microbiota intestinal (Milani et al., 2017).

PCR cuantitativa: La qPCR proporciona un método simple y accesible para la elaboración de perfiles cuantitativos de la microbiota. El uso de datos de abundancia relativa en la secuenciación del 16S rRNA puede dar lugar a malas interpretaciones de

la estructura de la comunidad microbiana, ya que el aumento de un taxón conduce a la disminución simultánea de otro (**Figura 3**). Actualmente se recomienda utilizar la qPCR en paralelo con la secuenciación, para de esta manera proporcionar una estimación precisa de la abundancia absoluta de los taxones y obtener una comprensión completa de la dinámica y las interacciones de la microbiota (Jian et al., 2020).

El uso de qPCR para el análisis de la microbiota posee beneficios conceptuales y prácticos: es rentable y accesible, es aplicable a muestras que contienen una cantidad sustancial de ADN del hospedero o no bacteriano y puede emplearse para estudiar comunidades no bacterianas, como hongos . Además, estudios como el de Rinttilä y colaboradores han diseñado y optimizado de un amplio conjunto de primers específicos para grupos y especies dirigidos al 16s rRNA para una cuantificación más precisa de la microbiota intestinal (Rinttilä et al., 2004). Muchos de estos primers han sido utilizados para evaluar cuantitativamente la estructura de la microbiota, así como para evaluar el efecto de tratamientos o el uso de probióticos (Carey et al., 2007)

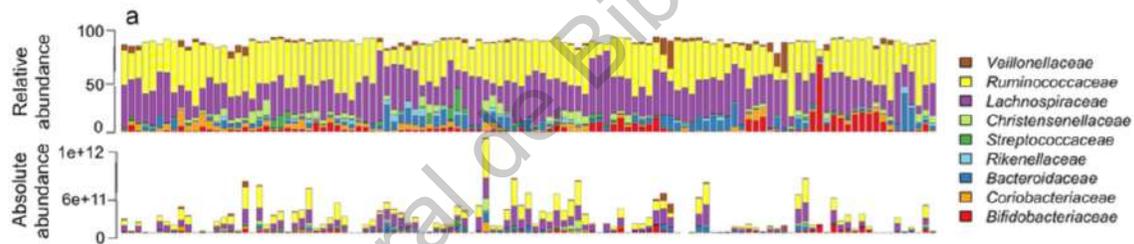


Figura 3. Comparación de abundancias relativas y abundancias absolutas de la microbiota. Se muestran las abundancias estimadas de familias bacterianas dominantes en 114 muestras fecales. El panel superior se muestran las abundancias relativas basadas en la secuenciación de amplicones 16s rRNA y los paneles inferiores muestran las abundancias absolutas estimadas por qPCR (copias del gen 16S por 1 g de heces)(Jian et al., 2020) .

2.2.3. Funciones de la microbiota intestinal

Microbiota fibrolítica: La microbiota intestinal ejerce funciones metabólicas esenciales para la digestión. El tracto gastrointestinal de los seres humanos digiere aproximadamente el 85% de los carbohidratos. En el colon, la microbiota intestinal capta entre el 10 y el 30% de la energía y el resto se excreta en las heces. Las fibras dietéticas que incluyen lignina, polisacáridos sin almidón, almidón resistente (RS) y oligosacáridos como fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS), son resistentes a la digestión por las enzimas digestivas del hospedero. Sin embargo, los

microorganismos intestinales tienen una variedad de enzimas para la utilización de estos diversos carbohidratos (Adak & Khan, 2019).

Los miembros de los *phylum* Bacteroidetes y Firmicutes tienen el mayor conjunto de genes que codifican para la utilización de diferentes polisacáridos como fuentes de carbono. La microbiota intestinal del colon fermenta todas las fibras dietéticas, lo que resulta en liberación de gases (metano, hidrógeno y dióxido de carbono), ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el formiato, acetato, propionato, butirato, valerato, isovalerato y hexanoato, así como pequeñas cantidades de ácidos orgánicos (lactato y succinato) y alcoholes (metanol y etanol). Las principales productoras de AGCC son *Roseburia spp.*, *Eubacterium rectale* y *Faecalibacterium prausnitzii*, todos miembros de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae (Adak & Khan, 2019; Biddle et al., 2013).

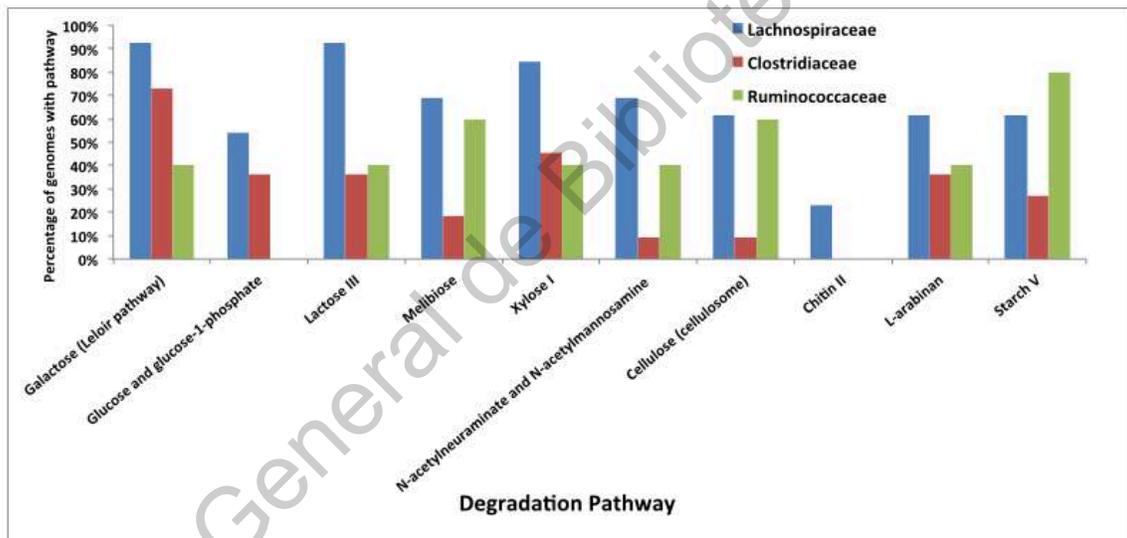


Figura 4: Hidrólisis de carbohidratos por la microbiota. La degradación de diversos tipos de carbohidratos por las familias Lachnospiraceae, Clostridiaceae y Ruminococcaceae (Biddle et al., 2013).

Microbiota con función metabólica: Dentro de los productos de la fermentación de la fibra, los AGCC ejercen funciones metabólicas tanto locales como sistémicas. El acetato, propionato y butirato están presentes en el colon en una proporción aproximada de 3:1:1, respectivamente. La mayor parte del butirato es utilizado por los colonocitos como fuente de energía, aunque también se la relacionado con una reducción del efecto de los metabolitos nocivos de los ácidos biliares y los fenoles.

Luego de su absorción, los AGCC llegan al hígado a través de la vena porta, donde el acetato y el propionato se metabolizan y oxidan parcialmente o se utilizan como sustrato en la gluconeogénesis, la lipogénesis y la biosíntesis del colesterol, mientras el butirato sirve para la producción de cuerpos cetónicos (Adak & Khan, 2019). Una pequeña proporción de AGCC ingresa a la circulación periférica donde se unen receptores acoplados a proteínas G (GPR41 / 43) en diversos tejidos como el adiposo, muscular, hepático y pancreático. Adicionalmente la producción elevada de AGCC colónicos está relacionada con un aumento de la secreción de péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y péptido tirosina-tirosina (PYY) lo que afecta la saciedad y la homeostasis de la glucosa. Se ha observado que los AGCC circulantes, pero no los fecales, están relacionados con las concentraciones de GLP-1, la activación de la lipólisis y el aumento en la sensibilidad a la insulina (Müller et al., 2019). Además, el acetato circulante podría ser llegar al cerebro y regular la saciedad a través de un mecanismo homeostático central. Aún no está claro si los efectos metabólicos se explican principalmente por los efectos directos de los AGCC o indirectamente a través de moléculas de señalización derivadas del intestino (Canfora et al., 2015). La **Figura 5** muestra algunos de los efectos que tienen los AGCC en los tejidos periféricos.

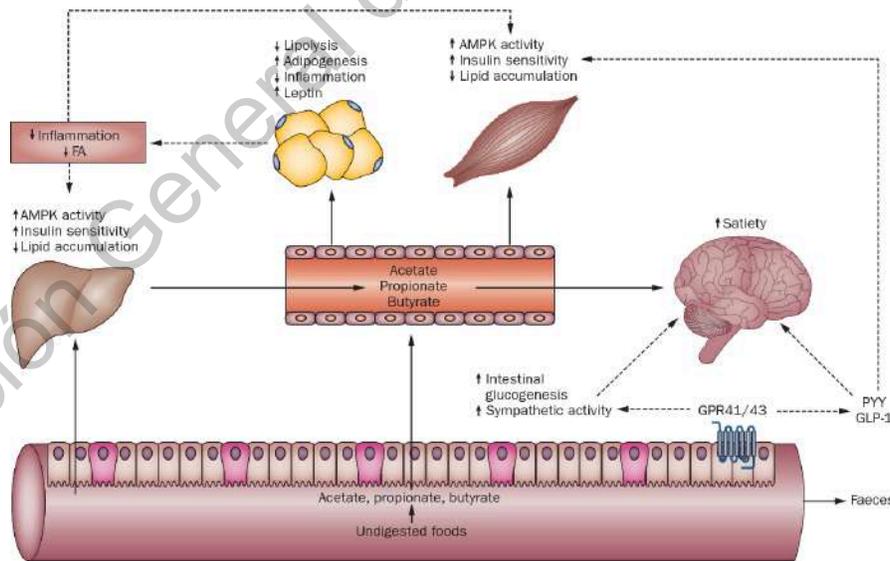


Figura 5. Interconexión entre AGCC colónicos y diversos órganos periféricos. Las líneas continuas indican efectos directos de AGCC y las líneas discontinuas indican efectos indirectos de AGCC (Canfora et al., 2015).

Otra función metabólica importante supone la degradación de proteínas no digeridas que se descomponen en péptidos, aminoácidos y otros metabolitos a través de peptidasas y proteasas bacterianas extracelulares. Los metabolitos resultantes pueden clasificarse en compuestos neuroactivos (óxido nítrico, triptamina y fenetilamina), metabolitos azufrados (sulfuro de hidrógeno), compuestos aromáticos (fenol, p-cresol e indol), poliaminas (espermina, espermidina y cadaverina), AGCC (isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato derivados aminoácidos de cadena ramificada) y amoníaco. Las bacterias fermentadoras de aminoácidos más abundantes del intestino delgado humano son *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* y *Proteobacteria* (Adak & Khan, 2019; Neis et al., 2015).

La microbiota también tiene funciones sobre el metabolismo de las sales biliares y el colesterol. Los ácidos biliares sintetizados en el hígado y conjugados con glicina y taurina para formar sales, se secretan en el duodeno donde facilitan la digestión de los lípidos. También sirven como fuente de excreción de colesterol, así como para prevenir el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (Pereira-Fantini et al., 2014). Las sales biliares conjugadas se reabsorben en un 95% de el íleon distal. Las sales biliares no absorbidas se desconjuga por la acción de una hidrolasa de la microbiota intestinal y para producir ácido desoxicólico, ácido ursodesoxicólico y ácido litocólico. Estos ácidos biliares secundarios se absorben pasivamente en el colon y se transportan de regreso al hígado a través de la circulación enterohepática y el resto se excreta a través de las heces (Adak & Khan, 2019). Las bacterias de los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Clostridium* (Clusters XIVa y XI), *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* y una fracción menor de bacterias aerobias como *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, desconjuga y deshidroxila a las sales biliares lo que las hace menos hidrofóbicas y limita su reabsorción. Los ácidos biliares, al ser excretados deben ser reemplazados y debido a que se requiere de colesterol para su síntesis, este proceso afecta los niveles de colesterol en sangre (Conterno et al., 2011; Kumar et al., 2012). Además, los ácidos biliares tienen efectos antimicrobianos directos sobre las bacterias intestinales, así como efectos indirectos a través de receptor X farnesoide (FXR) el cual induce péptidos antimicrobianos y regula la respuesta inmune (Fiorucci & Distrutti, 2015).

Otra función metabólica asociada a la microbiota es la transformación de colina en trimetilamina (TMA), la cual es convertida en N-óxido trimetilamina (TMAO) por las flavin monooxigenasas del hígado. El TMAO exagera la señalización de la insulina

hepática, la tolerancia a la glucosa, promueve la inflamación del tejido adiposo, la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares. Se ha identificado ocho bacterias intestinales: *C. sporogenes*, *Anaerococcusrogenalis*, *Providencia rettgeri*, *C. asparagiforme*, *C. hathewayi*, *E. fergusonii*, *Proteus penneri* y *Edwardsiella tarda*, como productoras de TMA producto de una dieta rica en colina (Adak & Khan, 2019)..

Microbiota protectora: Uno de los beneficios que ofrece la microbiota al hospedero es la resistencia a la colonización contra patógenos. Las especies bacterianas invasoras no pueden colonizar el intestino porque no pueden desplazar a las especies autóctonas que se han establecido. Se ha teorizado que la capacidad de una especie bacteriana para colonizar el intestino está determinada por su capacidad para utilizar un nutriente limitante específico. Asimismo, para acceder al epitelio, los patógenos deben enfrentarse a la barrera mucosa y al sistema inmunológico. Las bacterias se adhieren al moco y las superficies epiteliales mediante el despliegue de proteínas de la membrana externa, cápsulas, lectinas, adhesinas y fimbrias (también llamadas pili de unión). La microbiota benéfica también se adhieren a regiones particulares del epitelio y de esta manera puede excluir patógenos adherentes al ocupar sitios de unión limitados. Los miembros de la familia Lactobacillaceae se han convertido en sistemas modelo para estudiar la adhesión de los comensales. En particular, se sabe que las proteínas de unión exclusivas de Lactobacillaceae están involucradas tanto en la adherencia como en la agregación. Otros medios de unión para las bacterias comensales involucran mecanismos que se conservan en patógenos, como los pili adhesivos de *Lactobacillus rhamnosus*. También se pueden encontrar mecanismos análogos en especies no relacionadas como *Bifidobacterium bifidum*, que usa pili para unirse a proteínas de la matriz extracelular, contribuyendo así a la agregación bacteriana. De esta forma, que tanto patógenos como comensales emplean las mismas estrategias para la colonización (Donaldson et al., 2016)

Microbiota inmunomoduladora: La microbiota intestinal interactúa directamente con el sistema inmunológico intestinal y sistémico. La primera línea de defensa del sistema inmunológico, incluye al tejido linfóide asociado al intestino (GALT) y las placas de Peyer. En primera instancia un conjunto de mecanismos inmunes limitan el contacto directo de comensales con la superficie de las células epiteliales. Una segunda capa de inmunidad detecta y mata rápidamente las bacterias sin penetrar en el tejido intestinal. Un tercer conjunto de respuestas inmunes localizadas dentro de la

mucosa evita activar el sistema inmunológico sistémico (Adak & Khan, 2019).

Para persistir en el intestino, la microbiota comensal que se asocian íntimamente con el tejido del huésped deben ser toleradas por el sistema inmunológico. La mucosa contiene grandes cantidades de inmunoglobulina A secretora (sIgA) que interactúa con la microbiota. La unión de sIgA a bacterias comensales puede contribuir a la formación de biopelículas en las mucosas que sirven como barrera para la adhesión de patógenos. Además, se cree que la generación de otros anticuerpos por parte del sistema inmune pueden representar una estrategia conservada evolutivamente utilizada por el huésped para detectar especies bacterianas autóctonas. Sin embargo, el sistema inmunológico no está "programado" para discriminar entre varias clases de microorganismos, sino que especies específicas se han adaptado para promover su propia tolerancia inmunológica (Donaldson et al., 2016).

Algunos ejemplos de microorganismos Inmunomoduladores son: *Bacteroides fragilis*, la cual contiene en su cápsula el polisacárido A (PSA) el cual envía señales a través una célula dendrítica para estimular la producción de interleucina-10 (IL-10) por parte de los linfocitos T reguladores (Round & Mazmanian, 2010). De manera similar, los exopolisacáridos de *Bifidobacterium breve* promueven la tolerancia inmunológica al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias y prevenir la respuesta de los linfocitos B (Fanning et al., 2012). Existen además varias señales no específicas que promueven la tolerancia hacia microorganismos beneficiosos. Los AGCC como el butirato, propionato y acetato estimulan el desarrollo de células T reguladoras, por lo que la ganeración de AGCC podría ser una forma más general para que el sistema inmunológico reconozca las bacterias beneficiosas. El moco es otra señal antiinflamatoria inespecífica. Cuando la mucina (MUC2) es captada por células dendríticas, se inhibe la expresión de señales proinflamatorias, lo que aumenta la posibilidad de que los degradadores de mucina autóctonos induzcan la tolerancia del hospedero (Donaldson et al., 2016).

Microbiota muconutritiva: Algunos componentes de la microbiota intestinal mantiene en buenas condiciones la capa de moco que recubre el epitelio intestinal. La capa de moco consiste en glicoproteínas de mucina secretada por las células caliciformes (células Goblet) que generan una capa viscosa similar a un gel en el epitelio intestinal, el cual protege de la unión de microorganismos directamente al epitelio. Esta capa de moco tiene aproximadamente 150 µm de espesor y forma dos

estratos estructuralmente distintos de sialomucinas y sulfomucinas. La mucina sulfatada ácida está próxima al epitelio y es menos degradable por las glucosidasas bacterianas y las proteasas del hospedero. La mucina ácida evita la adherencia directa de los comensales a las células epiteliales del colon. La mucina no solo actúa como barrera, sino que también proporciona una fuente directa de carbohidratos y péptidos para los comensales. Por ejemplo, *Bacteroides thetaiotaomicron* produce múltiples fucosidasas que escinden la fucosa de los glucanos y activan a las células Goblet para estimular la secreción de mucina (Adak & Khan, 2019). Cuando *B. thetaiotaomicron* se asoció con *Faecalibacterium prausnitzii*, un consumidor de acetato y un productor de butirato, los efectos sobre las células Goblet y la glucosilación de la mucina disminuyeron. Estas dos bacterias al ser metabólicamente complementarias, modulan la barrera mucosa intestinal mediante la modificación de las células Goblet y la glucosilación de las mucinas. El equilibrio entre estas dos bacterias comensales es importante para el mantenimiento de la homeostasis epitelial colónica (Wrzosek et al., 2013).

Adicionalmente, otras bacterias como *Akkermansia muciniphila*, una bacteria del filo Verrucomicrobia que degrada las mucinas y utiliza estas como fuente de nitrógeno y carbono, se ha correlacionado inversamente con varios estados de enfermedad como diabetes, obesidad y síndrome metabólico (Geerlings et al., 2018; Y. Xu et al., 2020), mientras que *Lactobacillus reuteri* ha mostrado aumentar el grosor de la capa interna de moco en ratones con colitis. Se ha observado un efecto similar en ratas después de la aplicación de *Bifidobacterium pseudolongum*. Es posible que distintos componentes metabólicos o estructurales de cepas específicas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* también prevengan enfermedades intestinales al modular la función de la capa de moco (Schroeder, 2019).

Por otra parte varios patógenos han desarrollado estrategias específicas para penetrar el moco con el fin de obtener acceso a la superficie de las células epiteliales. Por ejemplo, *Helicobacter pylori* usa ureasa para aumentar el pH en su microambiente inmediato, lo que a su vez reduce la viscosidad del moco permitiendo que el organismo se impulse a través de la capa de moco que recubre la pared del estómago (Hooper & Macpherson, 2010).

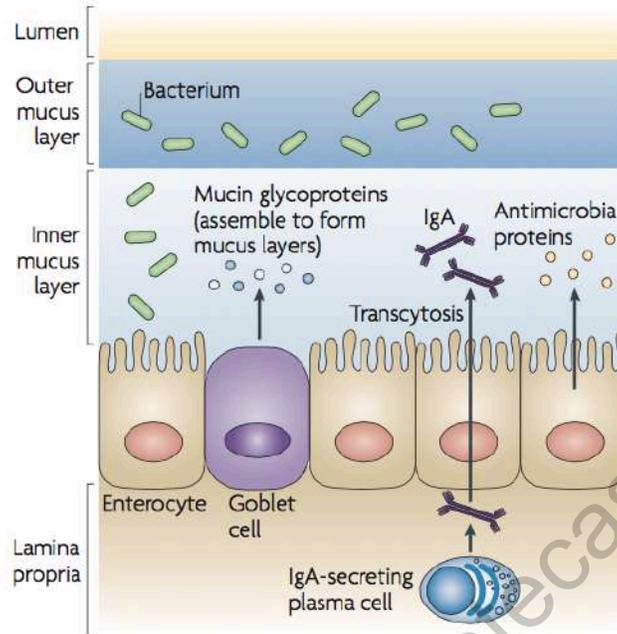


Figura 6. Mecanismos inmunes que limitan la interacción de microorganismos con el epitelio intestinal (Hooper & Macpherson, 2010).

2.3. INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA MICROBIOTA

2.3.1. La leche materna y su influencia en la microbiota

Luego del nacimiento, los bebés tienen múltiples fuentes de exposición a microorganismos. La infancia es un periodo caracterizado por una rápida colonización por grupos de microorganismos que cambian en respuesta a eventos como la enfermedad o cambios en la dieta. Esta plasticidad microbiana provee una adaptación eficiente al cambio en las circunstancias del desarrollo del bebé. La dieta es uno de los factores más importantes que determinan la diversidad microbiana del tracto gastrointestinal (Dominguez-Bello et al., 2011). La leche materna promueve la colonización y maduración de la microbiota intestinal y está dominada por unos cuantos géneros bacterianos (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia* y *Corynebacterium*) (Hunt et al., 2011). Especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* también se encuentran en la leche materna y se transfieren a la microbiota intestinal del neonato (Mueller et al., 2015a). Los bebés alimentados con leche materna tienen una microbiota menos diversa que los alimentados con fórmula (Bezirtzoglou, 1997), sin embargo el origen de estos microorganismos y la compleja dinámica de su transmisión aun no ha sido determinada. Lo que si es más claro es la influencia que tienen los oligosacáridos

prebióticos contenidos en la leche humana, los cuales promueven el crecimiento de comunidades específicas como los pertenecientes al género *Bifidobacterium*, las cuales son importantes para la inhibición de patógenos (Mueller et al., 2015a).

2.3.2. Influencia de la alimentación complementaria en la microbiota

Uno de los últimos acontecimientos importantes en la vida temprana que afecta el desarrollo microbiano es la introducción de alimentos sólidos. Si bien la leche materna mantiene la microbiota con una baja diversidad y predominio de *Bifidobacterium*, la introducción de alimentos sólidos y el cese de la lactancia aumenta las bacterias residentes (Dong & Gupta, 2019). Un estudio realizado con 330 niños de entre 9 y 36 meses de edad mostró que las familias Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Enterococcaceae y Enterobacteriaceae disminuyeron, mientras que Lachnospiraceae, Ruminococcaceae y Bacteroidaceae aumentaron durante el período de introducción de alimentos sólidos (Bergström et al., 2014). Estos cambios asociados al consumo de nuevos alimentos se da principalmente por la necesidad de una comunidad microbiana que este mejor equipada para extraer energía y procesar una dieta que ya no depende de la leche y que evoluciona a una microbiota mucho más similar a la de un adulto.

2.3.3. Asociación entre componentes de la dieta y la microbiota

La estrecha relación entre la dieta, la microbiota intestinal y la salud sugiere que posiblemente podamos mejorar nuestra salud cambiando nuestra dieta. Los estudios que involucran la ingesta de un componente dietético específico demuestran cómo ciertas bacterias tienden a responder a nutrientes determinados. Las proteínas, las grasas, los carbohidratos digeribles y no digeribles, los probióticos y los polifenoles inducen cambios en la microbiota con efectos secundarios sobre los marcadores inmunológicos y metabólicos del hospedero.

Proteínas. Los efectos de la proteína de la dieta sobre la microbiota intestinal se describieron por primera vez en 1977, cuando se encontró que los recuentos de *Bifidobacterium adolescentis* eran más bajos y los de *Bacteroides* y *Clostridia* más altos en sujetos que consumían una dieta alta en carne en comparación con sujetos que consumían una dieta sin carne. La mayoría de los estudios ha observado que el consumo de proteínas se correlaciona positivamente con la diversidad microbiana general (Cotillard et al., 2013; David et al., 2014). Por ejemplo, se ha informado que el

consumo de suero de leche y de un extracto de proteína de chícharo aumenta la abundancia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. También se ha observado que la proteína de chícharo aumenta los niveles intestinales de AGCC, que se consideran antiinflamatorios e importantes para el mantenimiento de la barrera mucosa. Por el contrario, se observó que las bacterias anaerobias tolerantes a la bilis, como *Bacterioides*, *Alistipes* y *Bilophila*, aumentaban con el consumo de proteínas de origen animal (Singh et al., 2017).

Un estudio realizado en niños italianos, que consumían más proteína animal que aquellos de un poblado en África, mostraron mayores abundancias de *Bacterioides*. También se observó que había menor cantidad de AGCC fecales en los niños italianos que consumieron una dieta rica en proteínas (De Filippo et al., 2010). Tras el consumo de proteínas, varios géneros microbianos se han asociado a niveles elevados de N-óxido de trimetilamina (TMAO), un compuesto proaterogénico que aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por otra parte, estudios con ratones han revelado que la ingesta alta de proteínas aumenta los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), los cuales se asocian un mayor riesgo de cáncer, diabetes y mortalidad general (Singh et al., 2017). En la **Figura 7** se muestra el efecto diferencial sobre la microbiota entre el consumo de proteína animal y vegetal.

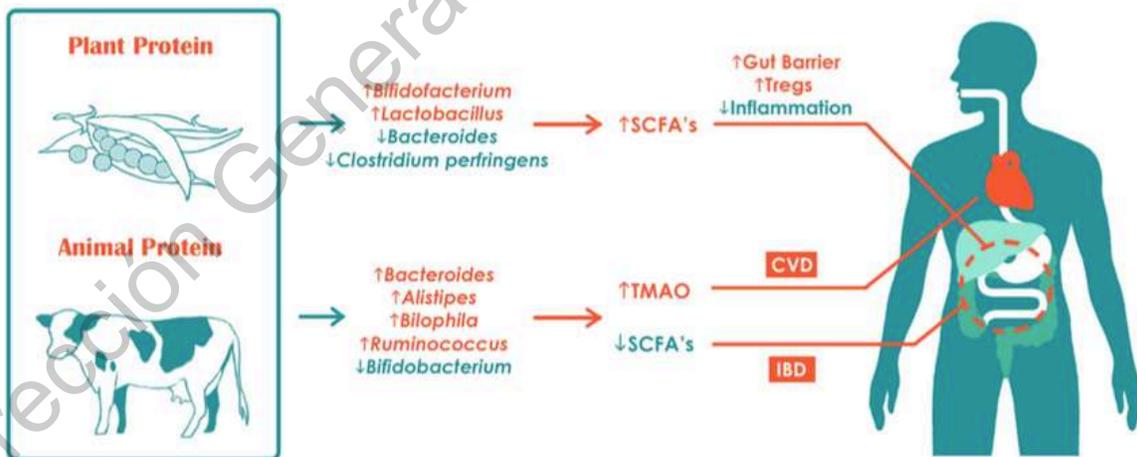


Figura 7. Impacto de la proteína animal y vegetal sobre la microbiota intestinal y sus metabolitos (Singh et al., 2017).

Grasas. La dieta occidental típica es rica en grasas saturadas y trans y baja en grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, por lo que predispone a los consumidores

habituales a muchos problemas de salud. Se han sugerido que una dieta rica en grasas aumenta la microbiota anaeróbica total y los recuentos de *Bacteroides* (Wu et al., 2011). Por otra parte de una dieta baja en grasas condujo a un aumento de la abundancia fecal de *Bifidobacterium* con reducciones concomitantes de la glucosa en ayunas y el colesterol total. Los diferentes tipos de grasas tienen efectos diferentes sobre la microbiota y la función intestinal. Las dietas occidentales, caracterizadas por una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-6: omega-3, suministran altas cantidades de precursores endocannabinoides como el ácido linoleico y el ácido araquidónico que pueden aumentar el tono del sistema endocannabinoide asociado con la obesidad. La suplementación AGPI omega-3 como el ácido docosahexaenoico (DHA) se asocia con la reducción de los niveles de endocannabinoides derivados del ácido araquidónico como N-araquidonoiletanolamina (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG). El sistema endocannabinoide tiene la función de controlar la función de barrera intestinal, la permeabilidad intestinal y la endotoxemia metabólica en condiciones de obesidad y diabetes, esto a través de un mecanismo dependiente del receptor cannabinoide 1 (CB1), ya que los antagonistas de CB1 disminuyen la permeabilidad intestinal y actúan como 'guardianes' manteniendo la integridad intestinal (Patrice D. Cani et al., 2016).

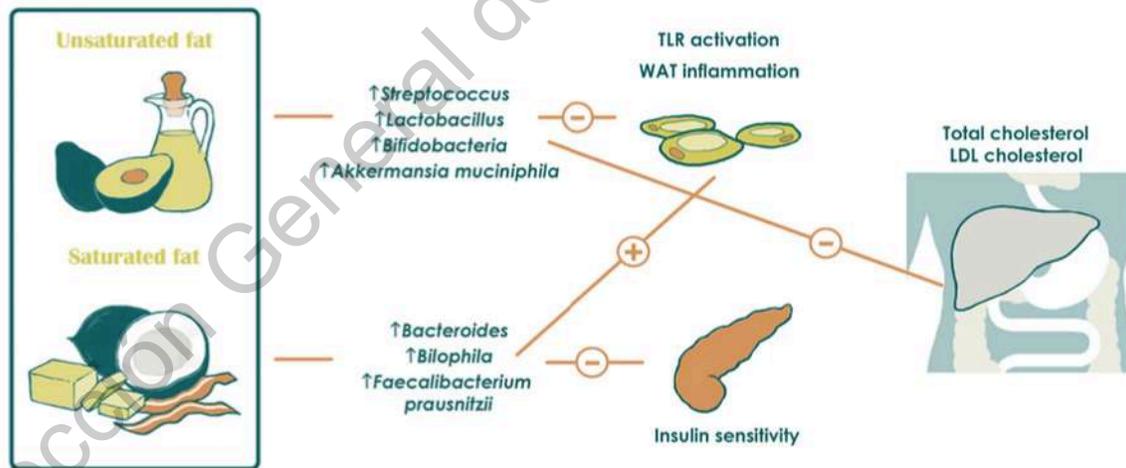


Figura 8. Impacto de diferentes tipos de grasa sobre la composición y las funciones de la microbiota intestinal. (Singh et al., 2017).

Los estudios con ratones también han comparado los efectos diferenciales de varios lípidos en la microflora intestinal. Una comparación entre una dieta alta en grasa basada en manteca de cerdo y otra alta en grasa pero con aceite de pescado reveló

que *Bacteroides* y *Bilophila* aumentaron en ratones alimentados con manteca, mientras que *Bifidobacterium*, bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Streptococcus*) y *Akkermansia muciniphila* aumentaron en ratones alimentados con aceite de pescado (**Figura 8**). Además, los ratones alimentados con manteca de cerdo tenían una mayor activación sistémica del receptor tipo Toll (TLR), mayor inflamación del tejido adiposo blanco y alteración en la sensibilidad a la insulina en comparación con los ratones que consumían aceite de pescado (Caesar et al., 2015).

Carbohidratos. Los carbohidratos son posiblemente el componente dietético mejor estudiado por su capacidad para modificar la microbiota intestinal. Los carbohidratos existen en dos variedades: digeribles y no digeribles. Los sujetos humanos alimentados con altos niveles de glucosa, fructosa y sacarosa presentan mayor abundancia relativa de *Bifidobacterium*, con una reducción de *Bacteroides* (Singh et al., 2017). A diferencia de los carbohidratos digeribles, los carbohidratos no digeribles son fermentados por microorganismos residentes y pueden modificar el entorno intestinal. Esta propiedad de las fibras justifica su designación adicional como prebióticos, que por definición son componentes dietéticos no digeribles que benefician la salud del huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y / o actividad de ciertos microorganismos. Las fuentes de prebióticos incluyen: soya, inulinas, trigo y cebada sin refinar, avena cruda y oligosacáridos no digeribles como fructanos, povidextrosa, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS) y arabinooligosacáridos (AOS). Se ha demostrado que una dieta baja en estas sustancias reduce la abundancia bacteriana total. Con respecto a sus efectos sobre géneros bacterianos específicos, muchos estudios sugieren que una dieta rica en carbohidratos no digeribles aumenta de manera más consistente a *Bifidobacterium* y a bacterias ácido lácticas. Otros carbohidratos no digeribles, como el almidón resistente y la cebada de grano entero, también parecen aumentar la abundancia de *Ruminococcus*, *E. rectale* y *Roseburia*. Además, se ha observado que los prebióticos basados en FOS, povidextrosa y AOS reducen las especies de *Clostridium* y *Enterococcus* (Singh et al., 2017).

2.3.4. Efecto de diferentes tipos de dietas sobre la microbiota

Existen varios patrones de dieta, siendo las más populares la onmívora, la vegetariana, la vegana, la occidental y la mediterránea. Todas estas dietas han mostrado tener efectos moduladores sobre la microbiota intestinal (Wu et al., 2011).

Dieta Occidental. La también llamada dieta estadounidense estándar se caracteriza por un alto contenido de grasas, azúcar, alto consumo de carne roja y procesada, altos niveles de granos refinados y bajo consumo de fibra (Turnbaugh et al., 2009). Muchos estudios han relacionado la dieta occidental a la inflamación, la diabetes, los riesgos cardiovasculares, la obesidad y el síndrome metabólico. En comparación con otras dietas, la microbiota en una dieta occidental se caracteriza por una diversidad microbiana y riqueza de especies significativamente menor. La composición microbiana se caracteriza por una sobreabundancia de Firmicutes y una disminución de Bacteroidetes (Ley et al., 2005). A nivel de género, una dieta occidental muestra una disminución en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, mientras que es abundante en *Enterobacteria* (Singh et al., 2017). La dieta occidental se ha relacionado con un aumento de la endotoxemia derivada del alto consumo de grasas saturadas, lo cual a su vez disminuye la función de la barrera intestinal y aumenta los niveles de lipopolisacáridos en sangre y las señales inflamatorias (Cani, Neyrinck, et al., 2007). También debido al alto consumo de alimentos de origen animal se favorece la generación de metabolitos como el TMAO que aumentan el riesgo cardiovascular (Singh et al., 2017).

Dieta Vegetariana / Vegana. La diferencia en la composición de la microbiota intestinal entre las personas que siguen dietas veganas o vegetarianas y las que siguen dietas omnívoras está bien documentada. Una dieta basada en plantas parece ser beneficiosa para la salud humana al promover el desarrollo de sistemas microbianos más diversos y estables. El alto consumo de fibra aumentan la cantidad de bacterias de ácido lácticas, así como *Ruminococcus*, *E. rectale* y *Roseburia*, y reduce la abundancia de *Clostridium* y *Enterococcus*. El consumo de polifenoles es también una característica de este tipo de dietas, y su consumo se ha asociado a mayor abundancia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, los cuales proporcionan efecto protectores (anti-patógenos), antiinflamatorios y protección cardiovascular. La ingesta alta de fibra también aumenta la producción de AGCC de cuyos beneficios se ha hablado en secciones anteriores. En general las dietas basadas en plantas fomentan el desarrollo de microbiota benéfica y con gran función metabólica que favorece la salud del hospedero (Tomova et al., 2019).

Dieta Mediterránea. Este tipo de dieta se considera sana y equilibrada. Se distingue por ser rica en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, altos niveles de polifenoles y otros antioxidantes, alta ingesta de fibra y otros carbohidratos de bajo índice glucémico, y mayor ingesta de proteína vegetal que animal. La dieta se caracteriza por incluir: aceite de oliva, frutas variadas, verduras, cereales, leguminosas y nueces; un consumo moderado de pescado, aves y vino tinto; y una menor ingesta de productos lácteos, carnes rojas, carnes procesadas y dulces. Existen dos mecanismos por los que el consumo de una dieta mediterránea puede contribuir a mejorar la salud metabólica: el primero es a través de la modulación de la microbiota gastrointestinal y el segundo es mediante la reducción de la endotoxemia metabólica. Se ha propuesto que la endotoxemia metabólica (aumento los niveles circulantes de lipopolisacárido bacteriano), es una causa de inflamación durante la disfunción metabólica. Las dietas altas en grasas saturadas y bajas en fibra contribuyen a la endotoxemia metabólica a través de varios mecanismos, que incluyen cambios en el microbioma gastrointestinal y los productos finales de la fermentación bacteriana, cambios en la fisiología intestinal, así como cambios en función de barrera y la circulación enterohepática de ácidos biliares (Bailey & Holscher, 2018; Caesar et al., 2015; Patrice D. Cani et al., 2016). Es por esto que la dieta mediterránea, rica en grasas insaturadas y fibra, puede ser una estrategia dietética para reducir la endotoxemia metabólica, promoviendo también posiblemente una mejora en la obesidad, el perfil lipídico y la inflamación. Algunos cambios observados con el consumo de esta dieta es el aumento en *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Prevotella* y disminución en *Clostridium* (Singh et al., 2017).

2.3.5. Enterotipos

Debido a la gran variabilidad que hay entre la composición de la microbiota, el concepto de enterotipo podría ser más adecuado para la identificación de patrones relacionados a enfermedades o dietas. Los enterotipos se basan en una asociación de géneros y especies específicos (Shen y col. 2013). Se han identificado tres enterotipos diferentes con base en las variaciones de los niveles de: *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus* (Clarke y col. 2012). El primero tiene predominancia del género *Prevotella* (considerado principalmente antiinflamatorio), el segundo presenta mayor abundancia del género *Bacteroides* (posiblemente relacionado con un mayor riesgo de síndrome metabólico) y el tercero está dominado por el género *Ruminococcus* (cuya importancia biológica aun se discute) (Robles-Alonso y Guarner, 2013).

Prevotella. Es un género que parece estar significativamente asociado a una dieta vegana. En el estudio De Filippo y colaboradores, *Prevotella* estuvo presente exclusivamente en los niños de Burkina Faso que consumían una dieta baja en grasas y proteínas animales y rica en almidón, fibra y proteína vegetal, en comparación con los niños que vivían en Italia que consumían una dieta occidental (De Filippo et al., 2010). Cuando se analizó la abundancia de *Prevotella* en vegetarianos tailandeses frente a no vegetarianos, se encontró que los vegetarianos tenían cantidades significativamente más de este género (Tomova et al., 2019).

Bacteroides. Es otro enterotipo y género principal dentro de los Bacteroidetes que se ha correlacionado positivamente con dietas ricas en proteínas animales y grasas saturadas (Albenberg y Wu, 2014). Esto probablemente se deba a su capacidad para tolerar a los ácidos biliares, presentes comúnmente en los entornos intestinales de quienes consumen productos animales. Se comparó a niños en los Estados Unidos que consumían una dieta occidental con niños en Bangladesh que consumían una dieta basada en plantas y se encontró que *Bacteroides* fue el género principal en la microbiota infantil de los EE. UU. (Tomova et al., 2019).

Ruminococcus. Es el tercer enterotipo y está asociado con el consumo de frutas y verduras a largo plazo. Las especies de este género están especializadas en degradar carbohidratos complejos, como la celulosa y el almidón resistente. Como se señaló previamente los miembros de la familia Ruminococcaceae degradan las fibras dietéticas y producen butirato, que actúa como un compuesto antiinflamatorio (Biddle et al., 2013). El consumo de nueces también se ha asociado significativamente con el enriquecimiento de *Ruminococcus*. Sin embargo, este género también se ha relacionado con un bajo consumo de fibra dietética. Si bien estas bacterias degradan los carbohidratos complejos, también descomponen los almidones resistentes que se encuentran en los productos de granos refinados. *Ruminococcus* también podría desempeñar un papel en la conversión de colina de origen animal en trimetilamina (TMA). Se cree que este enterotipo está influenciado por dietas tanto basadas en productos animales como en plantas (Tomova et al., 2019).

2.4. MICROBIOTA Y OBESIDAD

2.4.1. Panorama general de la obesidad

Una de las funciones la microbiota se basa en la capacidad de extracción de energía de la dieta, a través del proceso de fermentación de carbohidratos no digeribles, lo que le confiere al hospedero la posibilidad de obtener energía adicional de los alimentos (Tsai y Coyle, 2009; Ley y col. 2005). Esto podría haber sido un atributo beneficioso para los antiguos humanos que tenían un acceso variable a los alimentos. Sin embargo, en las sociedades modernas, donde la accesibilidad a los alimentos de grandes porciones y densos en energía, esta “ventaja” ahora puede suponer un perjuicio (Bäckhed y col. 2004).

México tiene una de las tasas más altas de obesidad infantil. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, existe una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 33.2% entre los niños en edad escolar (Instituto Nacional de Salud Pública, 2016). Existen muchos factores implicados en la epidemia de la obesidad, incluyendo determinantes genéticas y ambientales, la disponibilidad de alimentos, las características de la dieta, la disminución en la actividad física, así como otros factores socio-culturales (Tsai y Coyle, 2009: 307). La obesidad es una enfermedad multifactorial y muchos estudios han observado que la microbiota intestinal puede ser un factor crucial en el desarrollo de la obesidad (López-Contreras et al., 2017; Riva et al., 2017; Tilg & Kaser, 2011). Durante los últimos 15 años, los estudios se han centrado en identificar la microbiota en diferentes niveles taxonómicos, caracterizando las especies o comunidades que podrían estar jugando un papel en la aparición de la obesidad.

2.4.2. Estudios en animales

Gran parte del conocimiento que tenemos sobre la microbiota y la obesidad se ha generado a través de estudios en animales gnotobióticos y mediante el uso de técnicas metagenómicas (Ley y col. 2005). Uno de los primeros estudios en relacionar la microbiota con la obesidad fue el realizado en 2004 por Bäckhed y colaboradores, donde observaron que los animales CONV-R (ratones criados convencionalmente) tenían 42% más grasa corporal en comparación con los GF (ratones libres de microorganismos), a pesar tener un consumo de alimento 29% menor. Por otro lado, la colonización de los ratones GF por 14 días con la microbiota de los animales CONV-R,

proceso conocido como convencionalización (CONV-D), produjo un dramático incremento del 57% en la grasa corporal de los ratones (Bäckhed y col. 2004). Este estudio además comprobó algunos de los mecanismos que podrían estar implicados en la relación entre la microbiota y la obesidad. En los animales convencionalizados se observaron los siguientes cambios:

- Aumento en la absorción de monosacáridos en el intestino y elevación de los niveles de insulina y glucosa.
- Incremento en la expresión de ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos).
- Aumento en la expresión de enzimas lipogénicas (ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa).
- Elevación de los niveles de intermediarios del ciclo de ácido tricarboxílico.
- Inhibición de FIAF (factor adiposo inducido por el ayuno) e incremento en la actividad de LPL (lipoproteína lipasa) lo que conlleva a un aumento en la captación celular de ácidos grasos y la acumulación de triglicéridos en el adipocito.

Un año después, Ley y colaboradores analizaron 5,088 secuencias del gen 16s rRNA de bacterias del colon distal de ratones genéticamente obesos (*ob/ob* carentes de leptina) y ratones delgados (*ob/+* o *+/+*). Sus resultados mostraron que existía un cambio en la abundancia relativa a nivel de los dos filos bacterianos principales. La microbiota cecal de los ratones obesos tuvo una reducción significativa del 50% en los Bacteroidetes y un aumento significativo en la proporción de Firmicutes (Ley y col. 2005). Cabe señalar que en este modelo la mutación en el gen de la leptina es la responsable del fenotipo obeso, por lo que debía descartarse la influencia del genotipo sobre la abundancia relativa de los filos bacterianos. Para descartar lo dicho anteriormente, Turnbaugh y colaboradores midieron el efecto que tenía el trasplante de la microbiota de los ratones obesos (*ob/ob*) a ratones delgados (*ob/+* o *+/+*), tanto criados convencionalmente (*wild type*) como libres de microorganismos (GF). Luego de 14 días, los receptores de la microbiota de los ratones obesos tuvieron un aumento en la extracción de energía de la dieta e incrementaron su porcentaje de masa grasa en un 60%, en comparación con aquellos que recibieron la microbiota de ratones delgados. Este cambio en la composición corporal de los ratones se dio a pesar de no presentar diferencias entre el consumo y el gasto de energía, lo que demuestra que la composición de la microbiota predispone a la obesidad y que la habilidad para extraer

energía de la dieta puede ser transmisible. El estudio también contempló la secuenciación de los microbiomas, lo que comprobó de nuevo que existe un cambio en la abundancia relativa de los dos filos bacterianos principales (Firmicutes y Bacteroidetes) (Turnbaugh y col. 2006). Es de esta manera que los estudios en animales sentaron la base para la construcción de la teoría de que una relación elevada entre Firmicutes y Bacteroidetes se relaciona con la obesidad y que es la capacidad de cierto grupo de microorganismos para fermentar los polisacáridos no digeribles, lo que podría relacionarse con un aumento en las reservas de energía del tejido adiposo del hospedero.

2.4.3. Estudios en humanos

Luego de que la evidencia en los estudios en animales sentó un parteaguas en el estudio de la microbiota como un nuevo factor asociado a la obesidad, se comenzó a elaborar una serie de estudios en humanos con el fin de replicar y comprobar lo visto en los estudios animales. Uno de los primeros fue el realizado por Ley y colaboradores en 12 personas obesas asignadas aleatoriamente a 2 grupos experimentales (dieta restringida en grasa o dieta restringida en carbohidratos) durante 1 año. Los resultados demostraron lo mismo que se había reportado en ratones, que existía una mayor proporción de Firmicutes que de Bacteroidetes en los obesos y que la abundancia relativa de los Bacteroidetes se incrementaba con la pérdida de peso. En este mismo estudio se analizaron 18,348 secuencias bacterianas del gen 16s rRNA de muestras fecales, y se reveló, por primera vez, que el 70% de las 4,074 especies identificadas eran únicas para cada persona y que estos linajes bacterianos se mantienen constantes a lo largo de la vida de las personas (Ley y col. 2006).

Un par de años después Duncan y colaboradores estudiaron a 23 sujetos obesos bajo un estudio cruzado por 8 semanas donde se sometieron a una dieta de pérdida de peso (una alta en proteína y baja carbohidratos y la otra alta en proteínas y moderada en carbohidratos). Los resultados mostraron que la proporción total de bacterias detectadas como Bacteroides por la técnica de FISH, no se veía afectada por ninguna de las dietas y tampoco se observó una relación significativa entre los cambios en el porcentaje de Bacteroides en heces y la pérdida de peso. Adicionalmente, no se observaron cambios en el porcentaje de Firmicutes con las distintas dietas. En este *phyllum*, sin embargo, varias bacterias fueron sensibles a las intervenciones dietarias. En particular, se vio una reducción significativa en el grupo de *Roseburia* y *Eubacterium*

rectale, el cual tienen una función clave en la formación de butirato. Este estudio mostró que la pérdida de peso a corto plazo no es impulsada ni es dependiente de los cambios en estos grupos de bacterias, lo que se opone a la hipótesis de que una mayor proporción de Firmicutes sobre la de Bacteroidetes puede estar asociado a la obesidad. (Duncan y col. 2008: 1721).

Estudios en niños con obesidad y con peso normal no encontraron diferencias cuantificables en las comunidades de microorganismos entre ambos grupos de niños. Sin embargo, se encontró que los niños obesos tenían significativamente mayores concentraciones de AGCC, principalmente butirato, lo que sugiere que hay una mayor utilización de estos sustratos en la microbiota de los obesos (Payne et al., 2011). El hallazgo de las mayores concentraciones de AGCC se relaciona con la hipótesis de que los obesos tienen una microbiota con mayor capacidad de extracción de energía. Se cree que los AGCC proveen aproximadamente un 10% de energía adicional al hospedero, la cual puede ser usada para la síntesis *de novo* de triglicéridos y glucosa en el hígado. De manera que un incremento del 1% en la energía proveniente de una dieta de 2000 kilocalorías, supondría el aumento de 1 kg de peso anual (Payne y col. 2011).

Otro estudio que analizó la relación entre obesidad y AGCC fue el de Schwartz y colaboradores donde compararon las concentraciones de AGCC en 30 sujetos delgados, 35 con sobrepeso y 33 con obesidad. Lo que de nuevo mostró que los AGCC eran significativamente más elevados en sujetos obesos. Mientras que por otro lado, no se encontró una relación entre Firmicutes/Bacteroidetes, lo que se opuso a los estudios del grupo de Ley y colaboradores (Schwartz y col. 2010).

Hasta el momento solo se había hablado de una relación entre microbiota y obesidad, pero nunca de cómo la composición de la microbiota podía predecir el desarrollo de la obesidad en niños. Esto fue justamente lo que Kalliomäki y colaboradores encontraron al ver que las bacterias del género *Bifidobacterium* se encontraban en mayor cantidad en los niños que, luego de 7 años de seguimiento, permanecieron con peso normal. Mientras que el número de *Staphylococcus aureus* fue menor en los niños con peso normal en comparación con los que desarrollaron sobrepeso. Estos resultados demuestran que el mayor número de bifidobacterias en la infancia podría conferir protección contra el desarrollo de sobre peso y obesidad (Kalliomäki y col. 2008). Algunos metanálisis han concluido que la lactancia está

asociada con un 13-22% de reducción en la probabilidad de desarrollar sobrepeso y obesidad en la niñez y que la duración de la lactancia está inversamente asociada con el riesgo de obesidad (Owen y col. 2005; Arenz y col. , 2004; Harder y col. 2005). Cabe señalar que las bifidobacterias forman parte de la microbiota normal de los lactantes, por lo que se ha sugerido que estas bacterias constituyen el vínculo entre la lactancia y el peso corporal. Adicionalmente, se ha documentado que *S. aureus* se asocia a un aumento en los niveles circulantes de CD14, un marcador sistémico de inflamación, por lo que se especula que esta bacteria podría actuar como un detonador de inflamación sistémica de bajo grado y por consiguiente, podría contribuir al desarrollo de la obesidad (Kalliomäki y col. 2008: 537).

El estudio de Riva y colaboradores realizado en Italia en niños entre 6 y 16 años de edad mostró que los niños con obesidad presentaban una mayor proporción de Firmicutes que de Bacteroidetes, así como una mayor concentración de AGCC en heces comparado con los niños de peso normal. Esta investigación también señala que a pesar de que la razón F/B se encontraba elevada en el grupo de los obesos, existía una amplia variabilidad en esta razón dentro de este grupo, lo que sugiere que esta proporción no es un marcador suficientemente robusto de obesidad. También señaló que la familia Ruminococcaceae se encontraba enriquecida en los obesos mientras que la familia Bacteroidaceae se encontraba disminuída. Y que los géneros pertenecientes al filo Bacteroidetes se correlacionaban negativamente con la presencia de AGCC, mientras que los pertenecientes a los Firmicutes se encontraban relacionados positivamente (Riva et al., 2017).

Estos experimentos fueron los que demostraron por primera vez que un factor ambiental, como la microbiota intestinal, podía regular el almacenamiento de energía y que la obesidad, tanto en ratones como en humanos, podría estar asociada a una alterada composición de la microbiota. Sin embargo, aun no está claro si el incremento en la extracción de energía puede realmente contribuir a un aumento significativo en el peso corporal en un tiempo tan corto, como lo sugieren los estudios de trasplantes de microbiota. Y por otro lado, el uso de polisacáridos no digeribles (fibra) ha sido utilizado en muchas intervenciones nutricionales con el fin de disminuir el peso corporal, la masa grasa y la severidad de la diabetes. (Cani y col. 2008: 306). Además de que la fermentación de carbohidratos tiene una serie de efectos benéficos para el hospedero, entre los que se incluye la producción de butirato, necesario para la mucosa colónica y

para la estimulación de las bifidobacterias (Duncan y col. 2008: 1723).

2.4.4. Inflamación crónica

A pesar de que la obesidad se caracteriza por un desbalance energético (diferencia entre las calorías consumidas a través de la dieta y el gasto calórico) (Bouchard, 2008), se sabe que tanto la obesidad, como la resistencia a la insulina están asociadas a un estado de inflamación sistémica de bajo grado. En modelos de estudio de obesidad genética e inducida por dieta, el tejido adiposo presenta un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias, lo que provoca hiperinsulinemia y un aumento en el almacenamiento de lípidos a nivel de hígado y tejido adiposo (Cani y col. 2007). Por otro lado, la microbiota regula en gran medida la inmunidad innata y adaptativa, e influye en respuestas locales y sistémicas. Estímulos microbianos o derivados de la dieta como proteínas y lípidos, activan a los receptores tipo Toll (TLR), los cuales informan al sistema inmune para responder a estos estímulos. Se ha demostrado que los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana celular de las bacterias Gram-negativas, así como los ácidos grasos saturados de la dieta, pueden actuar como ligandos para estos receptores, los cuales promueven la liberación de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), entre otras, lo que se relaciona con un estado de inflamación sistémica (Farías y col. 2011).

Cani y colaboradores fueron los primeros en reportar que una dieta alta en grasa incrementa la concentración de LPS lo suficiente para promover un aumento en el peso corporal, en la glucemia en ayunas y en la concentración de citocinas proinflamatorias; y que la infusión de LPS en ratones alimentados con una dieta normal, causaba una respuesta similar. De manera que la dieta alta en grasa es el vínculo entre los niveles elevados de LPS en plasma y un estado de endotoxemia metabólica (Cani y col. 2008: 307). Posteriormente el mismo grupo de investigación hizo un estudio en 201 hombres, donde se midieron los niveles de LPS y se hicieron mediciones bioquímicas, antropométricas y recordatorios de 24 horas de la dieta consumida, además de llevar a cabo un experimento en ratones con dos diferentes tipos de dieta (alta en grasa: 72% de lípidos, 28% de proteínas y menos de 1% de carbohidratos; alta en carbohidratos: 35% de lípidos, 28% de proteínas y 37% de carbohidratos). Los resultados en humanos no encontraron relación entre el LPS, el peso corporal, el índice de masa corporal, la insulina, la glucemia o la interleucina-6. Sin embargo, se encontró una correlación positiva con la ingestión de grasa y energía y las concentraciones de LPS en humanos,

mientras que en ratones se observó que la endotoxemia estaba asociada a la ingestión general de energía (Amar y col. 2008: 1220).

En otro estudio de Cani y colaboradores se llevó a cabo un experimento en donde se administraron fibras prebióticas (oligofruktosa) para incrementar específicamente el contenido de *Bifidobacterium* en el intestino de ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Lo que se encontró fue que las concentraciones de LPS se correlacionaron negativamente con las especies de bifidobacterias y que los ratones que consumieron el prebiótico tenían mejor tolerancia a la glucosa y a la insulina, así como una reducción en los niveles de citocinas proinflamatorias. Estos resultados sugieren que la microbiota puede contribuir a la regulación de la endotoxemia y por consiguiente estar implicada en la fisiopatología de la obesidad y la resistencia a la insulina (Cani y col. 2007: 2376).

A pesar de todos los estudios realizados en los últimos 15 años, aun quedan muchas dudas de cómo la composición de la microbiota puede asociarse con la obesidad y otros desordenes nutricionales. Los estudios deberán estar enfocados en la propuesta de estrategias que modifiquen la microbiota y reduzcan el impacto que tiene sobre los procesos metabólicos e inflamatorios. Apenas comenzamos a comprender las funciones que tiene la microbiota intestinal y los mecanismos implicados en sus efectos metabólicos. La colaboración entre microbiólogos, nutriólogos, bioquímicos, médicos y biólogos moleculares y computacionales es de esencial importancia para resolver las diversas preguntas que nos llevarán a proponer nuevos tratamientos y estrategias de prevención para las enfermedades que aquejan a la sociedad.



JUSTIFICACIÓN

En nuestro país el creciente problema de obesidad infantil ha obligado la búsqueda de nuevas estrategias que incidan sobre esta problemática. A pesar de todos los estudios realizados en los últimos 15 años, no existe un consenso sobre qué poblaciones bacterianas se afectan durante la obesidad. Esto debido a la diversidad en metodologías de análisis de la microbiota, la variedad de diseños de los estudios y el nivel filogenético utilizado para analizar las comunidades bacterianas. Un punto importante a considerar es que las comunidades microbianas no se encuentran distribuidas de manera aleatoria en el intestino y que sus funciones difieren entre microorganismos residentes y transitorios. En el siguiente estudio se propone un análisis cuantitativo de las principales familias bacterianas del intestino humano, agrupadas de acuerdo a su interacción con el huésped. Se analizarán bacterias residentes (*Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*), así como bacterias transitorias (*Bacteroidaceae*–*Porphyromonadaceae*–*Prevotellaceae*, *Enterococcaceae* y *Lactobacillaceae*). Esto nos permitirá analizar de una manera más específica las asociaciones de estas familias con la dieta, la composición corporal y los marcadores bioquímicos y finalmente nos facilitará conocer no solo las fluctuaciones en la abundancia de dichas familias, sino la significación de estas de acuerdo a su función.

IV.

HIPÓTESIS

Existe una menor abundancia de las familias Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae, Enterococcaceae y Lactobacillaceae, así como una mayor abundancia de las familias Lachnospiraceae-Ruminococcaceae en niños con obesidad, perfiles metabólicos alterados y con un alto consumo de grasas y azúcares.

OBJETIVOS

General

- Asociar la abundancia siete principales familias bacterianas de la microbiota intestinal con la dieta, la composición corporal y el riesgo metabólico de niños escolares de una zona rural de Querétaro

Específicos

- Cuantificar la abundancia de las familias bacterianas: Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae, Lachnospiraceae-Ruminococcaceae, Enterococcaceae y Lactobacillaceae, en muestras de heces mediante qPCR.
- Analizar y caracterizar la dieta de los niños a través de recordatorios de 24 horas y frecuencias de alimentos.
- Clasificar a los niños de acuerdo a su composición corporal a través de antropometría y absorciometría dual de rayos X (DEXA).
- Examinar los niveles de glucosa, insulina, perfil de lípidos y marcadores de inflamación (leptina, TNF- α , IL-6, IL-10 y CRP) y clasificar a los niños de acuerdo a sus valores de riesgo metabólico.
- Relacionar la abundancia de las familias bacterianas con la dieta, la composición corporal y los marcadores de riesgo metabólico.

METODOLOGÍA

6.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Participaron en un estudio transversal 93 niños de ambos sexos de entre 6 y 10 años de edad, pertenecientes a las comunidades rurales de Santa Cruz y Santa María Begoña en el municipio de El Márques, Querétaro. El estudio se realizó de acuerdo a los lineamientos de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2013) y todos los procedimientos que involucraron a los pacientes humanos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro (**Anexo 1**). Los padres o tutores de los participantes firmaron una Carta de Consentimiento Informado (**Anexo 2**) después de haber recibido información tanto oral como escrita sobre el proyecto. Fueron excluidos del estudio aquellos niños con alguna discapacidad o enfermedad mental, niños que estuvieran bajo algún tratamiento con probióticos, prebióticos, suplementos, antiácidos, que estuvieran bajo algún régimen especial dieta, que hayan sido desparasitados o que hayan estado bajo tratamiento con antibiótico durante los últimos 4 meses o que presentaran alguna discapacidad física o mental.

6.2. CUESTIONARIOS

Los padres o tutores de los participantes contestaron los cuestionarios de historia clínica (García et al., 2003; Rosado et al., 2011) (**Anexo 3**), nivel socioeconómico (AMAI, 2018) (**Anexo 4**) y seguridad alimentaria (**Anexo 5**). El cuestionario de seguridad alimentaria del hogar que se utilizó surgió de la Escala Latinoamericana y Caribeña de Seguridad Alimentaria (ELCSA) (Pérez-Escamilla et al., 2007)

6.3. ANÁLISIS DE LA DIETA

La dieta fue evaluada por nutriólogos capacitados utilizando un cuestionario cualitativo de frecuencia de alimentos (Caamaño et al., 2015) donde los padres o tutores en presencia de los niños informaron el número de veces por día / semana / mes / año que se consumió un alimento (**Anexo 6**). Asimismo se aplicaron tres recordatorios de 24 horas, dos aplicados en días de escuela y uno en el fin de semana (**Anexo 7**). Además de los alimentos consumidos, la dieta se evaluó en términos de cantidad de alimento (g), ingesta calórica (kcal) e ingesta de macronutrientes y micronutrientes utilizando las tablas de composición de alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2009) y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (Chávez et al., 1996).

6.4. EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA

A todos los niños se les realizó una evaluación antropométrica. El peso y la altura se midieron por duplicado y en ocasiones no consecutivas por personal capacitado siguiendo los procedimientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 1992). El peso se determinó usando una balanza digital calibrada (SECA Mod. 813, Hamburgo, Alemania) y la altura se midió con un estadiómetro portátil (SECA Mod 206, Hamburgo, Alemania). El estado nutricional se calculó según los criterios de la OMS de IMC por edad para niños de 5 a 19 años. El bajo peso se definió como dos puntuaciones z por debajo de la mediana de referencia de la OMS, el sobrepeso como una desviación estándar y la obesidad como dos desviaciones estándar por encima de la mediana de referencia del índice z del IMC por edad score (World Health Organization, 2006). La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio (SECA Mod 201, Hamburgo, Alemania). La medición se tomó sobre la cicatriz umbilical. El índice cintura estatura se determinó dividiendo la circunferencia de cintura en cm entre la talla en cm. El punto de corte para el índice cintura estatura fue ≥ 0.5 (Valle-Leal et al., 2016).

6.5. COMPOSICIÓN CORPORAL

La evaluación de la composición corporal se realizó por absorciometría dual de rayos X (DEXA) (Hologic Mod Explorer, Bedford, MA, EE. UU.) en la Clínica de Nutrición de la Facultad de Ciencias Naturales por personal certificado y previamente estandarizado. Esta técnica permitió la medición de la masa grasa corporal total, el porcentaje de grasa corporal, la masa grasa abdominal y el porcentaje de grasa abdominal mediante. La masa grasa abdominal y el porcentaje de grasa abdominal se estimaron definiendo las regiones de interés como cuadriláteros que se extendían 10 cm por encima de la cresta ilíaca y lateralmente a los bordes del tejido blando abdominal. Se analizó todo el tejido del tronco dentro de esta región estandarizada para determinar la masa grasa y el porcentaje de grasa abdominal (Hill et al., 2007). El exceso de porcentaje grasa corporal total para las niñas se consideró por encima del 30% y para los niños por encima del 25% (Ellis, 1997; Ellis et al., 1997).

6.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Una muestra de sangre en ayunas fue recolectada de cada individuo de la vena cefálica en su primera visita a la clínica de salud de la comunidad. Los niños y sus padres recibieron instrucciones de ayunar durante al menos 12 horas antes de que la muestra de sangre se recogiera temprano en la mañana (entre las 7 y 8 a.m.) (Céspedes & Seringe, 1999). El HDL y el colesterol LDL se evaluaron mediante espectrofotometría (Genesis 20 ThermoSpectronic, Thermo Electron Corp, Madison, WI, EE. UU.) usando kits comerciales (#HDLL0230 Colesterol HDL, Elitech, Sées, Francia; #MX41023 Colesterol LDL, Spinreact, Sant Esteve de Bas, España). Los triglicéridos (TG) y el colesterol total se determinaron en el plasma con kits comerciales (#CHSL0250 Colesterol, Elitech, Sées, Francia; #TGML0250 Triglycerides, Elitech, Sées, Francia) en un analizador químico clínico (Bayer RA-50, Bayer Diagnostics, Dublín, Irlanda). Los puntos de corte utilizados fueron: para el colesterol total ≥ 200 mg / dL; para el colesterol LDL ≥ 130 mg / dL; y para los triglicéridos, ≥ 100 mg / dL para niños < 9 años de edad y ≥ 130 mg / dL para niños > 10 años de edad. Las concentraciones de HDL se consideraron bajas cuando los valores < 40 mg / dL (Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents &

National Heart, Lung; National Heart, Lung, and Blood Institute, 2012). La glucosa en ayunas se evaluó mediante un método colorimétrico-enzimático, utilizando un kit comercial (#GHSL0250 Glucose Elitech, Sées, Francia) y un analizador químico clínico (Bayer RA-50, Bayer Diagnostics, Leverkusen, Alemania). La concentración de insulina en suero se determinó mediante un kit ELISA comercial (#EZHI Millipore, MA) utilizando un fotómetro de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EE. UU.). La resistencia a la insulina se determinó mediante la evaluación del modelo homeostático (HOMA) con la siguiente fórmula: $HOMA = (insulina \times glucosa) / 22.5$ (Keskin et al., 2005). Los individuos con glucosa en ayunas ≥ 100 mg / dL se consideraron pre-diabéticos (Barlow, 2007). La resistencia a la insulina se definió con un valor de $HOMA > 3.16$ (Keskin et al., 2005). La IL-6, IL-10 y TNF- α se cuantificaron utilizando un kit comercial (#EZHIL6, #EZHIL10, #EZHTNFA Millipore, MA). La proteína C-reactiva (hsCRP) de alta sensibilidad se cuantificó en suero utilizando un kit ELISA comercial de alta sensibilidad (#BQ130C Bioquant, CA) y la leptina se midió utilizando un kit ELISA comercial (#EZHL Human Leptin Elisa Kit, Linco Research). Todos los ELISA se leyeron en un fotómetro de microplaca Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EE. UU.). Se consideró inflamación sistémica de bajo grado cuando la $CRP > 3$ mg/L (Pearson, 2003). Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Humana de la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.7. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA

Los padres o tutores de los participantes fueron instruídos para recolectar una muestra de heces de sus hijos. Se les entregó un recipiente estéril de plástico y se les indicó que almacenaran la muestra en el refrigerador a 4°C. Las muestras fueron recolectadas a la mañana siguiente y fueron trasladadas al laboratorio y congeladas a -20°C hasta su análisis posterior. Previo a la extracción de ADN, las muestras se lavaron con 500 μ l de etanol (#E7023 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para eliminar el exceso de grasa de la muestra. El ADN se extrajo de 2.5 g de heces utilizando un kit de extracción comercial (#12855-50 PowerLyzer Power Soli DNA isolation Kit, MoBio, CA). Se realizaron ajustes al protocolo del fabricante (**ANEXO 8**). La cantidad y calidad del ADN se verificó usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con 1ml de

SybrSafe (#S33102 Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA) para confirmar la integridad del ADN. La abundancia de las familias bacterianas se determinó mediante PCR en tiempo real (qPCR) usando un sistema de PCR en tiempo real CFX96 (BioRad, Hercules, CA) y la tecnología SYBR Green PCR (#RR420Q Clontech Laboratories, Mountain View, CA). La abundancia bacteriana total se estimó utilizando *primers* diseñados para amplificar un fragmento de 359 pb del gen *rpoB*. Cada reacción de qPCR consistió de 2X SYBR Green Master Mix (Clontech Laboratories), BSA (100 µg / ml) (#B900S New England Biolabs, United KingdomNew England Biolabs, RU), set de *primers* a 10µM, correspondiente a cada ensayo (**Tabla 1**), ADN genómico extraído a una concentración de 4ng/µL y L de agua grado PCR. En la **Tabla 2** se muestra pa preparación de las reacciones para cada primer. Los objetivos de cada set de primers validado fue revisado usando la herramienta de Probe Match de la base de datos RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>). La temperatura de alineación de 55°C utilizada en el protocolo de PCR, fue determinada empíricamente a través de un PCR con gradiente de temperatura. El protocolo de PCR para cada set de primers se presenta en la **Tabla 3**. Las curvas de desnaturalización fueron denterminadas entre 60° y 95°C para todos los productos para asegurar la calidad de la amplificación y se muestran en el **Anexo 9**.

Tabla 1. Primers utilizados para la medición de la abundancia de las familias bacterianas en heces de niños escolares.

Gen	Secuencia	Referencia
<i>rpoB</i>	F=5'-AACATCGGTTTGATCAAC-3' R=5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'	(Dahlöf et al., 2000)
Bacteroidaceae- Porphyromonadaceae-Prevotellaceae	F=5'-GGTGTCCGGCTTAAGTGCCAT-3' R=5'-CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC-3'	(Rinttilä et al., 2004)
Enterococcaceae	F=5'-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT-3' R=5'-ACTCGTTGTACTTCCCATTGT-3'	(Rinttilä et al., 2004)
Lachnospiraceae-Ruminococcaceae	F=5'-CGGTACCTGACTAAGAAGC-3' R=5'-AGTTT(C/T)ATTCTTGCGAACG-3'	(Rinttilä et al., 2004)
Lactobacillaceae	F=5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' R=5'-CACCGCTACACATGGAG-3'	(Barman et al., 2008)

Para cada ensayo de qPCR, se determinó una curva de calibración utilizando un *pool* de heces de los participantes, las concentraciones de ADN utilizadas en las curvas estándar variaron de 10.9 ng / µl a 0.003 ng / µl. Las curvas estándar se amplificaron al mismo tiempo que las muestras de heces. En cada ensayo se aseguró que la Eficiencia fuera mayor al 90%, con una R² mayor a 0.9 (**Anexo 10**). Todas las amplificaciones de

qPCR se realizaron por triplicado. Las señales de qPCR de cada familia bacteriana se normalizaron (dividieron) entre la señal de abundancia de bacterias (gen *rpoB*). La abundancia de cada familia bacteriana se reportó como el logaritmo natural (ln) de los ng de ADN por gramo de heces (Nava et al., 2011b).

Tabla 2. Preparación de la reacción de 12µl utilizada en los ensayos de PCR.

qPCR Mixture	rpoB	BPP	ECC	LAC	LRC
H2O PCR (µl)	1.05	1.5	1.5	1.5	1.5
Sybr Green Mix (µl)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Primer Forward (µl)	0.6	0.75	0.75	0.75	0.75
Primer Reverse (µl)	0.6	0.75	0.75	0.75	0.75
BSA (µl)	2.25	1.5	1.5	1.5	1.5

Tabla 3. Protocolo de qPCR utilizado por 35 ciclos.

Paso	Temperatura	rpoB	Temperatura	Familias
Desnaturalización inicial	95°C	2 minutos	95°C	3 minutos
Desnaturalización	95°C	45 segundos	94°C	45 segundos
Alineación	55°C	1 minuto	55°C	30 segundos
Extensión	72°C	1 minuto	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	5 minutos	72°C	5 minutos

6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tamaño de muestra de 93 sujetos en este estudio tuvo como objetivo encontrar una diferencia significativa entre las medias de la abundancia de las familias bacterianas del 20% con una desviación estándar del 30% entre el peso normal y el sobrepeso / obesidad, con una potencia del 80% y un error tipo 1 del 5% (Dupont & Plummer, 1990). Se realizaron análisis descriptivos para todas las variables. La distribución de las variables dependientes se exploró para confirmar su normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos que no tenían una distribución normal se transformaron usando el logaritmo natural (TNF- α , leptina, grasas monoinsaturadas, vitamina D e ingesta de grasa). Se realizó una regresión lineal para examinar la relación entre la dieta y la abundancia de cuatro grupos bacterianos. Fibra, micronutrientes y grupos de alimentos se ajustaron por la ingesta de energía. Se construyó un modelo lineal para examinar la relación entre la abundancia de cuatro grupos bacterianos con las variables antropométricas y bioquímicas. El primer modelo incluyó los cuatro grupos bacterianos para la predicción de variables antropométricas y el segundo modelo incluyó los cuatro grupos bacterianos más el IMC de edad para la predicción de

variables bioquímicas. Verificamos los modelos en busca de evidencia de residuos no distribuidos normalmente, heterogeneidad de varianza e influencia desproporcionada de valores atípicos. Se realizó un ANOVA para examinar si la abundancia bacteriana variaba entre grupos formados por variables antropométricas y de composición corporal alteradas y se realizó un ANCOVA para explorar las diferencias entre la abundancia bacteriana con marcadores metabólicos normales y alterados de acuerdo con el valor de corte para cada variable seleccionada. Las variables que no tenían puntos de corte (citocinas y leptina) se dividieron según la mediana. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 18.0 (SPSS, Chicago) y los valores de p por debajo de 0,05 se consideraron significativos.

VII.

RESULTADOS

7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN

Un total de 93 niños en edad escolar (53% niñas y 47% niños) fueron incluidos en el estudio. La edad promedio fue de 8.4 ± 1.6 años. La prevalencia de sobrepeso y obesidad determinada de acuerdo al score Z del IMC para la edad fue de 23% y 17%, respectivamente. Un 38% de los niños presentaron un índice de cintura-estatura ≥ 0.5 . De acuerdo con la determinación por DEXA, el 59% de los niños presentaba “exceso de grasa corporal” es decir por encima del 30% para las niñas y por arriba del 25% para los niños. Casi un tercio (30%) de los niños tenían triglicéridos altos y el 27% tenían HDL bajo. A pesar de que el 99% de los niños reveló glucosa sanguínea en ayunas normal, el 21% tenía resistencia a la insulina. Además, la determinación de hsCRP señaló que el 49% de los niños presentaban inflamación sistémica de bajo grado. La **Tabla 4** muestra las características antropométricas y bioquímicas de acuerdo al score Z del IMC para la edad. Se observan diferencias significativas propias de esta clasificación.

7.2. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

La población presentó en promedio una abundancia del 31% de la familia Enterococcaceae, seguida de 29% de abundancia de las familias Lachnospiraceae-Ruminococcaceae, 22% de Lactobacillaceae y 17% de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae. Cada individuo presentó una abundancia relativa

diferente, la cual se muestra en la **Figura 9**. Asimismo en la **Tabla 4** se muestra que existe diferencia en la abundancia entre los niños con peso normal, sobrepeso y obesidad para las familias Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae y Lactobacillaceae.

Tabla 4: Principales características de los niños escolares estudiados de acuerdo al score Z de IMC para la edad.

Característica	Total (n=93)		Normal (n=56)		Sobrepeso (n=21)		Obesidad (n=16)		p
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Edad (años)	8.4	1.6	8.2	1.6	8.8	1.9	8.5	1.6	0.368
Antropometría									
Peso (kg)	29.1	8.9	24.4 a	4.8	34.5 b	8.7	38.5 b	9.3	<0.001
Peso para la edad (score Z)	0.06	1.0	-0.6 a	0.7	0.9 b	0.6	1.6 b	0.4	<0.001
Talla (cm)	127.4	10.2	125.1 a	9.1	131 b	11.3	130.5 b	11	0.032
Talla para la edad (score Z)	-0.3	0.8	-0.6 a	0.7	-0.1 b	0.9	0.2 b	1	0.002
IMC para la edad (score Z)	0.5	1.3	-0.4 a	0.7	1.5 b	0.3	2.3 c	0.3	<0.001
Circunferencia cintura (cm)	62	9.8	55.9 a	4.8	68.9 b	8.1	74.3 c	7	<0.001
Índice cintura-estatura	0.5	0.1	0.4 a	0	0.5 b	0	0.6 c	0	<0.001
Grasa abdominal (%)	26.5	8.8	21 a	5	32.8 b	6	38.3 c	5.2	<0.001
Grasa corporal total (%)	29.9	7.2	25.7 a	4.8	34.8 b	4.8	39 c	3.7	<0.001
Bioquímicos									
Colesterol total (mg/dL)	150.6	26.3	150.5	25.3	149.2	27	152.8	30.2	0.91
Triglicéridos (mg/dl)	95.2	45.2	76.5 a	29.8	106.2 b	35.1	146.3 c	57.9	<0.001
HDL (mg/dL)	47.5	10.3	50.6 a	9.6	45.6 b	10.4	39.3 b	7.7	<0.001
LDL (mg/dl)	82.1	18.2	81.2	16	82.2	20.5	85.2	22.6	0.74
Glucosa (mg/dL)	81	7.7	79.9	8.6	82	6.3	83.5	5.2	0.19
Insulina (uU/ml)	12.7	5.1	10.8 a	3.1	15.9 b	6.7	14.5 b	5.7	<0.001
Índice HOMA	2.6	1.2	2.1 a	0.7	3.3 b	1.6	3 b	1.3	<0.001
Leptina (ng/ml) †	4.9	5.6	1.8 a	1.4	8.3 b	7.2	10.7 c	5.2	<0.001
CRP (mg/L)	1.5	2.1	1 a	1.5	1.7 a	3.1	3.1 b	1.3	0.001
TNF- α (pg/ml) †	4.9	3.6	3.3 a	1.9	6 b	4.7	8.9 c	2.3	<0.001
Interleucina 6 (pg/ml)	3.9	5.1	2 a	0.9	3.9 a	7.8	10.3 b	4.1	<0.001
Interleucina 10 (pg/ml)	4.6	3.9	4.6	4.1	4.9	3.9	4	3.4	0.81
Microbiota									
BPP (ln ng DNA per g of feces)	5.6	2.0	6.3 a	1.9	6.1 a	1.8	4.1 b	1.9	<0.001
ECC (ln ng DNA per g of feces)	10.6	3.4	11	3	10	4.2	9.9	3.6	0.36
LAC (ln ng DNA per g of feces)	7.5	3.3	6.8 a	3.5	7.8 a,b	2.3	9.1 b	3.2	0.037
LRC (ln ng DNA per g of feces)	9.7	2.2	9.9	2.4	9.5	2.1	9.4	1.7	0.65

† Variables retransformadas luego de usar el logaritmo natural para normalizarlas. a,b,c Las letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes $p < 0.05$ en la comparación *post hoc* (test de Tukey). ln: logaritmo natural, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, HOMA: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina, hsCRP: proteína C reactiva de alta densidad, TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. BPP: *Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae*, ECC: *Enterococcaceae*, LAC: *Lactobacillaceae* y LRC: *Lachnospiraceae-Ruminococcaceae*.

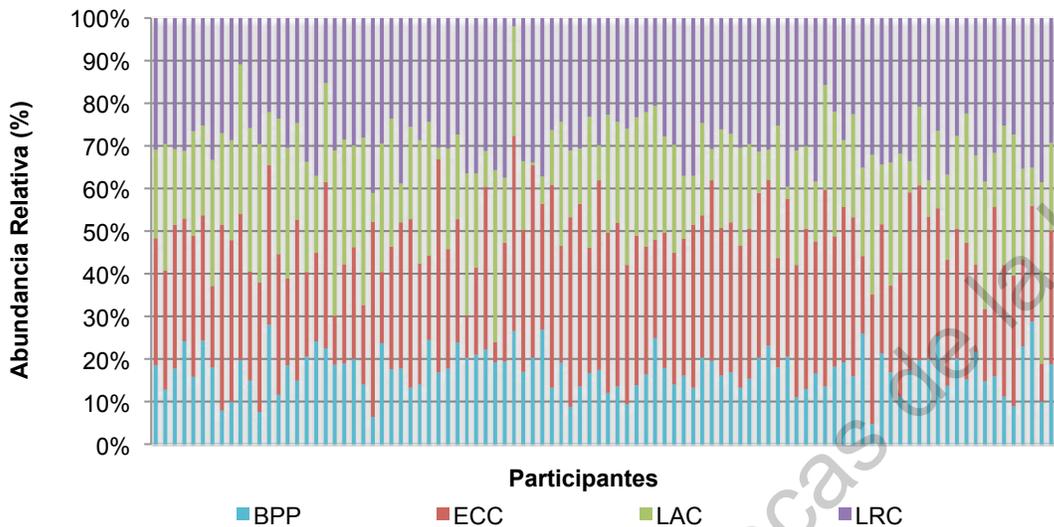


Figura 9: Distribución de las principales familias bacterianas de la microbiota intestinal humana entre cada uno de los 93 participantes. BPP: Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Provotellaceae, ECC: Enterococcaceae, LAC: Lactobacillaceae y LRC: Lachnospiraceae-Ruminococcaceae.

7.4. COMPOSICIÓN DE LA DIETA

El análisis de la dieta indica que el consumo promedio de kcalorías fue de 1565 (± 406.4), el porcentaje de adecuación fue del 55% de hidratos de carbono, 13% de proteínas y 32% de lípidos, los cuales entran dentro de lo recomendado para una dieta adecuada. La proporción de los grupos de alimentos consumidos por esta población fueron: cereales 25.4%, lácteos 21.5%, frutas 18.4%, azúcares 12.2%, alimentos de origen animal 10.2%, leguminosas 6%, verduras 5%, grasas y aceites 1%. No se observaron diferencias significativas en la dieta entre los niños con peso normal, sobrepeso u obesidad (**Tabla 5**). Tampoco hubo diferencia en la dieta entre los niños clasificados con porcentaje de grasa corporal normal y grasa en exceso (datos no mostrados). El cuestionario de frecuencia de alimentos mostró que los niños consumían en promedio al día: seis porciones de cereales, cinco porciones de azúcar, dos porciones de alimentos de origen animal, dos porciones de lácteos, dos porciones de grasas y aceites y una porción de leguminosas. De manera similar, no se encontraron diferencias entre la frecuencia de consumo de alimentos entre los niños con peso

normal, sobrepeso y obesidad, ni entre los niños con porcentaje de grasa corporal normal o en exceso (datos no mostrados).

Tabla 5: Características de la dieta de los niños escolares de acuerdo al score Z de IMC para la edad.

Características	Total (n=93)		Normal (n=56)		Sobrepeso (n=21)		Obesidad (n=16)		p
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Energía total (kcal/d)	1565	406.4	1616.3	426.3	1497.1	458.6	1478	207.8	0.34
Macronutrientos									
Fibra (g)	12.4	5.4	12.9	5.9	11.4	5.4	12.2	3.5	0.54
Hidratos de carbono (g)	216.9	58.6	224	61.8	202.7	63.7	211.3	34.5	0.34
Proteína (g)	51.1	14.7	52.3	15.7	50.3	15.8	48.3	8.7	0.62
Lípidos (g)	56.2	22.1	58.4	23.2	55.6	22.6	49.4	16.1	0.36
Colesterol (mg)	168.5	93.3	178.6	99.1	151.1	60.6	156.6	107.7	0.45
Grasa saturada (g)	14.1	6.6	14.8	7.4	12.9	5.5	13.3	4.6	0.45
Grasa monoinsaturada (g)†	13.5	1.5	13.5	1.6	13.5	1.5	12.2	1.5	0.80
Grasa poliinsaturada (g)	6.7	3.5	6.8	3.8	7.1	2.8	6.1	3.2	0.66
Micronutrientos									
Calcio (mg)	772.7	244.1	788.9	265.6	771.1	241.4	719.2	160.4	0.61
Hierro (mg)	11.5	4.6	11.6	4.7	11.5	5.4	11.2	3	0.95
Magnesio (mg)	145.7	60.1	143.6	57.3	135.5	60.7	166.2	67.6	0.29
Zinc (mg)	4.4	1.9	4.5	1.9	4	2	4.7	1.7	0.54
Vitamina A (ug)	395	278.9	430.6	314	297.6	161	400.4	254.2	0.18
Vitamina C (mg)	64.1	46.5	62.1	46.7	61.1	38.5	74.6	55.8	0.61
Vitamina D (mg)†	3.7	3.0	3.7	3.0	4.1	3.0	4.5	3.3	0.76
Vitamina E (mg)	2.9	1.6	3	1.7	2.8	1.6	2.9	1.4	0.96
Tiamina (mg)	0.9	0.3	0.9	0.3	0.8	0.3	0.9	0.3	0.68
Riboflavina (mg)	1	0.4	1.1	0.5	1	0.4	1	0.4	0.84
Niacina (mg)	9.5	4.6	10	5	8.9	4.6	8.6	3.2	0.43
Ácido fólico (ug)	123.1	95.8	126.5	77.9	124.4	148.6	109.7	64.1	0.83
Vitamina B6 (mg)	0.7	0.4	0.8	0.4	0.6	0.3	0.7	0.4	0.06
Vitamina B12 (ug)	1.9	1.2	2	1.5	1.6	0.7	1.7	0.8	0.26
Grupos de alimentos									
Grasas y aceites (g)†	13.5	4.1	12.2	3.7	16.4	5.0	13.5	3.7	0.69
Azúcar (g)	141.4	93.5	139.8	83.6	130.3	125.9	161.4	78.9	0.60
Cereales (g)	293.2	109.5	310.7	119	265.8	92.3	269.3	87.8	0.18
Frutas (g)	213.2	163.8	226.1	183.4	193.2	130.6	195.1	131.9	0.66
Verduras (g)	59.6	62.8	67.3	74.1	40.6	32.6	57.9	44.9	0.25
Lácteos (g)	248.8	132.5	246.4	127	241.1	141.3	267.1	146.2	0.82
Alimentos de origen animal (g)	118.4	70.6	122.3	72.4	116.7	72.3	107.1	64.8	0.75
Leguminosas (g)	66.1	60.9	62.1	60.7	76.3	71.5	66.5	47	0.67

† Variables retransformadas luego de usar el logaritmo natural para normalizarlas. Todas las variables fueron ajustadas por la ingesta de energía (kcal/d). Significancia $p < 0.05$ en la prueba *post hoc* de Tuckey.

7.5. ASOCIACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y LA DIETA

El consumo de fibra se asoció con menor abundancia de las familias Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae en niños con peso normal, mientras que el magnesio se asoció positivamente con este grupo de bacterias. Adicionalmente, en niños con peso normal, la ingesta de calcio y riboflavina se asoció positivamente con la familia Enterococcaceae, mientras que el consumo de azúcar se relacionó negativamente con esta familia. En contraste, en niños con sobrepeso u obesidad, la ingesta de vitamina A y de alimentos de origen animal se asoció con mayor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae. En este misma

categoría de IMC para la edad, la ingesta de energía, carbohidratos y lípidos se asoció negativamente con la familia Enterococcaceae, aunque los alimentos de origen animal mostraron una asociación positiva con esta familia. Finalmente, en niños con sobrepeso u obesidad, la ingesta de fibra y leguminosas mostró una asociación positiva con la abundancia de Lachnospiraceae-Ruminococcaceae (Tabla 6).

Tabla 6: Modelo lineal de la relación entre la dieta y la abundancia de las familias bacterianas de acuerdo al score Z del IMC para la edad.

Dieta	Bacteroidaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae		Enterococcaceae		Lactobacillaceae		Lachnospiraceae, Ruminococcaceae	
	(ln ng ADN por g heces)		(ln ng ADN por g heces)		(ln ng ADN por g heces)		(ln ng ADN por g heces)	
	Normal	SP/OB	Normal	SP/OB	Normal	SP/OB	Normal	SP/OB
Energía total (kcal/d)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	-0.010 (-0.010, 0.000) *	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)
Macronutrientos								
Fibra (g)	-0.100 (-0.200, 0.000) *	-0.020 (-0.170, 0.140)	-0.020 (-0.160, 0.120)	-0.190 (-0.480, 0.090)	0.020 (-0.150, 0.180)	-0.090 (-0.290, 0.120)	-0.080 (-0.190, 0.030)	0.140 (0.010, 0.280) *
Hidratos de carbono (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (-0.020, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	-0.030 (-0.060, -0.010) *	0.000 (-0.020, 0.020)	0.000 (-0.020, 0.020)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.010 (-0.010, 0.020)
Proteína (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.050 (-0.010, 0.100)	0.020 (-0.040, 0.070)	-0.050 (-0.150, 0.050)	0.020 (-0.040, 0.080)	0.000 (-0.070, 0.080)	0.000 (-0.040, 0.040)	0.020 (-0.030, 0.070)
Lípidos (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.010 (-0.030, 0.040)	-0.010 (-0.050, 0.020)	-0.090 (-0.150, -0.030) *	0.000 (-0.040, 0.040)	0.020 (-0.030, 0.070)	0.000 (-0.030, 0.030)	0.000 (-0.030, 0.030)
Micronutrientos								
Calcio (mg)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.010)	0.010 (0.000, 0.010) *	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.000)	0.000 (-0.010, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)
Hierro (mg)	0.000 (-0.100, 0.200)	-0.120 (-0.330, 0.090)	0.110 (-0.130, 0.360)	0.080 (-0.270, 0.430)	0.020 (-0.260, 0.310)	-0.230 (-0.510, 0.040)	0.050 (-0.140, 0.250)	0.010 (-0.180, 0.210)
Magnesio (mg)	0.000 (0.000, 0.000) *	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.030)	0.010 (-0.010, 0.030)	0.000 (0.000, 0.040)	0.000 (-0.010, 0.020)	0.010 (-0.010, 0.020)	0.010 (0.000, 0.020)
Zinc (mg)	0.000 (-0.300, 0.300)	-0.070 (-0.480, 0.340)	0.090 (-0.430, 0.620)	0.490 (-0.160, 1.140)	-0.160 (-0.760, 0.440)	-0.180 (-0.730, 0.370)	0.030 (-0.380, 0.440)	0.030 (-0.340, 0.410)
Vitamina A (ug)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (-0.010, 0.000) *	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (-0.010, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.000)
Vitamina C (mg)	0.000 (0.000, 0.000)	-0.010 (-0.020, 0.010)	0.000 (-0.020, 0.020)	0.000 (-0.030, 0.030)	0.000 (-0.020, 0.020)	-0.010 (-0.030, 0.010)	0.010 (-0.010, 0.020)	0.000 (-0.010, 0.020)
Vitamina D (mg)†	0.100 (-0.300, 0.400)	0.160 (-0.360, 0.690)	0.520 (-0.050, 1.090)	-0.010 (-0.870, 0.850)	-0.430 (-1.090, 0.230)	0.170 (-0.530, 0.870)	-0.010 (-0.470, 0.450)	0.140 (-0.340, 0.620)
Vitamina E (mg)	0.200 (-0.300, 0.600)	-0.090 (-0.770, 0.600)	-0.070 (-0.830, 0.690)	-0.970 (-2.040, 0.100)	0.360 (-0.500, 1.220)	-0.350 (-1.260, 0.560)	-0.200 (-0.780, 0.390)	-0.270 (-0.900, 0.350)
Tiamina (mg)	2.200 (-0.300, 4.700)	-1.370 (-4.690, 1.950)	2.700 (-1.430, 6.820)	-1.980 (-7.420, 3.470)	-2.160 (-6.770, 2.460)	-3.410 (-7.730, 0.920)	0.720 (-2.580, 4.020)	2.110 (-0.880, 5.090)
Riboflavina (mg)	0.300 (-1.000, 1.600)	-0.220 (-2.590, 2.150)	2.870 (0.920, 4.810) *	0.800 (-3.070, 4.670)	-0.650 (-3.040, 1.730)	-0.680 (-3.850, 2.480)	0.540 (-1.090, 2.160)	-0.030 (-2.200, 2.140)
Niacina (mg)	0.000 (-0.100, 0.200)	0.040 (-0.190, 0.270)	0.120 (-0.080, 0.330)	0.220 (-0.150, 0.580)	0.080 (-0.150, 0.320)	0.030 (-0.270, 0.330)	-0.020 (-0.180, 0.140)	0.110 (-0.090, 0.310)
Ácido fólico (ug)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.020)	0.000 (-0.010, 0.010)	-0.010 (-0.020, 0.010)	-0.010 (-0.020, 0.000)	0.010 (0.000, 0.020)	0.000 (0.000, 0.010)
Vitamina B6 (mg)	0.700 (-0.700, 2.100)	-0.040 (-2.530, 2.460)	1.210 (-1.100, 3.520)	1.690 (-2.350, 5.730)	-0.420 (-3.080, 2.240)	-1.190 (-4.510, 2.120)	0.470 (-1.340, 2.280)	2.130 (-0.030, 4.290)
Vitamina B12 (ug)	0.200 (-0.200, 0.600)	-0.380 (-1.350, 0.590)	0.490 (-0.100, 1.070)	-0.220 (-1.810, 1.380)	-0.310 (-1.040, 0.420)	-0.150 (-1.450, 1.160)	0.230 (-0.270, 0.730)	-0.280 (-1.170, 0.610)
Grupos de alimentos								
Grasas y aceites (g)†	0.000 (0.000, 0.000)	0.010 (0.000, 0.020)	0.000 (-0.030, 0.030)	0.000 (-0.010, 0.020)	0.000 (-0.030, 0.030)	0.000 (-0.010, 0.010)	-0.010 (-0.030, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)
Azúcar (g)	0.000 (0.000, 0.000)	-0.010 (-0.010, 0.000)	-0.010 (-0.020, 0.000) *	-0.010 (-0.020, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.000)
Cereales (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (-0.020, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	-0.010 (-0.030, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.020)	0.000 (-0.010, 0.000)	0.000 (-0.020, 0.000)
Frutas (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.010)	0.000 (0.000, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (0.000, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.000)	0.000 (-0.010, 0.000)	0.000 (0.000, 0.010)
Verduras (g)	0.000 (0.000, 0.000)	-0.010 (-0.030, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.030, 0.030)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.020, 0.030)	0.000 (-0.010, 0.000)	0.000 (-0.020, 0.020)
Lácteos (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (0.000, 0.010)	0.010 (0.000, 0.010)	0.010 (-0.010, 0.010)	-0.010 (-0.020, -0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (0.000, 0.010)
AOA (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.010 (0.000, 0.020) *	0.010 (-0.010, 0.020)	0.020 (0.000, 0.040) *	0.010 (0.000, 0.020)	0.000 (-0.010, 0.020)	0.010 (0.000, 0.020)	0.000 (-0.010, 0.010)
Leguminosas (g)	0.000 (0.000, 0.000)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.000 (-0.020, 0.010)	-0.010 (-0.030, 0.010)	0.010 (-0.010, 0.020)	-0.010 (-0.020, 0.010)	0.000 (-0.010, 0.010)	0.010 (0.000, 0.020) *

Los valores son coeficientes B (95% IC). Todas las variables fueron ajustadas por la ingesta de energía (kcal/d) † Variables normalizadas con el logaritmo natural *Asociación significativa p<0.05. AOA: Alimentos de origen animal.

7.4. ASOCIACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Las familias Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae se asociaron negativamente con el score Z de IMC para la edad, así como con la circunferencia de cintura, el índice cintura-estatura, la cantidad de grasa abdominal, el porcentaje de grasa abdominal, el cantidad de grasa corporal tota y el porcentaje de grasa coporal total. En contraste, la familia Lactobacillaceae mostró una asociación positiva con el score Z de IMC para la edad, la circunferencia de cintura, la cantidad de grasa coporal total y el porcentaje de grasa coporal total (**Tabla 7**). La circunferencia de cintura presentó la mayor R² ajustada; 16% de la variación en este indicador se explica por la asociación positiva con Lactobacillaceae y negativa con Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae.

Tabla 7. Modelo lineal de la relación entre las variables antropométricas y los marcadores bioquímicos de acuerdo a cada familia bacteriana.

Variables	Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae	Enterococcaceae	Lactobacillaceae	Lachnospiraceae-Ruminococcaceae
Antropométricas¹				
IMC para la edad	-0.19 (-0.32 , -0.05)*	-0.04 (-0.11 , 0.04)	0.09 (0.01 , 0.16)*	0.01 (-0.11 , 0.13)
Circunferencia cintura (cm)	-1.46 (-2.46 , -0.46)*	-0.46 (-1.02 , 0.10)	0.75 (0.19 , 1.31)*	-0.1 (-1.01 , 0.80)
Índice cintura estatura	-0.01 (-0.02 , 0.00)*	0.00 (0.00 , 0.00)	0.01 (0.00 , 0.01)*	0.00 (-0.01 , 0.01)
Grasa abdominal (g)	-274.01(-514.67 , -33.36)*	-87.32 (-224.5 , 49.87)	210.88 (75.21 , 346.55)*	32.93 (-184.66 , 250.52)
Grasa abdominal (%)	-0.98 (-1.94 , -0.02)*	-0.12 (-0.67 , 0.42)	0.64 (0.10 , 1.18)*	0.42 (-0.44 , 1.29)
Grasa corporal total (g)	-546.19 (-1021.37 , -71.01)*	-151.52 (-422.39 , 119.35)	402.59 (134.71 , 670.47)*	80.54 (-349.1 , 510.18)
Grasa corporal total (%)	-0.76 (-1.53 , 0.02)*	-0.01 (-0.45 , 0.43)	0.52 (0.08 , 0.96)*	0.39 (-0.31 , 1.1)
Bioquímicos²				
Colesterol total (mg/dL)	0.46 (-2.59 , 3.51)	1.22 (-0.43 , 2.87)	-1.43 (-3.13 , 0.27)	0.19 (-2.45 , 2.84)
Triglicéridos (mg/dl)	-2.99 (-7.16 , 1.18)	0.95 (-1.31 , 3.20)	1.77 (-0.55 , 4.09)	4.02 (0.40 , 7.63)*
HDL (mg/dL)	-0.17 (-1.21 , 0.87)	0.01 (-0.55 , 0.57)	-0.75 (-1.32 , -0.17)*	-0.61 (-1.51 , 0.29)
LDL (mg/dl)	1.46 (-0.65 , 3.56)	0.36 (-0.78 , 1.50)	-0.69 (-1.86 , 0.48)	0.77 (-1.05 , 2.60)
Glucosa (mg/dL)	-0.14 (-1.03 , 0.74)	-0.05 (-0.53 , 0.43)	0.07 (-0.42 , 0.57)	-0.79 (-1.56 , -0.02)
Insulina (uU/ml)	-0.23 (-0.8 , 0.34)	-0.25 (-0.55 , 0.04)	0.07 (-0.24 , 0.39)	-0.12 (-0.60 , 0.36)
HOMA index	-0.07 (-0.19 , 0.06)	-0.06 (-0.13 , 0.01)	0.01 (-0.06 , 0.09)	-0.05 (-0.16 , 0.06)
Leptina (ng/ml)†	-0.02 (-0.07 , 0.04)	0.00 (-0.03 , 0.03)	0.01 (-0.02 , 0.04)	0.01 (-0.04 , 0.06)
CRP (mg/L)	0.13 (-0.11 , 0.37)	0.00 (-0.13 , 0.12)	0.03 (-0.10 , 0.17)	0.02 (-0.19 , 0.22)
TNF-α (pg/ml)†	-0.06 (-0.12 , 0.00)*	0.00 (-0.03 , 0.03)	-0.01 (-0.04 , 0.02)	0.04 (0.00 , 0.09)
Interleucina 6 (pg/ml)	-0.24 (-0.81 , 0.34)	0.01 (-0.29 , 0.32)	0.01 (-0.3 , 0.32)	0.19 (-0.28 , 0.66)
Interleucina 10 (pg/ml)	0.50 (0.02 , 0.98)*	0.06 (-0.19 , 0.31)	-0.13 (-0.39 , 0.13)	-0.04 (-0.44 , 0.36)

¹ Coeficiente B (95% IC) El modelo analizado incluyó las 4 familias bacterianas.

² Coeficiente B (95% IC) El modelo analizado incluyó las 4 familias bacterianas y el IMC para la edad.

† Variables retransformadas luego de usar el logaritmo natural para normalizarlas. Todas las variables fueron ajustadas por la ingesta de energía (kcal/d). Significancia p<0.05 en la prueba *post hoc* de Tuckey.

7.5. ASOCIACIÓN ENTRE LA ABUNDANCIA DE LAS FAMILIAS BACTERIANAS Y FACTORES DE RIESGO METABÓLICO.

Las familias Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae se asociaron negativamente con los niveles de TNFa ($p=0.0034$) y positivamente con los niveles de IL-10 ($p=0.043$). La familia Lactobacillaceae se asoció negativamente con los niveles de colesterol HDL ($p=0.012$), mientras que las familias Lachnospiraceae-Ruminococcaceae se asociaron positivamente con los niveles de triglicéridos ($P=0.03$) (**Tabla 7**). El resto de las variables bioquímicas no se asociaron con ninguna de las familias bacterianas.

7.6. DIFERENCIAS EN LA MICROBIOTA DE ACUERDO A CATEGORÍAS DE RIESGO METABÓLICO

El análisis de covarianza mostró que existen diferencias en la abundancia de las familias bacterianas de la microbiota entre las categorías de peso normal, sobrepeso y obesidad de acuerdo al score Z del IMC para la edad. Entre los niños con obesidad, se observó una menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae cuando se comparó con los niños de peso normal y con los niños con sobrepeso. Además los niños con obesidad mostraron una mayor abundancia de Lactobacillaceae cuando se compararon con los niños de peso normal (**Figura 7A**). Los niños con relación cintura-estatura (>0.5) tuvieron significativamente menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae y mayor abundancia de Lactobacillaceae (**Figura 7B**). Los niños con un porcentaje de grasa abdominal por arriba de la mediana ($>24\%$) mostraron mayor abundancia de Lactobacillaceae (**Figura 1C**). En cuanto a los marcadores metabólicos, los niños con niveles de IL-10 por arriba de la media (>3.45 pg/mL) tuvieron mayor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae (**Figura 1D**). No se encontró diferencia entre la abundancia de las familias bacterianas entre las demás variables antropométricas y bioquímicas.

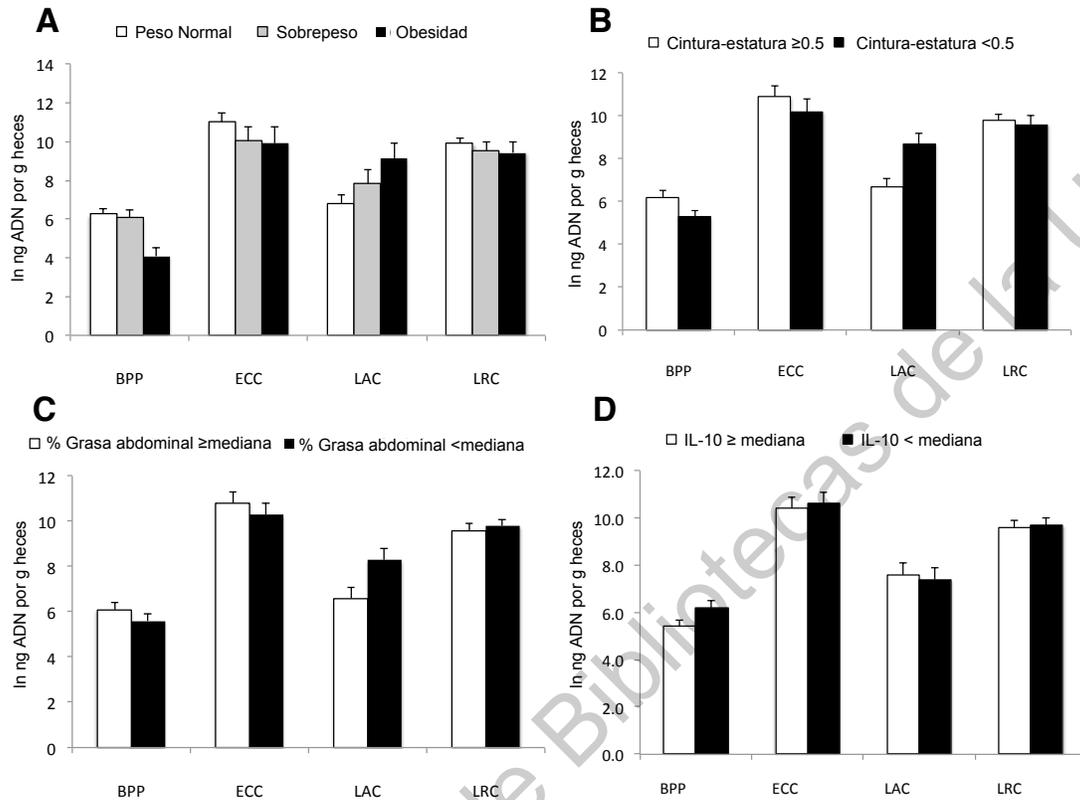


Figura 7. Comparación de medias de la abundancia de las familias bacterianas de acuerdo entre las variables antropométricas y bioquímicas. (A) Comparación entre niños con peso normal, sobrepeso y obesidad de acuerdo al score Z del IMC para la edad. (B) Comparación entre los niños con índice cintura-estatura igual o por debajo de 0.5 y niños con índice cintura-estatura por arriba de 0.5. (C) Comparación entre el porcentaje de grasa abdominal por debajo de la mediana y porcentaje de grasa abdominal por arriba de la mediana. (D) Comparación entre los niveles de IL-10 por debajo de la mediana y los niveles de IL-10 por arriba de la mediana. IL-10 fue ajustado por el score Z del IMC para la edad. * $p < 0.05$. BPP, Bacteroidaceae–Porphyromonadaceae–Proteobacteria; ECC, Enterococcaceae; LAC, Lactobacillaceae; LRC, Lachnospiraceae–Ruminococcaceae.

VIII.

DISCUSIÓN

La dieta es el principal impulsor de los cambios en la estructura de la microbiota y la composición corporal. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticas en la composición de la dieta entre los niños con peso normal, sobrepeso y obesidad, ni de acuerdo a su porcentaje de grasa. Este es un sesgo común en muchos estudios, ya que las herramientas de evaluación de la dieta se basan en el autoinforme de los participantes (Ma et al., 2009; Thedford et al., 1999). En este caso, los padres y cuidadores probablemente estén subestimando el consumo de ciertos componentes de la dieta como la energía, el azúcar y las grasas. Sin embargo, aun con esta limitación nuestros hallazgos sugieren que la dieta se asocia de manera diferente con las principales familias bacterianas del intestino según el IMC para la edad. En niños de peso normal, la ingesta de fibra se asocia con una menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae. Estudios previos han demostrado que los niños con una dieta alta en fibra presentan una microbiota dominada por Prevotella (De Filippo et al., 2010), y se ha demostrado que un mayor consumo de fibra se asocia con una alta riqueza bacteriana y cambios en la composición de la microbiota (Cotillard et al., 2013).

En nuestro estudio, el consumo de fibra se asocia negativamente con la abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae, lo cual se contrapone con los hallazgos de otros estudios. Esto puede deberse a que el consumo promedio de fibra entre los niños estudiados estuvo por debajo de la recomendación de 25 g por día (Institute of Medicine, 2005) y esto podría explicar por qué de la asociación negativa de fibra con Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae. Con respecto a la asociación positiva entre la ingesta de magnesio y Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae, hasta donde sabemos, no existen estudios que apoyen el mecanismo subyacente a esta relación, pero cabe la posibilidad de que una mayor ingesta de magnesio sea reflejo de un mayor consumo de alimentos de origen vegetal como cereales integrales y oleaginosas (USDA, 2009). La ingesta de azúcar se asocia con menor abundancia de Enterococcaceae, esta familia tiene la capacidad de obtener energía de diversas fuentes orgánicas como glicerol, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, α -cetoácidos y aminoácidos, lo que podría representar una ventaja para este grupo bacteriano ya que pueden utilizar proteínas como fuente de energía, en lugar de carbohidratos, específicamente azúcar (Di Cagno et al., 2013). Esto también puede explicar por qué la familia Enterococcaceae se asocia principalmente con la ingesta de alimentos de origen animal y una menor ingesta de carbohidratos, como lo muestran nuestros resultados.

En cuanto a micronutrientes, el calcio y la riboflavina se pueden encontrar de forma natural en la carne, los huevos, el pescado y los productos lácteos y su asociación positiva con Enterococcaceae puede deberse a la ingesta de estos alimentos, los cuales son categorizados como alimentos de origen animal. En niños con sobrepeso y obesidad, se encontraron nutrientes diferentes asociados con familias bacterianas a los encontrados en los niños con peso normal. En este caso, la ingesta de vitamina A y alimentos de origen animal se relacionó positivamente con la abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae. Un estudio coreano con adolescentes encontró que aquellos que consumían una dieta occidental modificada, caracterizada por una alta ingesta de alimentos de origen animal, exhibían una mayor proporción de Prevotellaceae (Jang et al., 2017). En nuestro estudio, la cuantificación de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae juntas no nos permitió distinguir cuál de las tres familias se ve afectada por la ingesta de alimentos de origen animal. Además, es importante abordar que la ingesta de vitaminas en los niños obesos podría ser mayor. Aunque no encontramos diferencias en la ingesta de nutrientes

entre los niños con peso normal, sobrepeso y obesidad; los niños con mayor peso tienden a comer más de todos los nutrientes y grupos de alimentos en comparación con los niños de peso normal.

La ingesta de fibra y leguminosas se asoció con una mayor abundancia de Lachnospiraceae-Ruminococcaceae. Estas familias comparten un papel común como degradadores de plantas ya que ejercen propiedades fibrolíticas, pudiendo digerir celulosa y hemicelulosa. Estos compuestos se fermentan en ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Biddle et al., 2013). Un estudio en niños encontró concentraciones significativamente más altas de AGCC en niños obesos que en niños de peso normal (Payne et al., 2011) ya que estos ácidos grasos pueden proporcionar una fuente adicional de energía al huésped (Schwiertz et al., 2009). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que las fuentes de fibra como las leguminosas, cuando son fermentadas por las familias Lachnospiraceae-Ruminococcaceae, pueden contribuir a una mayor extracción de energía de la dieta y contribuir a un mayor peso corporal.

Finalmente, la alteración de la microbiota intestinal mediante una dieta alta en grasas se ha sugerido como un mediador de los trastornos relacionados con la obesidad, la mayoría de ellos relacionados con la inflamación sistémica de bajo grado (Cani et al., 2008). En el presente estudio, la dieta alta en lípidos también disminuye la abundancia de Enterococcaceae, un grupo bacteriano transitorio ácido láctico que desempeña una función importante en la integridad del intestino (Pessione, 2012). Cuando ocurre un desequilibrio, la permeabilidad del intestino aumenta, lo que conduce a niveles más altos de lipopolisacáridos en el plasma, que se han asociado con la inflamación crónica (Caesar et al., 2015; Cani, 2012). Nuestro estudio muestra que la dieta puede tener una asociación diferencial entre las poblaciones bacterianas entre individuos con peso normal o sobrepeso y obesidad. Se requieren estudios experimentales que permitan trazar la influencia de los cambios en la dieta sobre la estructura de la microbiota en esta población.

En cuanto a la composición corporal, los niños con obesidad tuvieron una menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae y una mayor abundancia de Lactobacillaceae. Se observó un patrón similar con los marcadores de riesgo metabólico, donde la resistencia a la insulina, altos niveles de TNF- α y bajos niveles de interleucina 10 se asociaron con una menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae, mientras que niveles bajos de HDL y triglicéridos

altos asociados con una mayor abundancia de Lactobacillaceae y Lachnospiraceae-Ruminococcaceae, respectivamente.

La menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae en niños con obesidad y exceso de grasa corporal es similar a otros estudios transversales en niños. Un estudio reciente encontró que los niños obesos tenían una abundancia menor de Bacteroides-Prevotella-Prohyromonas spp. y una abundancia mayor de Firmicutes cuando se compara con niños de peso normal (Bervoets et al., 2013). De forma similar, se ha descrito una disminución en la familia Bacteroidaceae en niños con obesidad según el puntaje Z de IMC para la edad (Riva et al., 2017).

En la obesidad, una disminución de la abundancia de Bacteroidetes parece estar asociada con una mayor permeabilidad intestinal y, por lo tanto, con un aumento en la absorción de lipopolisacáridos (LPS) (Caricilli & Saad, 2013; Chakraborti, 2015; Saad et al., 2016). Se sabe que la obesidad está asociada con la inflamación subclínica crónica (McArdle et al., 2013) y se ha informado que el LPS derivado de bacterias Gram negativas intestinales está involucrado en el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina (Patrice D. Cani, Amar, et al., 2007). La microbiota contiene un gran reservorio de bacterias Gram negativas, como el grupo Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae (Moreira et al., 2012). El LPS producido por estas bacterias tiene una acción inmunomoduladora e induce tolerancia a endotoxinas (Vatanen et al., 2016). En nuestro estudio, los niños con menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae tuvieron un mayor riesgo cardiometabólico en concordancia con los estudios mencionados anteriormente.

Se observó además una gran abundancia de Lactobacillaceae en niños con obesidad visceral, bajo HDL y alto TNF- α . Un estudio que comparó pacientes obesos, de peso normal y anoréxicos mostró que el grupo obeso tenía una microbiota enriquecida en Lactobacillus (Armougom et al., 2009). De manera similar, se encontró una gran abundancia de especies de Lactobacillus en los niños obesos en otro estudio (Bervoets et al., 2013). Un metaanálisis mostró que algunas especies de Lactobacillus como *L. acidophilus*, *L. ingluviei* y *L. fermentum* están asociadas con el aumento de peso, mientras que *L. gasseri* y *L. plantarum* están asociadas con la pérdida de peso (Million et al., 2012). Estas diferencias se encuentran en el contenido de genes entre las especies. Los lactobacilos vinculados al aumento de peso carecen de enzimas implicadas en el metabolismo de la fructosa y albergan enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, mientras que las especies asociadas a la pérdida de peso tienen

enzimas implicadas en el metabolismo de fructosa, manosa, almidón y sacarosa (Drissi et al., 2017). Además, la familia Lactobacillaceae es un grupo heterogéneo con diferentes propiedades inmunomoduladoras. Algunas cepas de Lactobacillus son fuertes inductores de IL-12 y TNF- α , mientras que todas las cepas de Lactobacillus mejoran la producción de IL-10 en diferentes grados (Zeuthen et al., 2006). Adicionalmente, la suplementación con Lactobacillus ha mostrado resultados mixtos respecto a su efecto sobre los perfiles lipídicos (Y. A. Cho & Kim, 2015; Gary D. Wu et al., 2014). En conjunto, la evidencia empírica disponible indica que no todos los miembros de la familia Lactobacillaceae son beneficiosos para la salud humana. En nuestro estudio, se evaluó un amplio espectro de la familia Lactobacillaceae, que muestra que un aumento en esta familia se asocia con la obesidad y las alteraciones metabólicas. Se necesitan más estudios para definir qué miembros particulares de Lactobacillaceae contribuyen al desarrollo de la obesidad y las alteraciones metabólicas, y cuáles pueden usarse como probióticos en el tratamiento de la obesidad.

La interacción observada entre las familias Lactobacillaceae y Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae parece ser una consecuencia de la disbiosis observada en la población con obesidad y riesgo cardiometabólico. Mientras que una alta abundancia de Lactobacillaceae se asoció, por ejemplo, con la circunferencia de la cintura, se detectó una menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae. Esto podría ser parte de una sucesión secundaria en el ecosistema intestinal causada por una variedad de factores como el uso de antibióticos, estados inflamatorios o cambios en la dieta (Lozupone et al., 2012). El consumo de una dieta occidental típica (alta en grasas y alta en azúcar) se ha asociado con una disminución en el phylum de Bacteroidetes (Peter J. Turnbaugh et al., 2009) y esto también puede ocurrir en el grupo Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae. El aumento de la secreción biliar como consecuencia de una dieta alta en grasas también se ha asociado con la composición de la microbiota. La actividad antimicrobiana de los ácidos biliares podría conducir a una menor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae y el ambiente ácido resultante podría ser favorable para el establecimiento de una mayor abundancia de Lactobacillaceae (Sun et al., 2016). Es necesario realizar más estudios sobre el efecto que una dieta alta en grasas puede tener en la abundancia de estos grupos familiares para probar esta hipótesis.

Nuestros datos muestran que la composición de la microbiota fecal a nivel familiar es una forma más precisa y accesible de identificar las diferencias entre las características antropométricas, bioquímicas y de la dieta de los individuos. Los estudios publicados sobre la abundancia de Firmicutes y Bacteroidetes han arrojado resultados inconsistentes debido a la variabilidad observada dentro de cada phylum. Como informamos aquí, no todos los Firmicutes mantienen una gran abundancia en la obesidad. Lactobacillaceae, como una familia transitoria representativa del intestino humano, parece estar afectando la abundancia global de Firmicutes observada en algunos estudios. Además, observamos una asociación consistente entre una mayor abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae como grupo, con marcadores antropométricos más adecuados. Los estudios futuros deben considerar la cuantificación de estas tres familias de forma independiente para garantizar un análisis más detallado de la comunidad.

CONCLUSIÓN

El presente estudio sugiere que tanto la dieta como la composición corporal y los marcadores bioquímicos se asocian a fluctuaciones en la abundancia de las familias bacterianas. La ingesta de energía, grasa, fibra, leguminosas, productos animales y lácteos se relaciona de manera diferente con la abundancia de las principales familias bacterianas de la microbiota intestinal en niños en edad escolar de acuerdo a su IMC para la edad. El análisis de la microbiota a nivel de familia nos permitió identificar cómo a pesar de que el reporte de la dieta era igual entre los niños con peso normal, sobrepeso u obesidad, la asociación entre los nutrientes y la abundancia de las familias bacterianas fue diferente para cada grupo. La información obtenida sobre composición corporal y valores bioquímicos, dio información más contundente de cómo la una baja abundancia de Bacteroidaceae-Porphyromonadaceae-Prevotellaceae y una mayor abundancia de Lactobacillaceae se asocian con mayor IMC para la edad, mayor circunferencia de cintura, porcentaje de grasa y TNF- α , mientras que la proporción inversa de estas familias favoreció los niveles de IL-10 y colesterol HDL. El análisis de la microbiota a nivel de familia es una forma precisa y accesible de identificar las variaciones en las comunidades bacterianas y determinar su asociación con la dieta, la obesidad y los marcadores de riesgo cardiometabólico.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra65–ra237ra65.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), 473–493.
- Albenberg, L. G., & Wu, G. D. (2014). Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology*, 146(6), 1564–1572.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.058>
- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., Chamontin, B., & Ferrières, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1219–1223.
- Arenz, S., Ruckerl, R., Koletzko, B., & von Kries, R. (2004). Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28(10), 1247–1256. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802758>
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. *PLOS ONE*, 4(9), e7125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125>

- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15718–15723.
- Bailey, M. A., & Holscher, H. D. (2018). Microbiome-Mediated Effects of the Mediterranean Diet on Inflammation. *Advances in Nutrition*, *9*(3), 193–206. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy013>
- Barlow, S. E. (2007). Expert Committee Recommendations Regarding the Prevention, Assessment, and Treatment of Child and Adolescent Overweight and Obesity: Summary Report. *Pediatrics*, *120*(Supplement 4), S164–S192. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-2329C>
- Barman, M., Unold, D., Shifley, K., Amir, E., Hung, K., Bos, N., & Salzman, N. (2008). Enteric Salmonellosis Disrupts the Microbial Ecology of the Murine Gastrointestinal Tract. *Infection and Immunity*, *76*(3), 907–915. <https://doi.org/10.1128/IAI.01432-07>
- Bergström, A., Skov, T. H., Bahl, M. I., Roager, H. M., Christensen, L. B., Ejlerskov, K. T., Mølgaard, C., Michaelsen, K. F., & Licht, T. R. (2014). Establishment of Intestinal Microbiota during Early Life: a Longitudinal, Explorative Study of a Large Cohort of Danish Infants. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(9), 2889–2900. <https://doi.org/10.1128/AEM.00342-14>
- Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C., Goossens, H., Desager, K. N., & Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut

- microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathogens*, 5, 10. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-10>
- Bezirtzoglou, E. (1997). The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe*, 3(2-3), 173-177. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0102>
- Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., & Leschine, S. (2013). Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*, 5(3), 627-640. <https://doi.org/10.3390/d5030627>
- Bouchard, C. (2008). The magnitude of the energy imbalance in obesity is generally underestimated. *International Journal of Obesity*, 32(6), 879-880. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803796>
- Byrne, C. S., Chambers, E. S., Morrison, D. J., & Frost, G. (2015). The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, 39(9), 1331-1338. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.84>
- Caamaño, M. C., Gutierrez, J., García, O. P., Ronquillo, D., Martinez, G., & Rosado, J. L. (2015). Increased calorie intake at a specific mid-morning meal and increased intake of soft drinks are strongly associated with obesity in Mexican rural women. *Ecology of Food and Nutrition*, 54(2), 157-174. <https://doi.org/10.1080/03670244.2014.963573>
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D., & Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metabolism*, 22(4), 658-668. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.026>

- Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, *11*, 577–591. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>
- Cani, Delzenne, N. M., Amar, J., & Burcelin, R. (2008). Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathologie Biologie*, *56*(5), 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2007.09.008>
- Cani, Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., & Delzenne, N. M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, *50*(11), 2374–2383. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0>
- Cani, P. D. (2012). Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*, Supplement 4, 50–53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03866.x>
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G. R., Casteilla, L., ... Burcelin, R. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, *56*(7), 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>

- Cani, P. D., Plovier, H., Van Hul, M., Geurts, L., Delzenne, N. M., Druart, C., & Everard, A. (2016). Endocannabinoids—at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(3), 133.
- Carey, C. M., Kirk, J. L., Ojha, S., & Kostrzynska, M. (2007). Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Canadian Journal of Microbiology*, *53*(5), 537–550. <https://doi.org/10.1139/W07-039>
- Caricilli, A., & Saad, M. (2013). The Role of Gut Microbiota on Insulin Resistance. *Nutrients*, *5*(3), 829–851. <https://doi.org/10.3390/nu5030829>
- Céspedes, M. C., & Seringe, S. (1999). Preparación del paciente y colección de muestras para análisis de laboratorio clínico. *MEDISAN*, *3*(1), 31–35.
- Chakraborti, C. K. (2015). New-found link between microbiota and obesity. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, *6*(4), 110–119. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v6.i4.110>
- Chávez, M., Chavez, A., Roldan, J., Pérez-Gil, S., & Hernández, S. (1996). *Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México*. Librerías Carlos Cesarman.
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, *13*(4), 260–270.
- Cho, Y. A., & Kim, J. (2015). Effect of Probiotics on Blood Lipid Concentrations. *Medicine*, *94*(43). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001714>
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and

obesity: New insights. *Gut Microbes*, 3(3), 186–202.

<https://doi.org/10.4161/gmic.20168>

Conterno, L., Fava, F., Viola, R., & Tuohy, K. M. (2011). Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease? *Genes & Nutrition*, 6(3), 241–260.

<https://doi.org/10.1007/s12263-011-0230-1>

Cotillard, A., Kennedy, S. P., Kong, L. C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., Gougis, S., Rizkalla, S., Batto, J.-M., Renault, P., consortium, A. M., Doré, J., Zucker, J.-D., Clément, K., Ehrlich, S. D., ... Layec, S. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500(7464), 585–588.

<https://doi.org/10.1038/nature12480>

Dahllöf, I., Baillie, H., & Kjelleberg, S. (2000). rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3376–3380.

<https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3376-3380.2000>

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Julie E. Button, Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563.

<https://doi.org/10.1038/nature12820>

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut

- microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Dominguez-Bello, M. G., Blaser, M. J., Ley, R. E., & Knight, R. (2011). Development of the Human Gastrointestinal Microbiota and Insights From High-Throughput Sequencing. *Gastroenterology*, 140(6), 1713–1719. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.011>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Dong, T. S., & Gupta, A. (2019). Influence of Early Life, Diet, and the Environment on the Microbiome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 17(2), 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.08.067>
- Doré, J., & Corthier, G. (2010). The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34, S7–S15.

- Dowds, C. M., Blumberg, R. S., & Zeissig, S. (2015). Control of intestinal homeostasis through crosstalk between natural killer T cells and the intestinal microbiota. *Clinical Immunology*, *159*(2), 128–133.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.05.008>
- Drissi, F., Raoult, D., & Merhej, V. (2017). Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microbial Pathogenesis*, *106*, 182–194.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.006>
- Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity*, *32*(11), 1720–1724.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2008.155>
- Dupont, W. D., & Plummer, W. D. (1990). Power and sample size calculations. A review and computer program. *Controlled Clinical Trials*, *11*(2), 116–128.
- Ellis, K. J. (1997). Body composition of a young, multiethnic, male population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *66*(6), 1323–1331.
- Ellis, K. J., Abrams, S. A., & Wong, W. W. (1997). Body composition of a young, multiethnic female population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *65*(3), 724–731.
- Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents, & National Heart, Lung, and Blood Institute. (2012). Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents:

- Summary Report. *PEDIATRICS*, 128(Supplement), S213–S256.
<https://doi.org/10.1542/peds.2009-2107C>
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6141), 1237439.
<https://doi.org/10.1126/science.1237439>
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M. O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., & van Sinderen, D. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), 2108–2113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115621109>
- Farías, M., Silva, C., & Rozowski, J. (2011). Microbiota Intestinal: Rol en obesidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 38(2), 228–233.
<https://doi.org/10.4067/S0717-75182011000200013>
- Ferrer, M., Ruiz, A., Lanza, F., Haange, S.-B., Oberbach, A., Till, H., Bargiela, R., Campoy, C., Segura, M. T., Richter, M., von Bergen, M., Seifert, J., & Suarez, A. (2013). Microbiota from the distal guts of lean and obese adolescents exhibit partial functional redundancy besides clear differences in community structure. *Environmental Microbiology*, 15(1), 211–226.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02845.x>

- Festi, D., Schiumerini, R., Eusebi, L. H., Marasco, G., Taddia, M., & Colecchia, A. (2014). Gut microbiota and metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(43), 16079–16094. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16079>
- Finucane, M. M., Sharpton, T. J., Laurent, T. J., & Pollard, K. S. (2014). A Taxonomic Signature of Obesity in the Microbiome? Getting to the Guts of the Matter. *PLOS ONE*, 9(1), e84689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084689>
- Fiorucci, S., & Distrutti, E. (2015). Bile Acid-Activated Receptors, Intestinal Microbiota, and the Treatment of Metabolic Disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 21(11), 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.09.001>
- Garcia, O. P., Diaz, M., Rosado, J. L., & Allen, L. H. (2003). Ascorbic acid from lime juice does not improve the iron status of iron-deficient women in rural Mexico. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(2), 267–273.
- Geerlings, S. Y., Kostopoulos, I., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2018). Akkermansia muciniphila in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? *Microorganisms*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030075>
- Harder, T., Bergmann, R., Kallischnigg, G., & Plagemann, A. (2005). Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 162(5), 397–403. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi222>
- Hill, A. M., LaForgia, J., Coates, A. M., Buckley, J. D., & Howe, P. R. C. (2007). Estimating Abdominal Adipose Tissue with DXA and Anthropometry. *Obesity*, 15(2), 504–504. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.629>

- Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159–169. <https://doi.org/10.1038/nri2710>
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schütte, U. M. E., Beck, D. L., Abdo, Z., Fox, L. K., Williams, J. E., McGuire, M. K., & McGuire, M. A. (2011). Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021313>
- Institute of Medicine (Ed.). (2005). *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*. National Academies Press.
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 Informe Final de Resultados*. Instituto Nacional de Salud Pública.
http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf
- Jang, H. B., Choi, M.-K., Kang, J. H., Park, S. I., & Lee, H.-J. (2017). Association of dietary patterns with the fecal microbiota in Korean adolescents. *BMC Nutrition*, 3(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40795-016-0125-z>
- Jian, C., Luukkonen, P., Yki-Järvinen, H., Salonen, A., & Korpela, K. (2020). Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLOS ONE*, 15(1), e0227285.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227285>

- Kalliomäki, M., Collado, M. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2008). Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *87*(3), 534–538.
- Keskin, M., Kurtoglu, S., Kendirci, M., Atabek, M. E., & Yazici, C. (2005). Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics*, *115*(4), e500–e503.
<https://doi.org/10.1542/peds.2004-1921>
- Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Kling Bäckhed, H., Gonzalez, A., Werner, J. J., Angenent, L. T., Knight, R., Bäckhed, F., Isolauri, E., Salminen, S., & Ley, R. E. (2012). Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy. *Cell*, *150*(3), 470–480.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.008>
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. *Experimental Diabetes Research*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/902917>
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 11070–11075.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*, *124*(4), 837–848.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>

- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, *444*(7122), 1022–1023.
<https://doi.org/10.1038/4441022a>
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., ... Wang, J. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 834–841. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, *8*. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
- López-Contreras, B. E., Morán-Ramos, S., Villarruel-Vázquez, R., Macías-Kauffer, L., Villamil-Ramírez, H., León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Sánchez-Muñoz, F., Llanos-Moreno, L. E., Canizalez-Román, A., del Río-Navarro, B., Ibarra-González, I., Vela-Amieva, M., Villarreal-Molina, T., Ochoa-Leyva, A., Aguilar-Salinas, C. A., & Canizales-Quinteros, S. (2017). Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatric Obesity*, n/a – n/a.
<https://doi.org/10.1111/ijpo.12262>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, *489*(7415), 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>

- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., & de La Cochetiere, M.-F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*, *21*(4), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.12.001>
- Maya-Lucas, O., Murugesan, S., Nirmalkar, K., Alcaraz, L. D., Hoyo-Vadillo, C., Pizano-Zárate, M. L., & García-Mena, J. (2019). The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe*, *55*, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.009>
- Ma, Y., Olendzki, B. C., Pagoto, S. L., Hurley, T. G., Magner, R. P., Ockene, I. S., Schneider, K. L., Merriam, P. A., & Hébert, J. R. (2009). Number of 24-hour diet recalls needed to estimate energy intake. *Annals of Epidemiology*, *19*(8), 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2009.04.010>
- McArdle, M. A., Finucane, O. M., Connaughton, R. M., McMorrow, A. M., & Roche, H. M. (2013). Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. *Frontiers in Endocrinology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00052>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Palacio, S. D., Montes, S. A., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., Vos, W. de, Gueimonde, M., Margolles, A., Sinderen, D. van, & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *81*(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

- Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., & Raoult, D. (2012). Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis*, *53*(2), 100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.05.007>
- Moreira, A. P. B., Texeira, T. F. S., Ferreira, A. B., do Carmo Gouveia Peluzio, M., & de Cássia Gonçalves Alfenas, R. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *British Journal of Nutrition*, *108*(05), 801–809.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512001213>
- Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z., & Dominguez-Bello, M. G. (2015). The infant microbiome development: mom matters. *Trends in Molecular Medicine*, *21*(2), 109–117.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.002>
- Müller, M., Hernández, M. A. G., Goossens, G. H., Reijnders, D., Holst, J. J., Jocken, J. W. E., van Eijk, H., Canfora, E. E., & Blaak, E. E. (2019). Circulating but not faecal short-chain fatty acids are related to insulin sensitivity, lipolysis and GLP-1 concentrations in humans. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48775-0>
- Murugesan, S., Ulloa-Martínez, M., Martínez-Rojano, H., Galván-Rodríguez, F. M., Miranda-Brito, C., Romano, M. C., Piña-Escobedo, A., Pizano-Zárate, M. L., Hoyo-Vadillo, C., & García-Mena, J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *European Journal of Clinical Microbiology &*

- Infectious Diseases*, 34(7), 1337–1346. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2355-4>
- Nava, G. M., Friedrichsen, H. J., & Stappenbeck, T. S. (2011a). Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *The ISME Journal*, 5(4), 627–638. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.161>
- Nava, G. M., Friedrichsen, H. J., & Stappenbeck, T. S. (2011b). Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *The ISME Journal*, 5(4), 627–638. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.161>
- Nava, G. M., & Stappenbeck, T. S. (2011). Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut Microbes*, 2(2), 99–104. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.2.15416>
- Neis, E. P. J. G., Dejong, C. H. C., & Rensen, S. S. (2015). The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients*, 7(4), 2930–2946. <https://doi.org/10.3390/nu7042930>
- Nirmalkar, K., Murugesan, S., Pizano-Zárate, M., Villalobos-Flores, L., García-González, C., Morales-Hernández, R., Nuñez-Hernández, J., Hernández-Quiroz, F., Romero-Figueroa, M., & Hernández-Guerrero, C. (2018). Gut Microbiota and Endothelial Dysfunction Markers in Obese Mexican Children and Adolescents. *Nutrients*, 10(12), 2009.
- Owen, C. G., Martin, R. M., Whincup, P. H., Davey-Smith, G., Gillman, M. W., & Cook, D. G. (2005). The effect of breastfeeding on mean body mass index throughout life: a quantitative review of published and unpublished observational evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(6), 1298–1307.

Payne, A. N., Chassard, C., Zimmermann, M., Müller, P., Stinca, S., & Lacroix, C. (2011).

The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization. *Nutrition & Diabetes*, 1(7), e12.

<https://doi.org/10.1038/nutd.2011.8>

Pearson, T. A. (2003). Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease:

Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107(3), 499–511.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45>

Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P. A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F.,

Adams, H., van Ree, R., & Stobberingh, E. E. (2007). Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*, 56(5), 661–667.

<https://doi.org/10.1136/gut.2006.100164>

Pereira-Fantini, P. M., Laphorne, S., Joyce, S. A., Dellios, N. L., Wilson, G., Fouhy, F.,

Thomas, S. L., Scurr, M., Hill, C., Gahan, C. G., & others. (2014). Altered FXR signalling is associated with bile acid dysmetabolism in short bowel syndrome-associated liver disease. *Journal of Hepatology*, 61(5), 1115–1125.

Pérez-Escamilla, R., Melgar-Quiñonez, H., Nord, M., Álvarez, M. C., & Segall-Corrêa, A.

(2007). Escala Latinoamericana y Caribeña de Seguridad Alimentaria (ELCSA). *Perspectivas En Nutrición Humana*, 117–134.

- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *Fems Microbiology Reviews*, 38(5), 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1166–1177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>
- Riva, A., Borgo, F., Lassandro, C., Verduci, E., Morace, G., Borghi, E., & Berry, D. (2017). Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environmental Microbiology*, 19(1), 95–105. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13463>
- Robles-Alonso, V., & Guarner, F. (2013). Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 553–557.

- Romero, R., Hassan, S. S., Gajer, P., Tarca, A. L., Fadrosh, D. W., Nikita, L., Galuppi, M., Lamont, R. F., Chaemsaihong, P., Miranda, J., Chaiworapongsa, T., & Ravel, J. (2014). The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*, 2, 4. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-4>
- Rosado, J. L., Garcia, O. P., Ronquillo, D., Hervert-Hernández, D., Caamaño, M. del C., Martínez, G., Gutiérrez, J., & García, S. (2011). Intake of Milk with Added Micronutrients Increases the Effectiveness of an Energy-Restricted Diet to Reduce Body Weight: A Randomized Controlled Clinical Trial in Mexican Women. *Journal of the American Dietetic Association*, 111(10), 1507–1516. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.07.011>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2010). Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12204–12209. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
- Saad, M. J. A., Santos, A., & Prada, P. O. (2016). Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology*, 31(4), 283–293. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2015>
- Schroeder, B. O. (2019). Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology Report*, 7(1), 3–12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy052>

- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2009). Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*, 18(1), 190–195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(1), 190–195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 164(3), 337–340.
- Shen, J., Obin, M. S., & Zhao, L. (2013). The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(1), 39–58. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.001>
- Singh, R. K., Chang, H.-W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>
- Sun, J., Qiao, Y., Qi, C., Jiang, W., Xiao, H., Shi, Y., & Le, G. (2016). High-fat-diet-induced obesity is associated with decreased antiinflammatory *Lactobacillus reuteri* sensitive to oxidative stress in mouse Peyer's patches. *Nutrition*, 32(2), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.08.020>
- Sze, M. A., & Schloss, P. D. (2016). Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *mBio*, 7(4), e01018–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01018-16>

- Theford, K., Archer, S., Shayka, J., Gernhofer, N., Peters, E., Gowan, A., Johnson, K., & Horn, L. V. (1999). Comparison of a Food Frequency Questionnaire To 3–24 Hour Recalls in Young Women. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(9, Supplement), A92. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00719-1](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00719-1)
- Tilg, H., & Kaser, A. (2011). Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2126–2132. <https://doi.org/10.1172/JCI58109>
- Tomova, A., Bukovsky, I., Rembert, E., Yonas, W., Alwarith, J., Barnard, N. D., & Kahleova, H. (2019). The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00047>
- Tsai, F., & Coyle, W. J. (2009). The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Current Gastroenterology Reports*, 11(4), 307–313.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1131. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009).

The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine*, 1(6), 6ra14–ra16ra14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>

USDA. (2009). *National Nutrient Database for Standard Reference*.

<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>

Valle-Leal, J., Abundis-Castro, L., Hernández-Escareño, J., & Flores-Rubio, S. (2016).

Índice cintura-estatura como indicador de riesgo metabólico en niños.

Revista Chilena de Pediatría, 87(3), 180–185.

<https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.10.011>

Vatanen, T., Kostic, A. D., d’Hennezel, E., Siljander, H., Franzosa, E. A., Yassour, M.,

Kolde, R., Vlamakis, H., Arthur, T. D., Hämäläinen, A.-M., Peet, A., Tillmann, V.,

Uibo, R., Mokurov, S., Dorshakova, N., Ilonen, J., Virtanen, S. M., Szabo, S. J.,

Porter, J. A., ... Xavier, R. J. (2016). Variation in Microbiome LPS

Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell*, 165(4), 842–

853. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.007>

Wassenaar, T. m., & Panigrahi, P. (2014). Is a foetus developing in a sterile

environment? *Letters in Applied Microbiology*, 59(6), 572–579.

<https://doi.org/10.1111/lam.12334>

World Health Organization. (1992). *Physical growth and psychosocial development of*

children : monitoring and interventions, protocols I and II, the development and field-testing of techniques for monitoring.

<http://apps.who.int/iris/handle/10665/58541>

World Health Organization. (2006). Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatrica*, 95(S450), 76–85.

World Medical Association. (2013). *WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*.

Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., Philippe, C., Bridonneau, C., Cherbuy, C., Robbe-Masselot, C., Langella, P., & Thomas, M. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology*, 11, 61. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-61>

Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>

Wu, G. D., Compher, C., Chen, E. Z., Smith, S. A., Shah, R. D., Bittinger, K., Chehoud, C., Albenberg, L. G., Nessel, L., Gilroy, E., Star, J., Weljie, A. M., Flint, H. J., Metz, D. C., Bennett, M. J., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2014). Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*, gutjnl – 2014–308209. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308209>

- Xu, P., Li, M., Zhang, J., & Zhang, T. (2012). Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children. *BMC Microbiology*, *12*, 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-283>
- Xu, Y., Wang, N., Tan, H.-Y., Li, S., Zhang, C., & Feng, Y. (2020). Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00219>
- Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2014). Commensal microbial regulation of natural killer T cells at the frontiers of the mucosal immune system. *FEBS Letters*, *588*(22), 4188–4194. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.042>
- Zeuthen, L. H., Christensen, H. R., & Frøkiær, H. (2006). Lactic Acid Bacteria Inducing a Weak Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha Response in Human Dendritic Cells Inhibit Strongly Stimulating Lactic Acid Bacteria but Act Synergistically with Gram-Negative Bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, *13*(3), 365–375. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.3.365-375.2006>

XII.

ANEXO

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

12.1 Carta de aprobación de Comité de Bioética



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Querétaro, Qro, 10 de abril de 2014

Dra. Olga P. García O.
Investigadora
Facultad de Ciencias Naturales

Estimada Dra. García:

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Título	Resolución
Caracterización de la microbiota intestinal, marcadores de inflamación intestinal, y su relación con la composición corporal de niños escolares de una zona rural de Querétaro	Aprobado

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

Dra. Beatriz Rangel Peniche
Comité de Bioética
Facultad de Ciencias Naturales

12.2. Carta de consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INTRODUCCIÓN:

Se ha invitado a su hijo(a) a participar en un proyecto de investigación. Antes de aceptar es importante que entienda claramente de que se trata el estudio. Este documento puede contener palabras o términos que usted no comprenda; por favor pida a la persona que le esta entrevistando le explique cualquier duda. No firme este documento hasta que todas sus dudas le sean aclaradas y además esté convencido de querer que su hijo(a) participe en este estudio.

PROPÓSITO Y DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO:

Los parásitos intestinales como las amibas son los causantes de muchos problemas estomacales, y pueden tener consecuencias en la salud, como falta de crecimiento, deficiencia de vitaminas y minerales, y también se ha relacionado con mayor riesgo de sobrepeso y obesidad. El propósito del estudio es evaluar si los niños tienen estos parásitos y si están afectando a la salud de sus hijos.

PROCEDIMIENTOS

Se le tomará una muestra de sangre del brazo (15mL), aproximadamente 2 cucharadas soperas. La toma se realizará de la misma manera que en un laboratorio, utilizando material esterilizado y nuevo para cada niño(a). Con esta muestra se realizará el análisis de hemoglobina para diagnosticar anemia, glucosa para conocer riesgo de tener diabetes. Se pedirá una muestra de heces (popo) para determinar la presencia de parásitos, la muestra del tamaño de una nuez será depositada en un frasco el cual se les dará previamente y se entregara el día de la muestra de sangre.

EVENTOS ADVERSOS Y MOLESTIAS:

Puede ser que la toma de muestra de sangre le cause un poco dolor a su hijo(a) o que se presente un pequeño moretón (esto depende de la sensibilidad de la piel). No a todos les pasa; estas molestias son normales.

BENEFICIOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Todos los procedimientos del estudio se proporcionarán sin ningún costo para usted. Usted recibirá los resultados de los análisis de laboratorio que incluyen diagnóstico de anemia, evaluación de peso, estatura y los resultados de parásitos.

Con la participación de su hijo(a) en este estudio contribuirá a la generación de información científica para tratar problemas relacionados con la infección de parásitos.

CONFIDENCIALIDAD:

Su participación en este estudio será confidencial, es decir, no se hará referencia de usted, de su hijo o de su familia por su nombre en ningún reporte del estudio. Se asigna un número de caso y las iniciales para cada participante. Sólo los investigadores y médicos del estudio contarán con sus datos completos.

INFORMACION DE CONTACTO:

En caso de que usted quiera ampliar la información acerca del proyecto o en caso de una emergencia, llame al número (442) 192-12-00 extensión 5351, o al nextel (442) 341-9519 con la Dra. Olga García Obregón de la UAQ, responsable del estudio, o al (442) 192-1200 extensión 5346 con la Dra. Beatriz Rangel Peniche, representante del Comité de Bioética de la UAQ.

Cualquier información reciente que pueda afectar en su decisión de continuar participando en el proyecto se le comunicará inmediatamente.

EL CONSENTIMIENTO A PARTICIPAR:

"Yo entiendo que la participación de mi hijo(a) es voluntaria y que tengo el derecho de no aceptar que participe mi hijo(a) en el proyecto si esta es mi decisión. Entiendo que puede retirarse mi hijo(a) del estudio en cualquier momento. Yo he leído o me han leído esta información y se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio. Las respuestas a mis preguntas fueron resueltas de manera satisfactoria y se me ha dado una copia de este consentimiento. He recibido la explicación del estudio y sus términos. Libremente y sin presión alguna doy mi consentimiento para que mi hijo(a) participe en este estudio".

CONSENTIMIENTO INFORMADO**PARTICIPANTE****NOMBRE DEL PARTICIPANTE** _____**Nombre de la madre, padre o tutor:** _____**Domicilio** _____
_____**No. Telefónico:** _____**Firma de la madre, padre o tutor** _____**Fecha**

Día	mes	año

TESTIGO 1**Nombre del testigo** _____**Domicilio** _____
_____**No telefónico:** _____**Firma del testigo** _____**Fecha**

día	mes	año

TESTIGO 2**Nombre del testigo** _____**Domicilio** _____
_____**No telefónico:** _____**Firma del testigo** _____**Fecha**

día	mes	año

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Yo o mi representante hemos discutido con el participante la naturaleza y propósito del estudio, así como los posibles riesgos y beneficios de su participación. Considero que el participante ha recibido la información completa con un lenguaje comprensible y apropiado, además de haberle contestado sus dudas.

Nombre del investigador o representante _____**Firma del investigador** _____**Fecha de la
firma**

día	mes	año

No. Caso _____**INI.** _____

12.3. Historia clínica



Liénesse sólo con tinta azul
Código de identificación del sujeto

<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td></tr> </table> <p style="text-align: center; font-size: 8px;">No. Registro</p>					<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td></tr> </table> <p style="text-align: center; font-size: 8px;">Iniciales</p>					<p style="font-size: 8px;">Fecha</p> <table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> </table> <p style="font-size: 8px; text-align: center;">Día Mes Año</p>				

HISTORIA CLÍNICA

Años Meses

Edad

Nombre de la escuela _____ **Grado y grupo**

1. Sexo 1) Femenino 2) Masculino
2. Domicilio: _____
3. Comunidad: _____
4. ¿Con quién vive el niño? 1) Ambos padres 2) Sólo Mamá 3) Solo Papá 4) Otros (abuelos, etc.)
- 4 (a). Mencione el parentesco _____
5. Si es el caso, motivo por el que el niño no vive con los padres _____
6. ¿Quién cuida al niño la mayor parte del día? 1) Mamá 2) Abuela 3) Tía 4) Hna. Mayor 5) Otro
7. ¿El niño acudió al preescolar? 1) SI 2) NO
8. ¿Tipo de preescolar? 1) Público 2) Privado

DATOS DE LOS PADRES		
	DATOS DE LA MADRE	DATOS DEL PADRE
Edad (en años)	9.	10.
Ocupación	11.	12.
Escolaridad	13.*	14.*
Discapacidad física y/o Enfermedad crónica	15.	16.

*Para los reactivos 13 (13 a) y 14	
1) No asistió a la escuela	7) Carrera técnica (computación, secretariado, inglés, etc.)
2) No asistió a la escuela, pero sabe leer y escribir	8) Bachillerato incompleto
3) Primaria Incompleta	9) Bachillerato completo
4) Primaria Completa	10) Licenciatura incompleta
5) Secundaria incompleta	11) Licenciatura (Titulado)
6) Secundaria completa	12) Postgrado (diplomados, especialidades, maestría, etc.)

Si el niño es cuidado por otra persona y no por la madre o padre proporcione los datos de la persona que lo cuida.

DATOS DE QUIEN CUIDA AL NIÑO	
Edad (en años)	9 a.
Ocupación	11 a.
Escolaridad	13 a.*
Discapacidad física Enfermedad Crónica	15 a.

Página 1 de 4

DATOS DE EMBARAZO Y PARTO

17. ¿Usted quería embarazarse? 1) SI 2) NO
18. ¿Cuántos embarazos ha tenido incluyendo el del niño?
(contar embarazos no terminados, abortos)
19. ¿Sufrió la madre alguna enfermedad o traumatismo durante el embarazo? 1) SI 2) NO
(caídas, golpes, etc.)
- 19 (a). Si es el caso, mencione ¿Cuál? o ¿Cuáles? _____
20. ¿Existieron problemas durante el desarrollo fetal del niño? 1) SI 2) NO
(Ej. amenaza de aborto)
- 20 (a). Si es el caso, mencione ¿Cuál? o ¿Cuáles? _____
21. ¿La madre consumió bebidas alcohólicas durante el embarazo? 1) SI 2) NO
22. ¿La madre fumó durante el embarazo? 1) SI 2) NO
23. ¿Edad gestacional? 1) Prematuro (meses) _____ 2) Término (9 meses)
(tiempo de embarazo)
24. ¿Cuál fue el peso del niño al nacer? _____
25. ¿Cuál fue la talla del niño al nacer? _____
26. ¿El niño fue amamantado? 1) SI 2) NO
- 26 (a). ¿Cuánto tiempo? (meses) _____

DATOS DE HERMANOS

27. ¿Cuántos hermanos tiene el niño en total? (no incluya al niño)
28. Lugar que ocupa el niño dentro del orden de nacimiento
(1º, 2º, etc.)

ANTECEDENTES FAMILIARES DE SALUD

29. De las siguientes enfermedades mencione cuáles existen o existieron en la familia de los padres.
(Abuelos, tíos, hermanos, suegros, cuñados, etc.)

ENFERMEDAD	1) SI	2) NO	ENFERMEDAD	1) SI	2) NO
a) Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	g) Problemas cardiacos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b) Alcoholismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	h) Violencia (física ó verbal)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c) Drogadicción	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	i) Asma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d) Cáncer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	j) Hipertensión arterial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e) Epilepsia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	k) Otra	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f) Alteraciones mentales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	¿Cuál?		



Liénesse sólo con tinta azul
Código de identificación del sujeto

Fecha

No. Registro			

Iniciales			

Día		Mes		Año	

DESARROLLO GENERAL DEL NIÑO

30. ¿Qué enfermedades ha tenido el niño?

ENFERMEDAD	1) SI	2) NO	ENFERMEDAD	1) SI	2) NO
a) Sarampión	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	i) Problemas digestivos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c) Paperas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	j) Varicela	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d) Hepatitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	k) Se orina en la cama	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e) Anemia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	l) Crisis convulsivas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f) Problemas visuales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	m) Problemas dermatológicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g) Problemas auditivos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	n) Discapacidad física	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h) Alergias e intolerancias**	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	o) Otros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			¿Cuáles?		

31. ¿A que es alérgico y/o intolerante el niño?

	1) SI	2) NO	Especifique cuáles	Síntomas
a) Alimentos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
b) Medicamentos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
c) Otro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

32. ¿Se ha enfermado en las dos últimas semanas? 1) SI 2) NO

32 (a). Especifique de qué _____

33. ¿El niño come bien? 1) SI 2) NO (conteste 33(a))

33 (a) ¿Especifique por qué no? _____

34. ¿Dio al niño algún medicamento en las 2 últimas semanas? 1) SI 2) NO

34 (a). Especifique cuál _____

35. ¿El niño está tomando algún suplemento de vitaminas y/o minerales? 1) SI 2) NO

35 (a). Especifique cuál _____

35 (b). ¿Desde cuándo? _____

35 (c). ¿Quién lo recetó? _____

36. ¿El niño controla esfínteres? 1) SI 2) NO

37. ¿El niño ha requerido hospitalizaciones? 1) SI 2) NO

38. ¿Por cuánto tiempo estuvo hospitalizado? _____

39. ¿Cuál fue la causa de la hospitalización? _____

40. ¿El niño ha tenido golpes fuertes en la cabeza? 1) SI 2) NO

41. ¿A que edad el niño sufrió el golpe en la cabeza? _____

42. ¿El niño perdió el conocimiento? 1) SI 2) NO

43. ¿Qué tipo de atención recibió el niño?

1) Atención médica 2) Atención de la mamá 3) No recibió atención

44. ¿Cuál es el lado dominante del niño? 1) Diestro 2) Zurdo 3) Ambidiestro

PROBLEMAS INTESTINALES

45. ¿El niño ha presentado diarrea en las últimas 4 semanas? 1) SI 2) NO

46. Duración de la diarrea 1) < 1 semana 2) > 1 semana 3) > 4 semanas 4) Interrumpidamente

47. Severidad de la diarrea 1) Menos de 3 evacuaciones por día 2) de 3 a 7 evacuaciones por día 3) Más de 7 evacuaciones por día

48. ¿Cuándo fue la última vez que el niño fue desparasitado? _____

49. ¿Con qué medicamento? _____

ESQUEMA DE VACUNACIÓN

50. ¿El niño tiene todas las vacunas? 1) SI 2) NO

Indique las vacunas que han sido aplicadas a su hijo desde el nacimiento hasta el día de hoy.

Nombre de la Vacuna	¿Le fue aplicada la vacuna?		Reacciones adversas
BCG (Tuberculosis)	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
Polio	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
DPT (difteria, tos ferina y tétanos)	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
Anti <i>Haemophilus influenzae</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
Hepatitis B	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
Triple viral (SRP)	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
Otro	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	

Observaciones

Aplicador: _____

Iniciales

Firma del Investigador Principal _____

Día Mes Año

Página 4 de 4

12.4. Cuestionario Socio-Económico

Llénesse sólo con pluma negra

SEP-2004-48183/FNN Número de Caso:

Iniciales(nombre del sujeto):

Fecha de aplicación:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Ciencias Naturales, Escuela de Nutrición

Proyecto Leptina-Antioxidantes

Nombre: _____

Edad: Fecha de nacimiento:
Años Meses

CUESTIONARIO SOCIOECONÓMICO

1. ¿Cuántas personas viven en la casa? (incluya si es el caso, tíos, primos, abuelos etc.)

2. ¿Cuántas personas duermen en la casa?

3. ¿Cuántas personas comen en la casa?

4. Número total de habitaciones (total de cuartos en la casa incluyendo cocina, baño, recamaras, sala, comedor)

5. ¿Cuántos cuartos utilizan como dormitorios en la casa?

6. ¿En donde se encuentra la cocina?

1 Dentro de la vivienda, independiente de los dormitorios.
2 Dentro de la vivienda, sólo hay 1 habitación para todo.
3 Fuera de la vivienda.

7. Número de familias que viven en el terreno, y comparten algunas habitaciones (como la cocina)

8. ¿Cuenta con agua entubada?

1 Si
2 No

8a ¿Cómo obtiene agua para la vivienda?

1 Obtiene el agua de una llave pública
2 Existe tubería fuera de la vivienda pero dentro del terreno
3 Existe tubería dentro de la vivienda (lavabo, tarja)
4 Otras

9. ¿Cuenta con baño?

1 Si
2 No

9a ¿Cómo está construido el baño?

1 Fosa (letrina)
2 Drenaje

Página 1 de 2

Llénesse sólo con pluma negra

SEP-2004-48183/FNN

Número de Caso:

--	--	--	--

Iniciales(nombre del sujeto):

--	--	--	--

Fecha de aplicación:

--	--	--

CUESTIONARIO SOCIOECONÓMICO**10. ¿El material de la mayor parte de las paredes de la casa es de?**

- 1 Lámina.
- 2 Cartón
- 3 Madera
- 4 Adobe (bloques de lodo)
- 5 Tabique o similares (bloc)
- 6 Otros
- 7 Piedra

11. ¿El material de la mayor parte de los pisos es de?

- 1 Tierra
- 2 Cemento firme
- 3 Loseta
- 4 Otros

12. ¿El material de la mayor parte del techo de la casa es de?

- 1 Teja.
- 2 Lámina de cartón
- 3 Lámina de asbesto
- 4 Madera
- 5 Cemento o loza
- 6 Tabique rojo (listoncillo)
- 7 Otros

13. ¿A quién pertenece la vivienda?

- 1 Rentada.
- 2 Es casa propia.
- 3 Otros.

14. ¿Cuál es el medio de transporte que utiliza con mayor frecuencia?

- 1 Bicicleta
- 2 Motocicleta
- 3 Automóvil
- 4 Transporte público
- 5 Otros

Llénesse sólo con pluma negra

SEP-2004-48183/FNN

Número de Caso:

--	--	--	--

Iniciales(nombre del sujeto):

--	--	--	--

Fecha de aplicación:

--	--	--	--

CUESTIONARIO SOCIOECONÓMICO

15. Lista de objetos con los que se cuenta en la casa

	SI	NO
a Estufa	SI	NO
b Máquina de coser	SI	NO
c Teléfono	SI	NO
d Celular	SI	NO
e Bicicleta	SI	NO
f Motocicleta	SI	NO
g Automóvil	SI	NO
h Luz eléctrica (marque con un asterisco si no existe medidor)	SI	NO
i Radio o grabadora (modular, toca cintas)	SI	NO
j Televisión	SI	NO
k Refrigerador	SI	NO
l Videocasetera	SI	NO
m DVD	SI	NO
n TV por cable (cablevisión, sky, etc)	SI	NO
ñ Horno de microondas	SI	NO
o Computadora	SI	NO
p Videojuegos	SI	NO

OBSERVACIONES:

Aplicó:

--	--	--	--

12.5. Cuestionario de Seguridad Alimentaria

Llénesse sólo con pluma negra



Código de identificación del sujeto

No. ID			

Iniciales	

Fecha

Día		Mes		Año	

CUESTIONARIO SOBRE SEGURIDAD ALIMENTARIA

Ahora le voy a hacer algunas preguntas que tienen que ver con su alimentación de cuando usted era niña; "por favor piense en aquella época".

- 1 ¿Usted tiene la necesidad de dar a su hijo ciertos alimentos que usted no tuvo cuando era niña?
 SI NO NS/NR
- 2 ¿Su familia comía los mismos alimentos diariamente porque no había suficiente dinero o recursos para otros alimentos?
 SI NO NS/NR
- 3 ¿Había ocasiones en el mes o el año cuando su familia daba poco alimento? (porciones pequeñas)
 SI NO NS/NR
- 4 ¿Usted tuvo que dividir en pequeñas cantidades la ración de carne para todos los miembros de la familia, porque no tenía suficiente para cada uno?
 SI NO NS/NR
- 5 ¿Usted, cuando era niña trabajó para ayudar a su familia a comprar alimentos?
 SI NO NS/NR
- 6 ¿Cuándo usted era niña, había ocasiones en que sus padres no tenían suficiente para comer?
 SI NO NS/NR
- 7 ¿Cuándo usted era niña, había ocasiones en que usted no tenía suficiente para comer?
 SI NO NS/NR

Ahora voy a hacerle preguntas sobre su alimentación, la alimentación en su hogar y de sus niños durante el mes pasado; por favor ahora piense en lo que pasó en los últimos 30 días.

- 1 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Usted se preocupó de que la comida se acabara?
 SI NO NS/NR
- 2 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Se quedaron sin comida?
 SI NO NS/NR
- 3 En el último mes, alguna vez ¿Se quedaron sin dinero o recursos para obtener una alimentación sana y variada?
 SI NO NS/NR
- 4 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Usted o algún adulto en su hogar tuvo una alimentación basada en muy poca variedad de alimentos?
 SI NO NS/NR

1

CUESTIONARIO SOBRE SEGURIDAD ALIMENTARIA

- 5 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Usted o algún adulto en su hogar dejó de desayunar, comer o cenar?
 SI NO NS/NR
- 6 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Algún adulto en su hogar comió menos de lo que usted piensa debía comer?
 SI NO NS/NR
- 7 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Usted o algún adulto de este hogar sintió hambre pero no comió?
 SI NO NS/NR
- 8 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Usted o algún adulto en su hogar solo comió una vez al día o dejó de comer todo un día?
 SI NO NS/NR
- 9 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Tuvieron que hacer algo que hubiera preferido no hacer para conseguir comida, tal como mendigar (pedir limosna) o mandar a los niños a trabajar?
 SI NO NS/NR
- 10 ¿En este hogar viven niños o niñas menores de 18 años? ¿Cuántos? **CUÁNTOS MENORES DE 18 AÑOS**
 (0) No, no hay menores, de por terminada la entrevista
- 11 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Algún menor de 18 años en su hogar dejó de tener una alimentación sana y variada?
 SI NO NS/NR
- 12 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Algún menor de 18 años en su hogar tuvo una alimentación basada en muy poca variada de alimentos?
 SI NO NS/NR
- 13 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Algún menor de 18 años en su hogar comió menos de lo que debía?
 SI NO NS/NR
- 14 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿tuvieron que disminuir la cantidad servida en las comidas a algún menor de 18 años del hogar?
 SI NO NS/NR
- 15 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Algún menor de 18 años sintió hambre pero no comió?
 SI NO NS/NR
- 16 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Algún menor de 18 años se acostó con hambre?
 SI NO NS/NR
- 17 En el último mes, por falta de dinero o recursos, alguna vez ¿Algún menor de 18 años solo comió una vez al día o dejó de comer todo un día?
 SI NO NS/NR

Realizó: Verificó:

Fecha de Verificado

Dia	Mes	Año			

12.6. Frecuencia de alimentos



Liénesse sólo con tinta azul

Código de identificación del sujeto

--	--	--	--

ID

--	--

Iniciales

Fecha de Aplicación

--	--	--	--	--	--	--

Día Mes Año

FRECUENCIA DE ALIMENTOS

VERDURAS Y FRUTAS									
ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	En temporada	CODIGO		
	Día	Semana	Mes	Año					
1	Betabel								
2	Brócoli								
3	Calabacitas								
4	Cebolla								
5	Champiñón								
6	Chayote								
7	Chícharo								
8	Chilaca								
9	Chile poblano								
10	Col								
11	Coliflor								
12	Ejotes								
13	Elote								
14	Huitlacoche								
15	Jitomate								
16	Lechuga								
17	Nopales								
18	Pepino								
19	Pimiento morrón rojo, verde, amarillo, anaranjado								
20	Rábano								
21	Verdolaga / acelga / quelites/ espinaca								
22	Zanahoria								
23	Salsa verde								
24	Salsa roja								
25	Durazno								
26	Fresa								

Página 1 de 5

	ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	En temporada	CODIGO
		Día	Semana	Mes	Año			
27	Garambullo							
28	Guayaba							
29	Jícama							
30	Lima							
31	Limón							
32	Granada							
33	Higos							
34	Ciruella							
35	Mandarina							
36	Mango							
37	Manzana							
38	Melón							
39	Naranja							
40	Papaya							
41	Pera							
42	Piña							
43	Plátano							
44	Sandía							
45	Toronja							
46	Tuna							
47	Uvas							

LEGUMINOSAS

	ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	CODIGO
		Día	Semana	Mes	Año		
48	Frijoles						
49	Habas						
50	Lentejas						
51	Soya texturizada						
52	Garbanzo						



Liénesse sólo con tinta azul

Código de identificación del sujeto

--	--	--	--

ID

--	--

Iniciales

Fecha de Aplicación

--	--	--	--	--	--

Día

Mes

Año

LACTEOS

	ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	CODIGO
		Día	Semana	Mes	Año		
53	Leche fresca entera (cartón)						
54	Leche bronca						
55	Leche en polvo						
56	Leche descremada (light)						
57	Queso, panela, ranchero y oaxaca						
58	Queso manchego, asadero, amarillo,						
59	Yogurt con frutas (sabor)						
60	Danonino						
61	Yakult						

CARNES

	ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	CODIGO
		Día	Semana	Mes	Año		
62	Carne de res, bistec, molida, trozos						
63	Carne de cerdo, bistec, trozos						
64	Carnitas						
65	Hígado de res						
66	Menudo						
67	Barbacoa de borrego						
68	Pollo						
69	Menudencia de pollo						
70	Huevo						
71	Pavo o guajolote						
72	Atún						
73	Sardina						
74	Pescado, filete (pieza ó en caldo)						
75	Caldo de camarón						
76	Cóctel de mariscos (Camarón, pulpo, ostiones)						

EMBUTIDOS

ALIMENTO		Número de veces al				Nunca	CODIGO
		Día	Semana	Mes	Año		
77	Jamón						
78	Salchicha						
79	Mortadela						
80	Queso de puerco						
81	Longaniza / Chorizo						

ALIMENTOS PREPARADOS

ALIMENTO		Número de veces al				Nunca	CODIGO
		Día	Semana	Mes	Año		
82	Arroz rojo, blanco, amarillo						
83	Sopa de pasta, seca y aguada						
84	Sopa instantánea						
85	Camote						
86	Papa						
87	Avena cocida o instantánea						
88	Galletas dulces						
89	Galletas saladas						
90	Cereal de caja (zucaritas, corn flakes)						
91	Pan dulce						
92	Pastelitos, gansito, pingüinos						
93	Barras de cereal						
94	Pan integral bimbo, wonder						
95	Pan blanco bimbo, wonder						
96	Bolillo						
97	Tortilla de harina						
98	Tortilla de maíz						
99	Gorditas queso, migajas						
100	Sopes						
101	Pizza						
102	Hot dogs, hamburguesa						
103	Tacos al pastor, bistec, etc						
104	Tamales de carne, queso, dulces						
105	Frituras (Churritos, papas)						
106	Palomitas						



Llénesse sólo con tinta azul

Código de identificación del sujeto

ID

Iniciales

Fecha de Aplicación

Día

Mes

Año

GRASAS

ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	CODIGO
	Día	Semana	Mes	Año		
107 Aceite vegetal						
108 Aguacate						
109 Cacahuete, almendra, nuez, semillas						
110 Crema						
111 Manteca						
112 Mantequilla						
113 Mayonesa						
114 Chicharrón de cerdo						
115 Mole verde, rojo						

AZUCARES

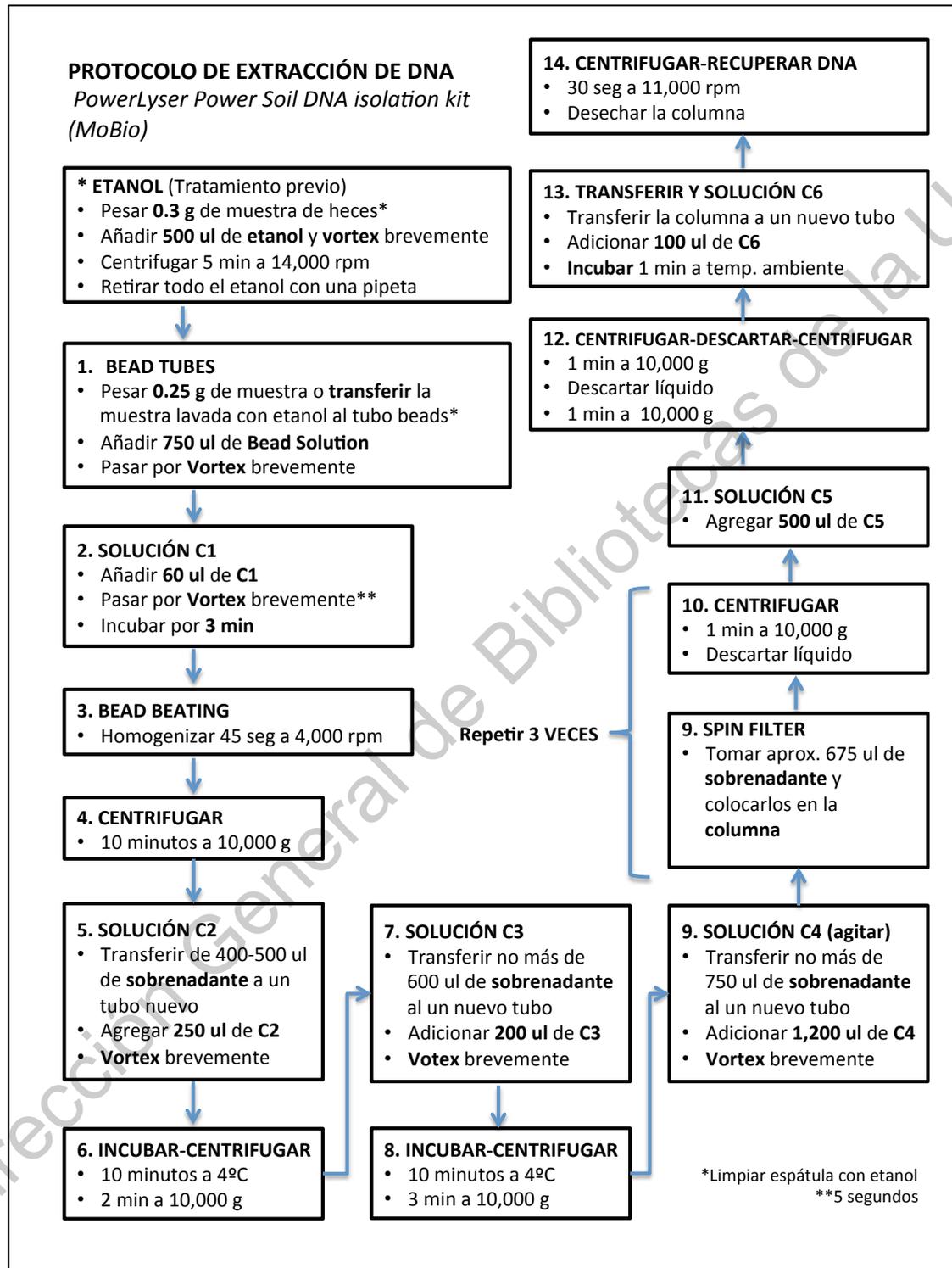
ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	CODIGO
	Día	Semana	Mes	Año		
116 Azúcar						
117 Chocolate en polvo						
118 Chocolate en barra						
119 Dulces (paletas)						
120 Mermelada						
121 Miel						
122 Helado (crema)						
123 Nieve (agua)						
124 Catsup						

BEBIDAS

ALIMENTO	Número de veces al				Nunca	CODIGO
	Día	Semana	Mes	Año		
125 Agua de fruta natural						
126 Bebidas con saborizante (Tang, Frisco, Clight, Kool-Aid)						
127 Gatorade						
128 Atole (Harina y leche)						
129 Atole (Harina y agua)						
130 Refrescos (coca, manzana)						
131 Jugo natural, naranja, zanahoria						
132 Jugo embotellado						
133 Café						
134 Té						

OBSERVACIONESRealizó: Verificó: Fecha de verificación:

12.8. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA



12.9. Protocolo RPOB

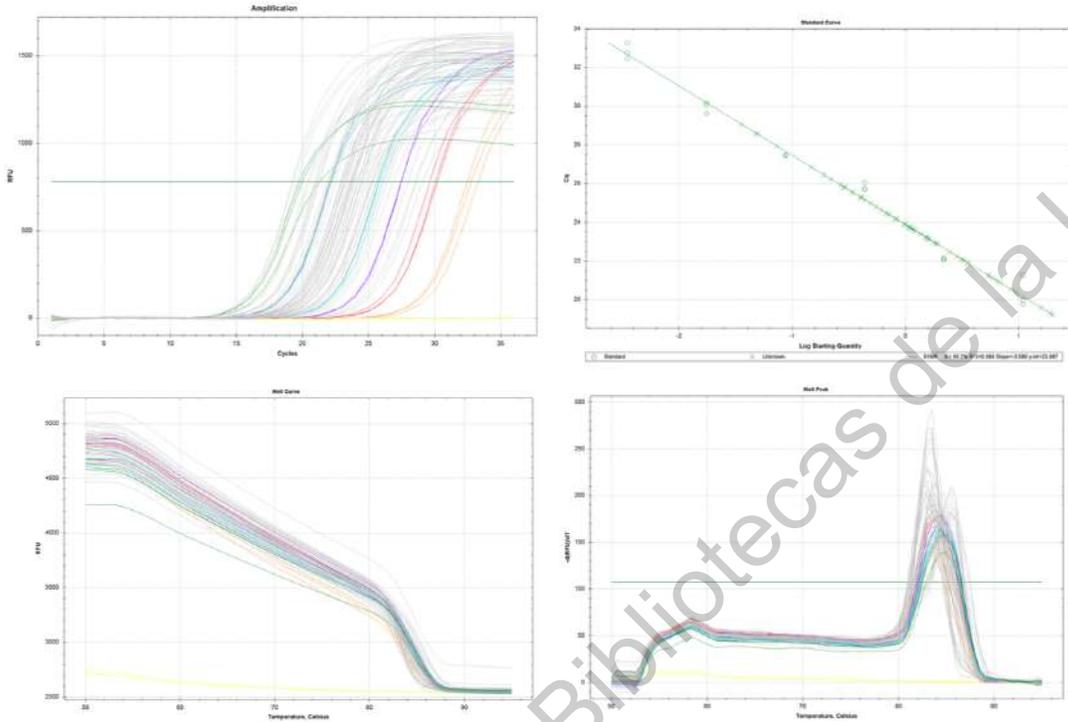
CURVA ESTÁNDAR (Dilución 1:5 seriada Vol: 100 ul)				
Pool	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución
55 ng / ul	20 ul pool	20 ul D1	20 ul D2	Tomar
	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	Completar
	11.000	2.200	0.440	Concentración final
	Dilución 4	Dilución 5	Dilución 6	Dilución
	20 ul D3	20 ul D4	20 ul D5	Tomar
	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	Completar
	0.088	0.002	0.001	Concentración final
MIX RPOB				
REACTIVO	LOTE	BASE	TOTAL MM	UNIDAD
H2O		1.05	105	ul
Sybr Green Mix		7.5	750	ul
Primer F		0.6	60	ul
Primer R		0.6	60	ul
BSA		2.25	225	ul
DNA		3	x	ul
TOTAL	12 ul	15	1200	ul
qPCR Mixture	15 ul	Reacciones	93	100
PROTOCOLO RPOB				Observaciones
PASO	TEMP	TIEMPO	CICLOS	
DN inicial	95°C	2 min		
DN	95°C	45 seg	x 35 ciclos	
Alineación	55°C	1 min		
Extensión	72°C	1 min		
Extensión final	72°C	5 min		

12.10. Protocolo Familias

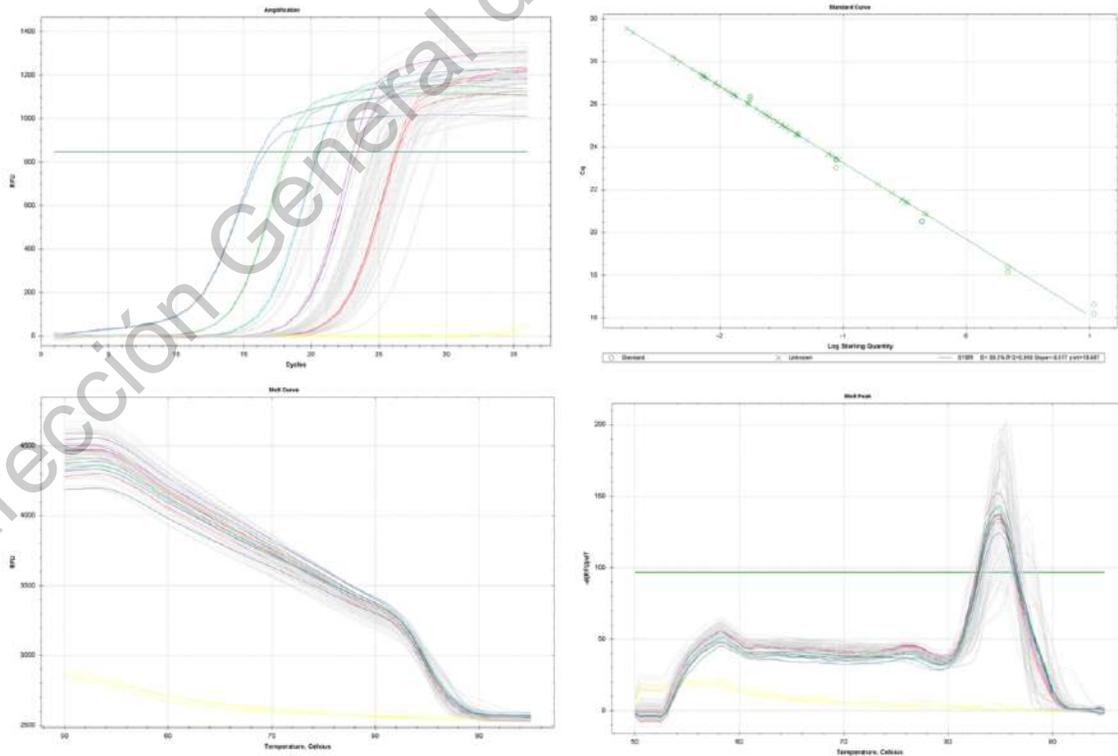
CURVA ESTÁNDAR (Dilución 1:5 seriada Vol: 100 ul)				
Pool	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución
54.5 ng / ul	20 ul pool	20 ul D1	20 ul D2	Tomar
	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	Completar
	10.900	2.180	0.436	Concentración final
	Dilución 4	Dilución 5	Dilución 6	Dilución
	20 ul D3	20 ul D4	20 ul D5	Tomar
	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	80 ul agua PCR	Completar
	0.087	0.017	0.003	Concentración final
MIX FAMILIAS				
REACTIVO	LOTE	BASE	TOTAL MM	UNIDAD
H2O		2.1	210	ul
Sybr Green Mix		7.1	710	ul
Primer F		0.7	70	ul
Primer R		0.7	70	ul
BSA		1.4	140	ul
DNA		3	x	ul
TOTAL	12 ul	15	1200	ul
qPCR Mixture	15 ul	Reacciones	93	100
PROTOCOLO FAMILIAS				Observaciones
PASO	TEMP	TIEMPO	CICLOS	
DN inicial	95°C	3 min		
DN	94°C	45 seg	x 35 ciclos	
Alineación	55°C	30 seg		
Extensión	72°C	30 seg		
Extensión final	72°C	5 min		

12.11. Curvas: amplificación, estandar y disociación.

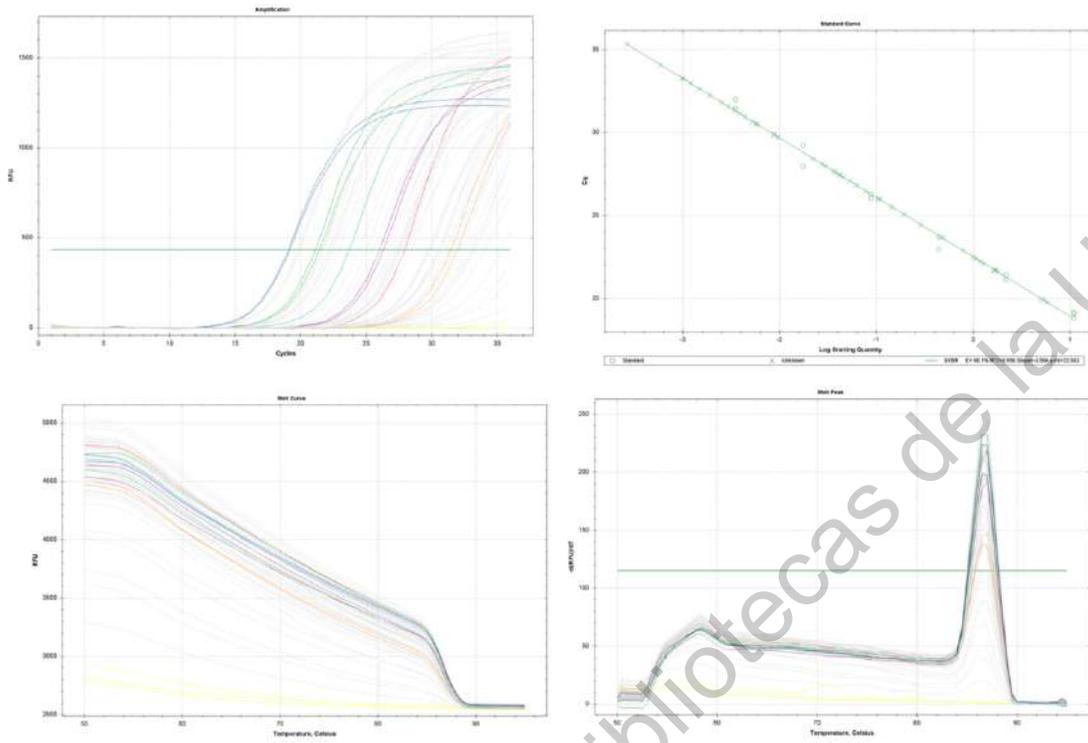
LOTE 1 RPOB



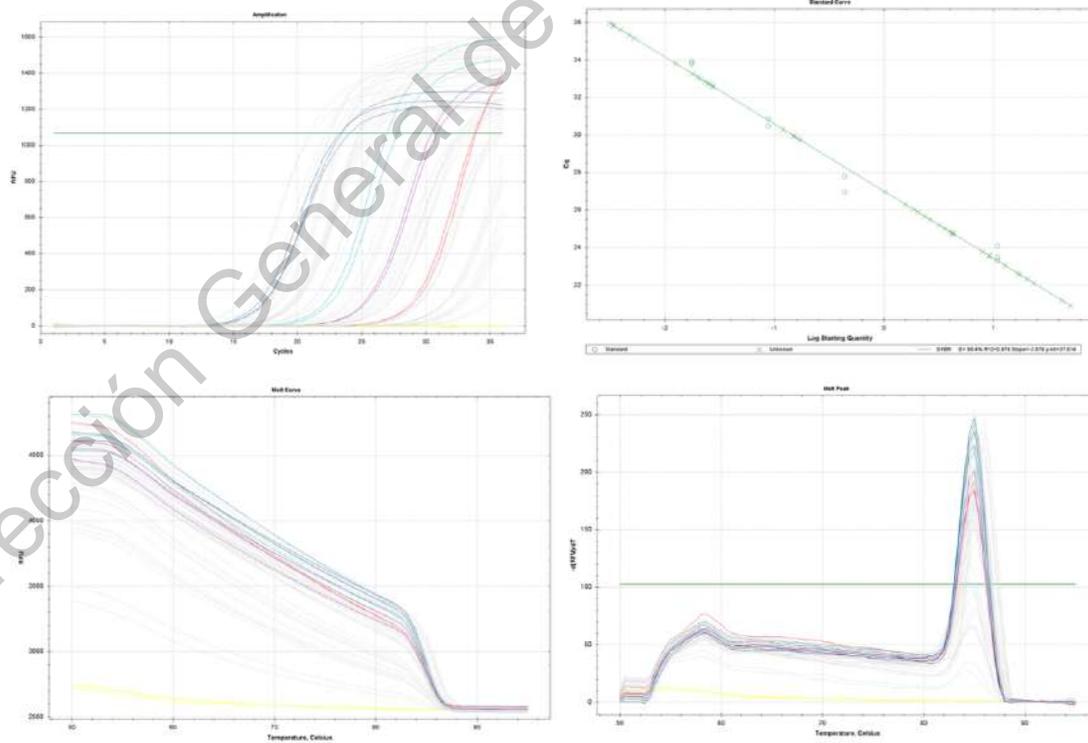
LOTE 1 BPP



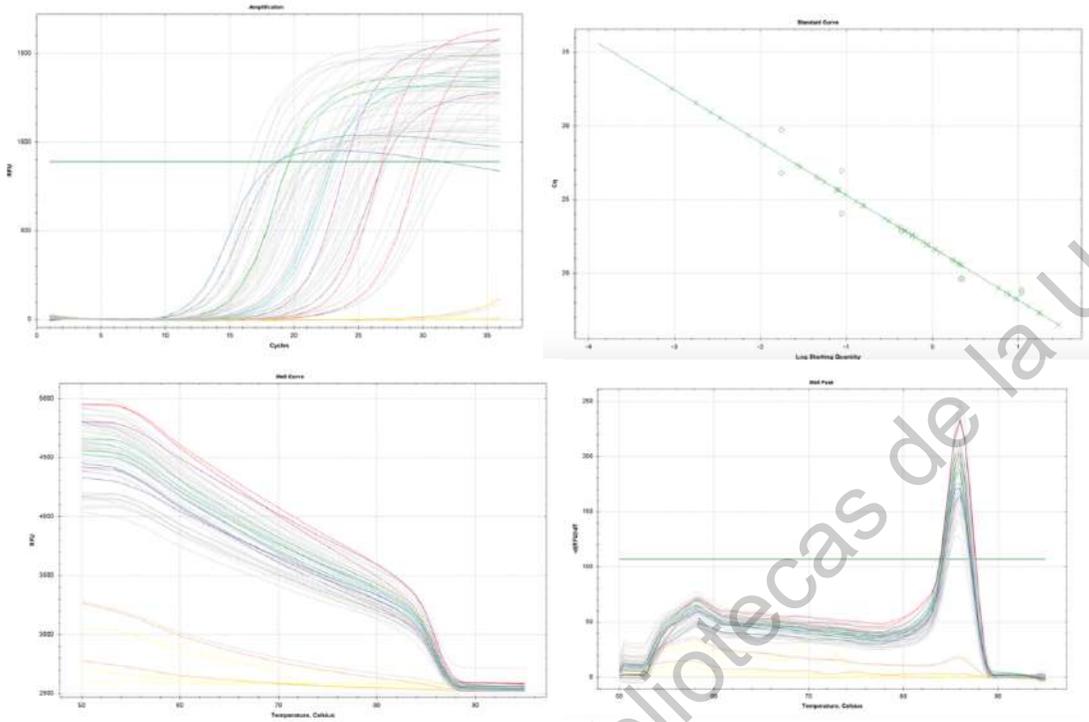
LOTE 1 ECC



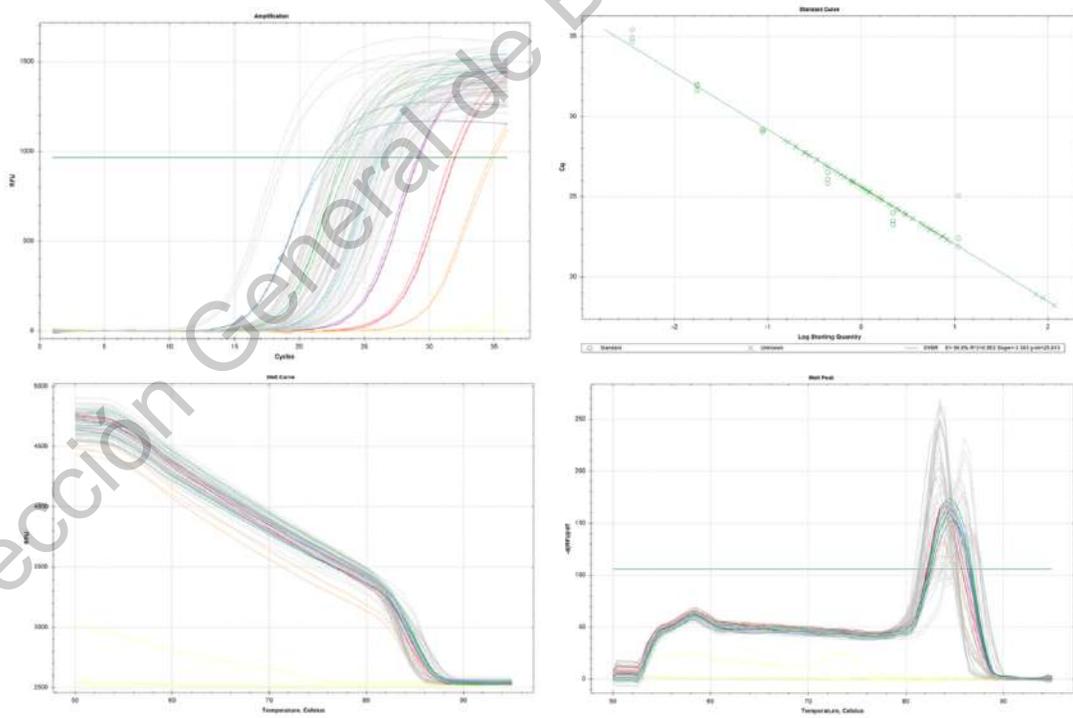
LOTE 1 LAC



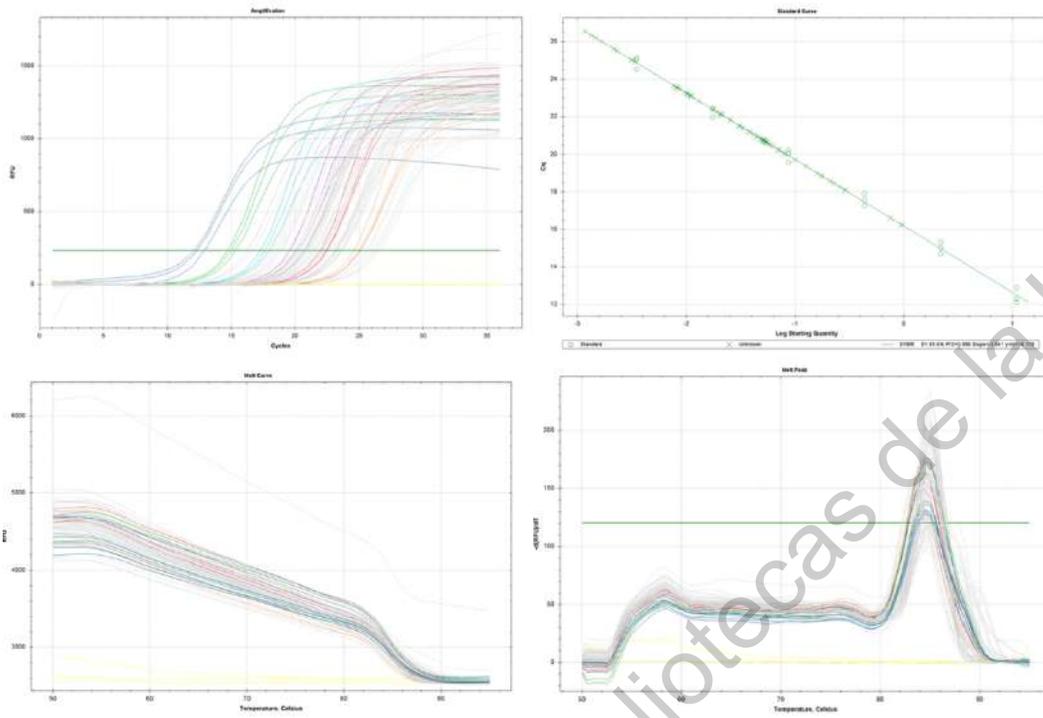
LOTE 1 LRC



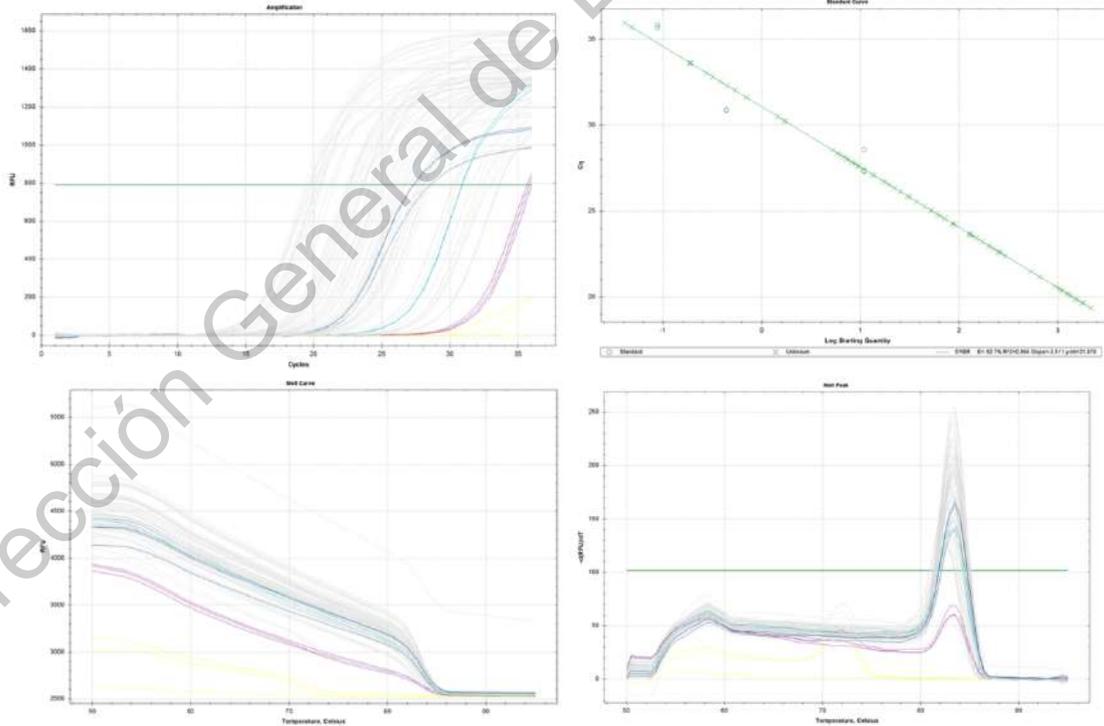
LOTE 2 RPO



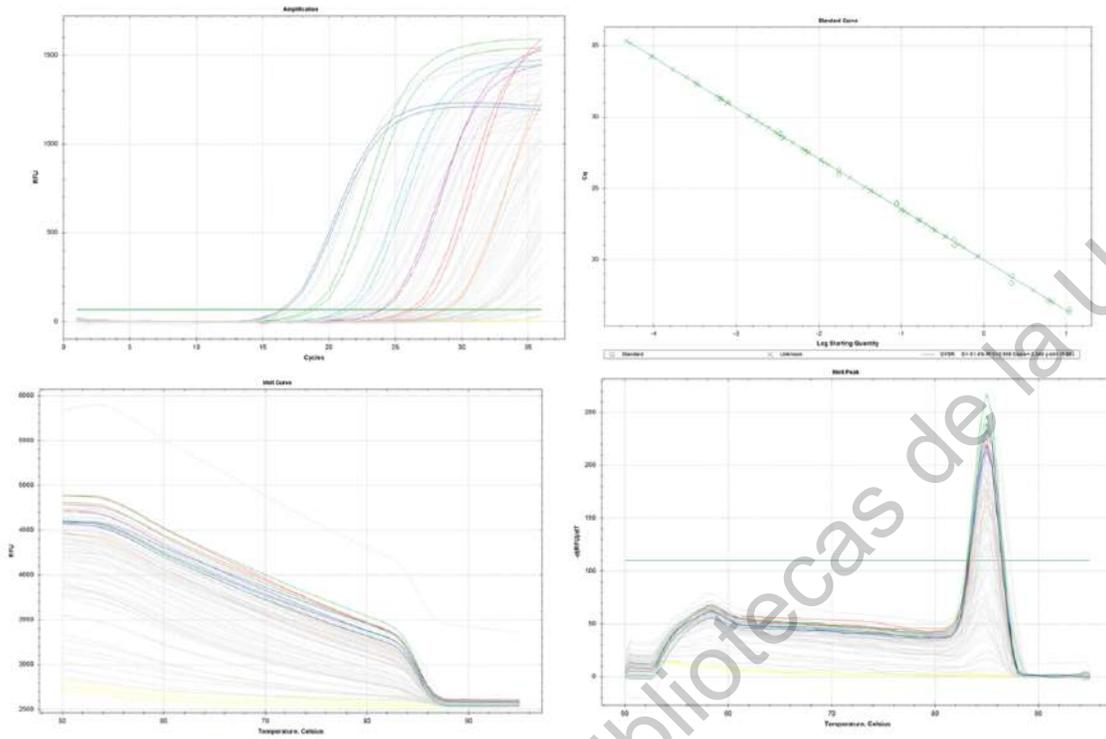
LOTE 2 BPP



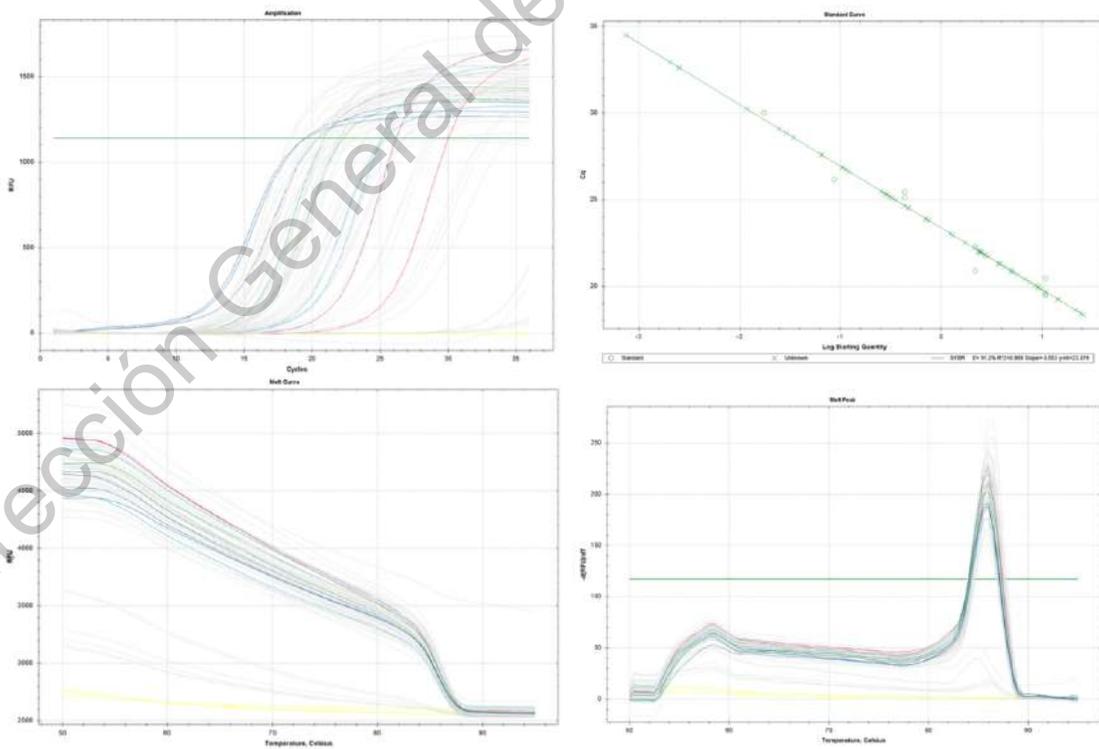
LOTE 2 ECC



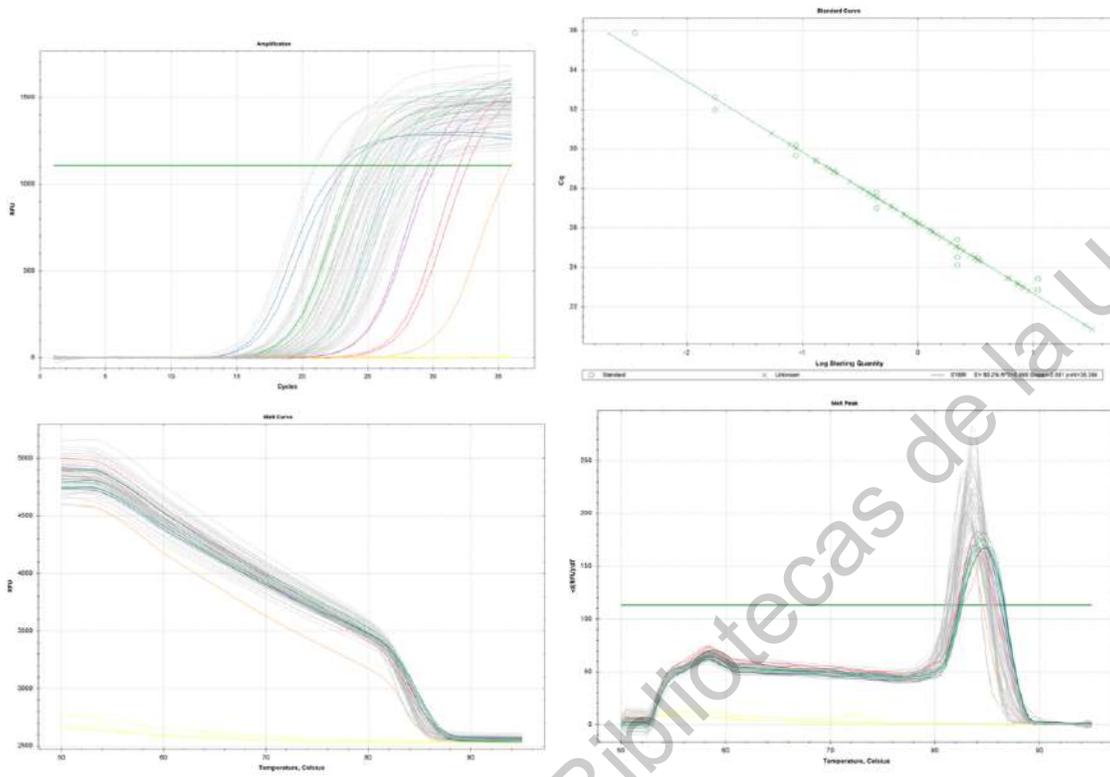
LOTE 2 LAC



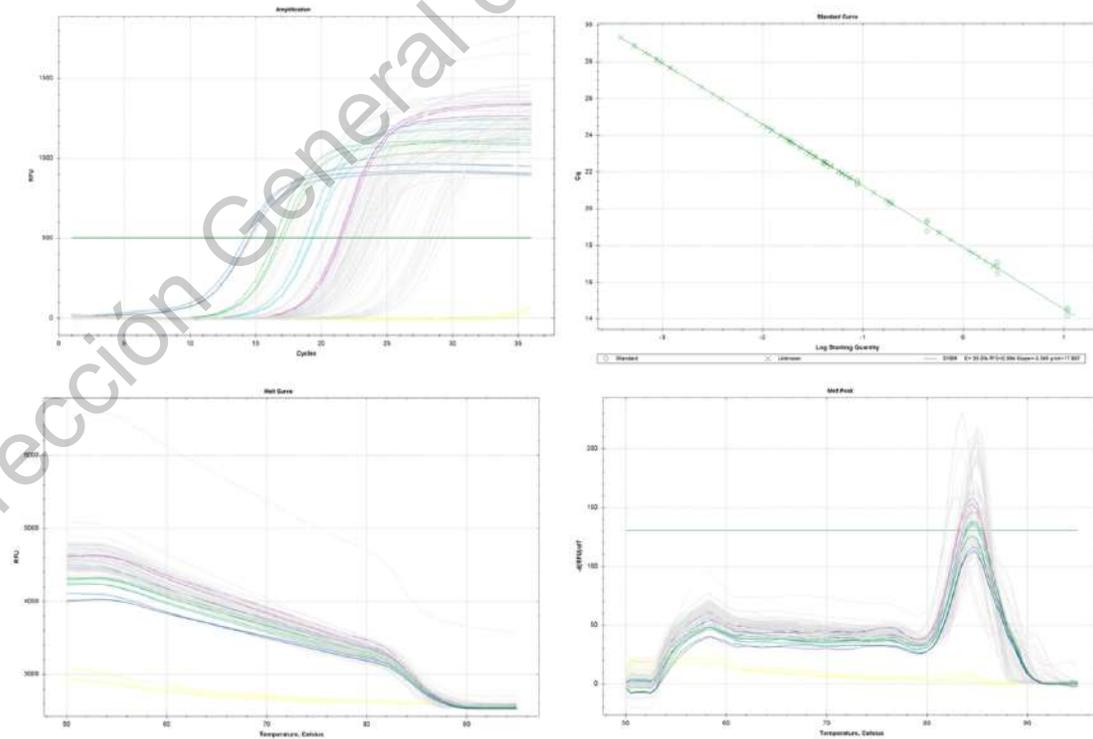
LOTE 2 LRC



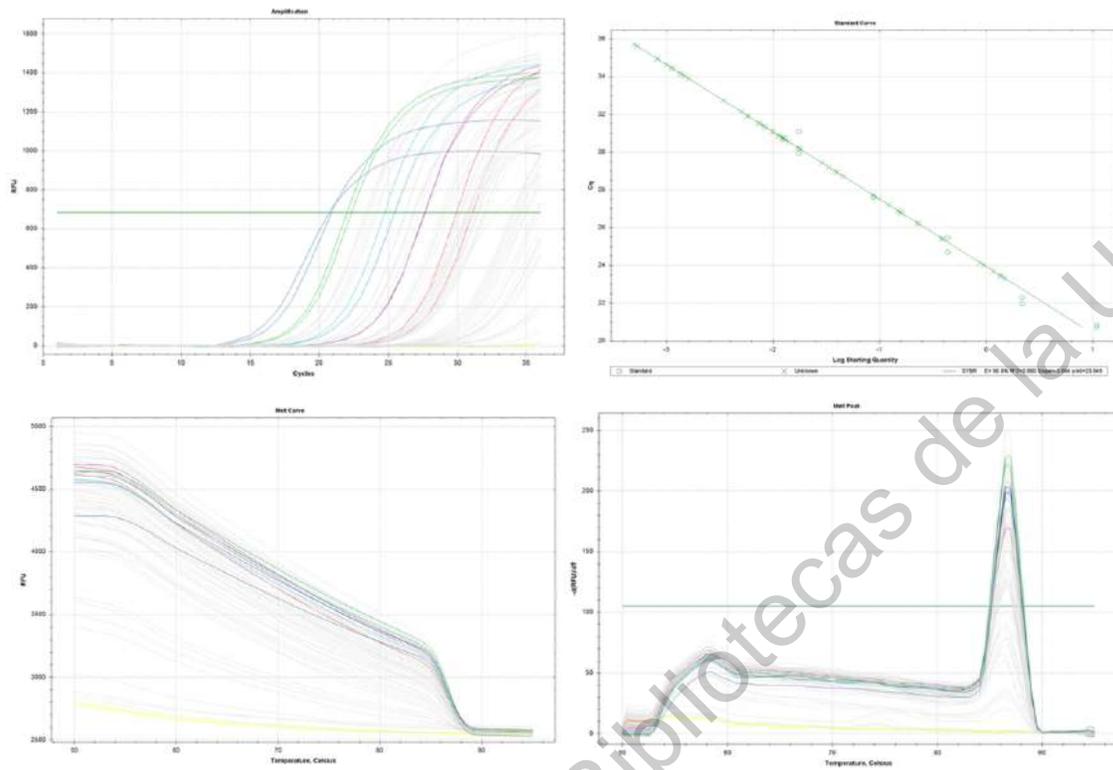
LOTE 3 RPO



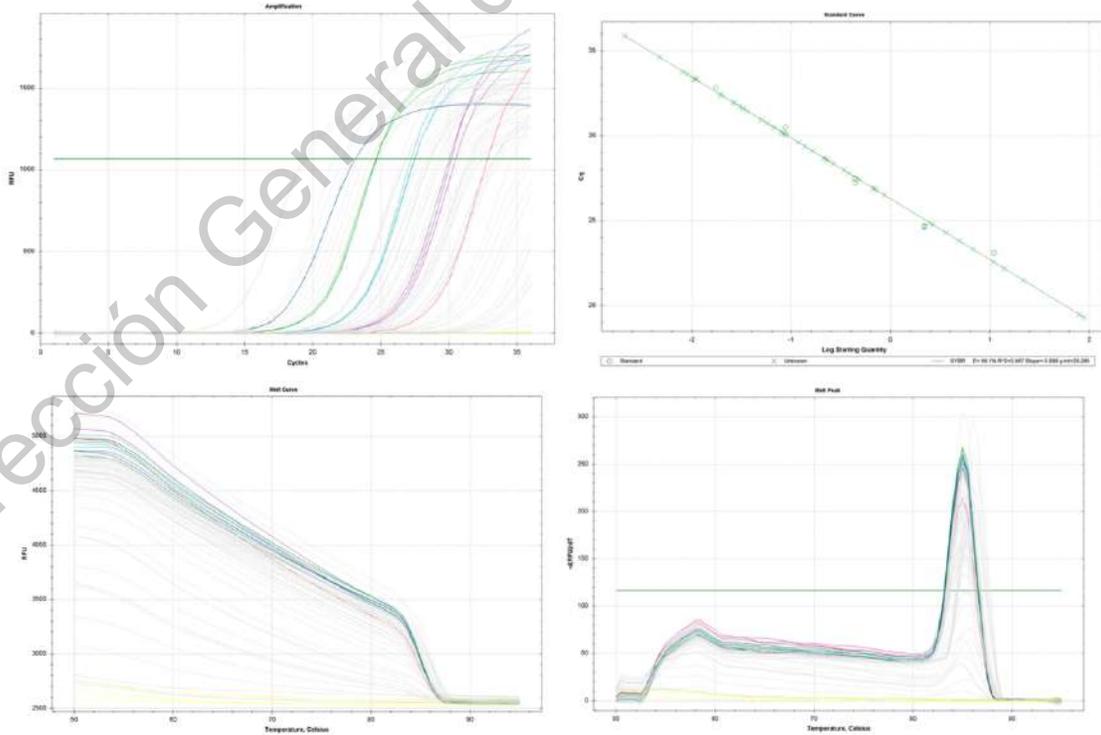
LOTE 3 BPP



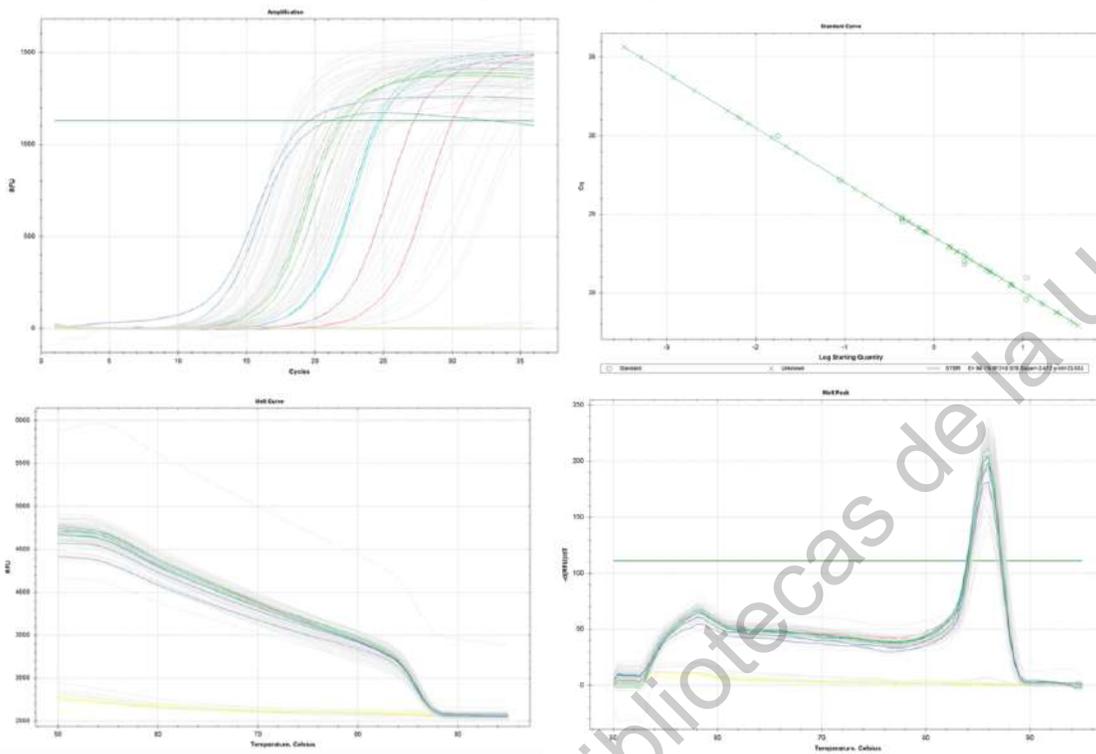
LOTE 3 ECC



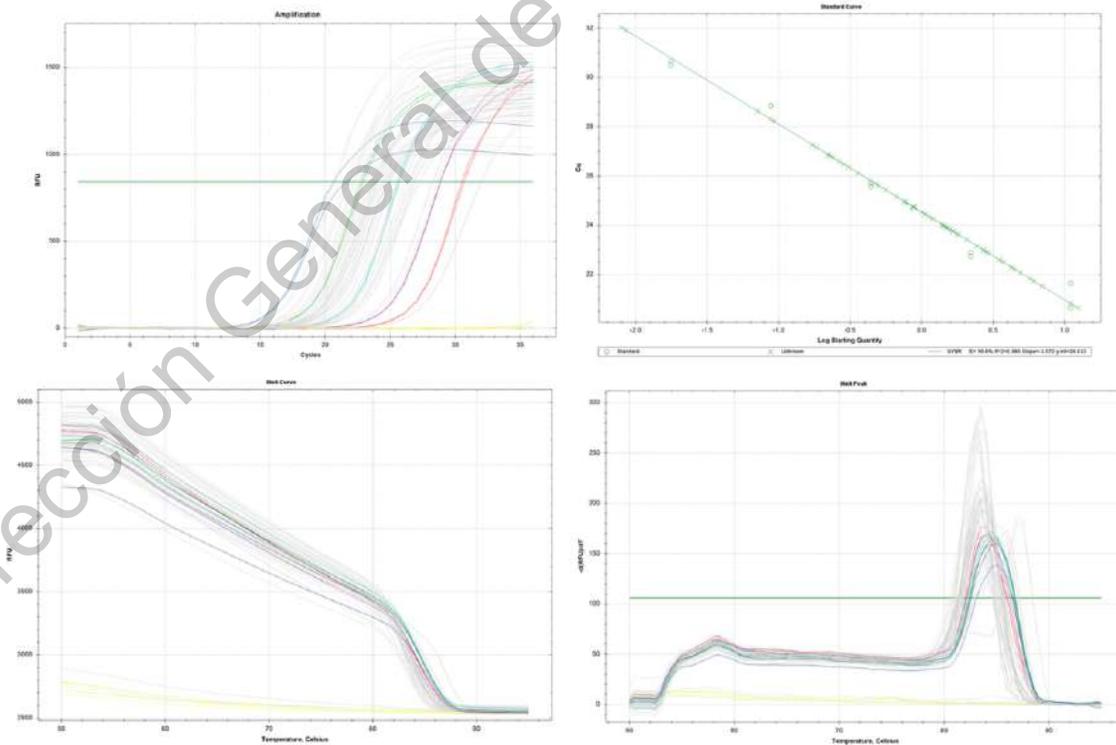
LOTE 3 LAC



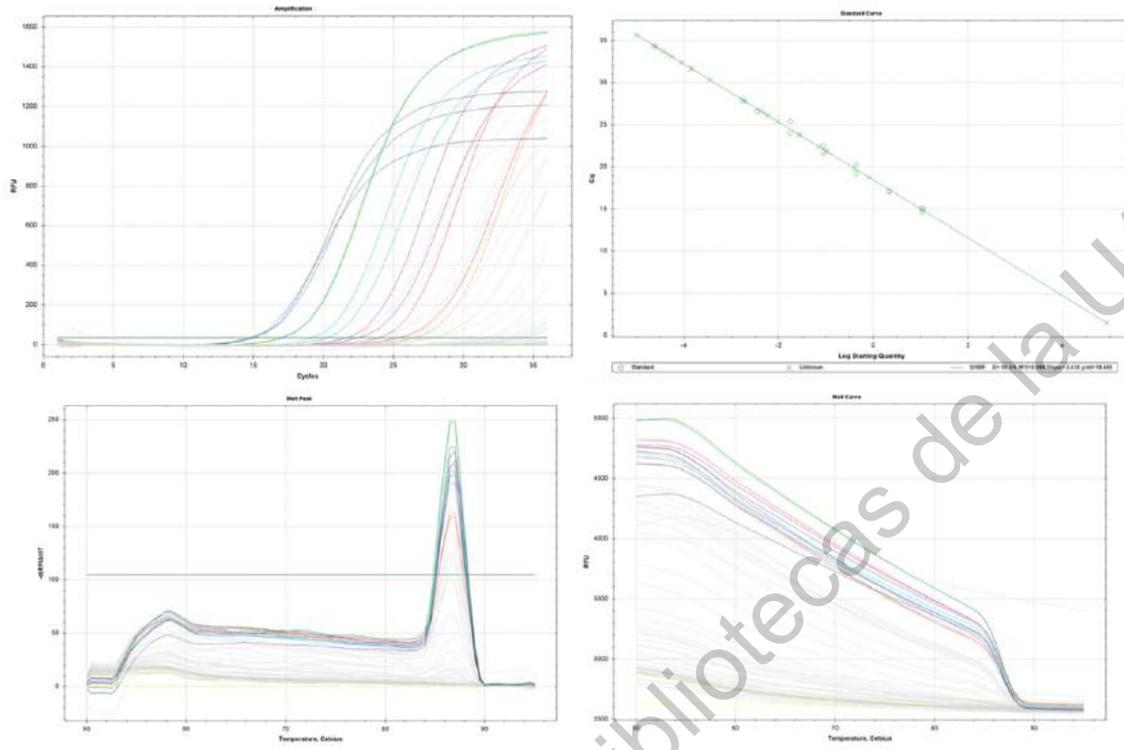
LOTE 3 LRC



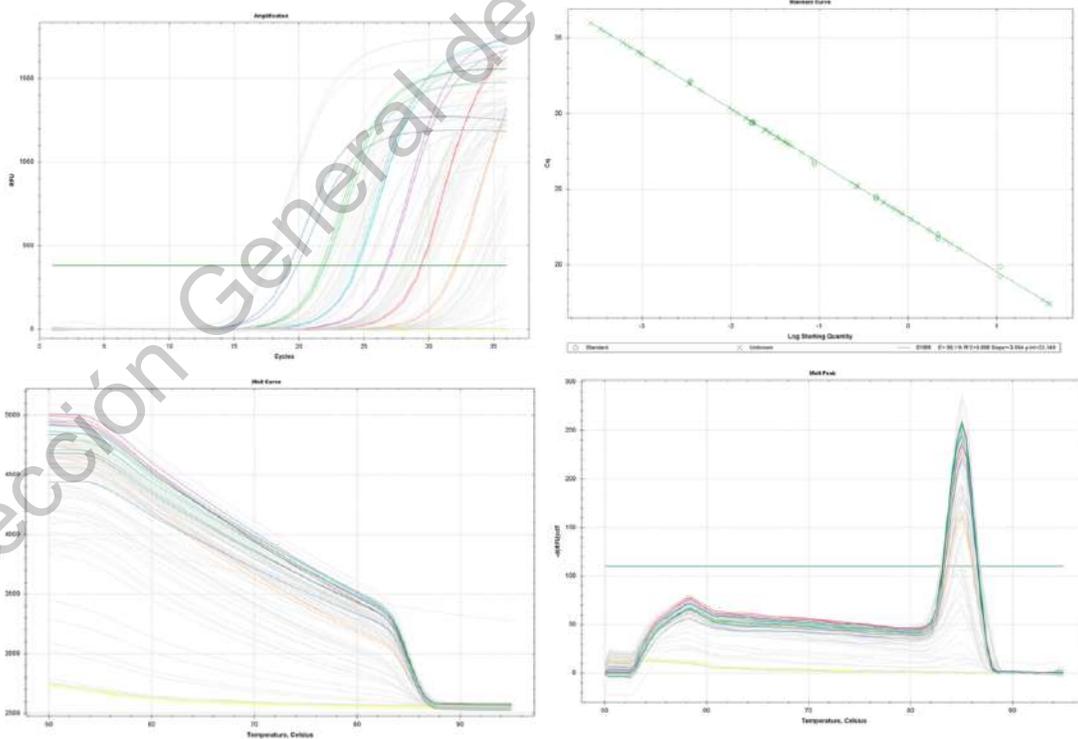
LOTE 4 RPO



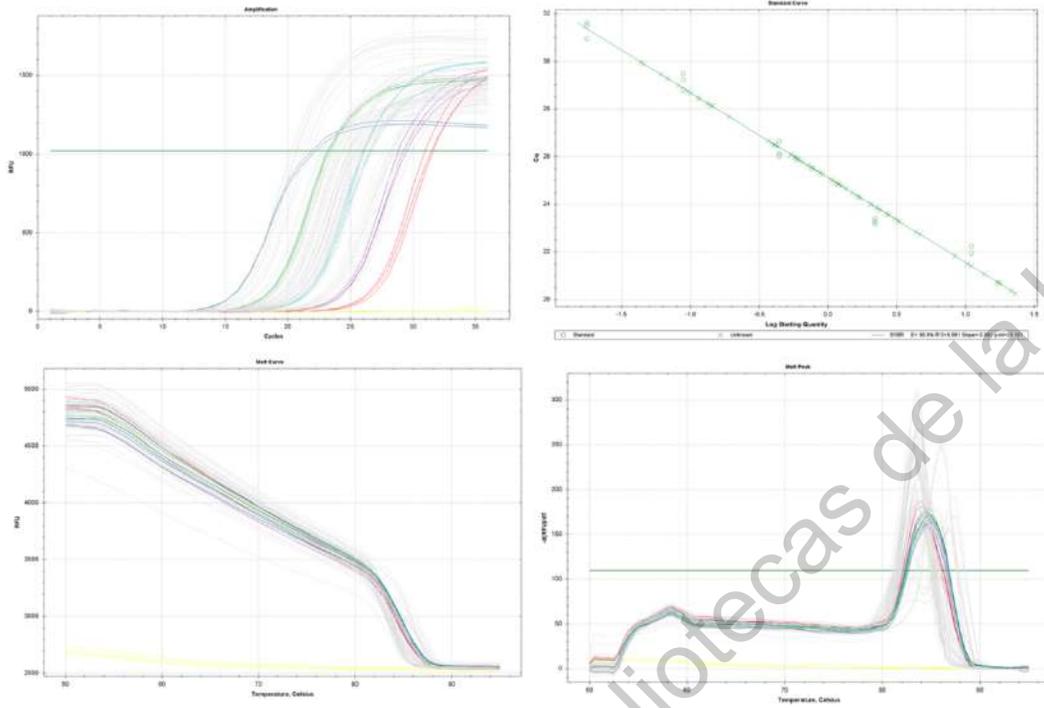
LOTE 4 ECC



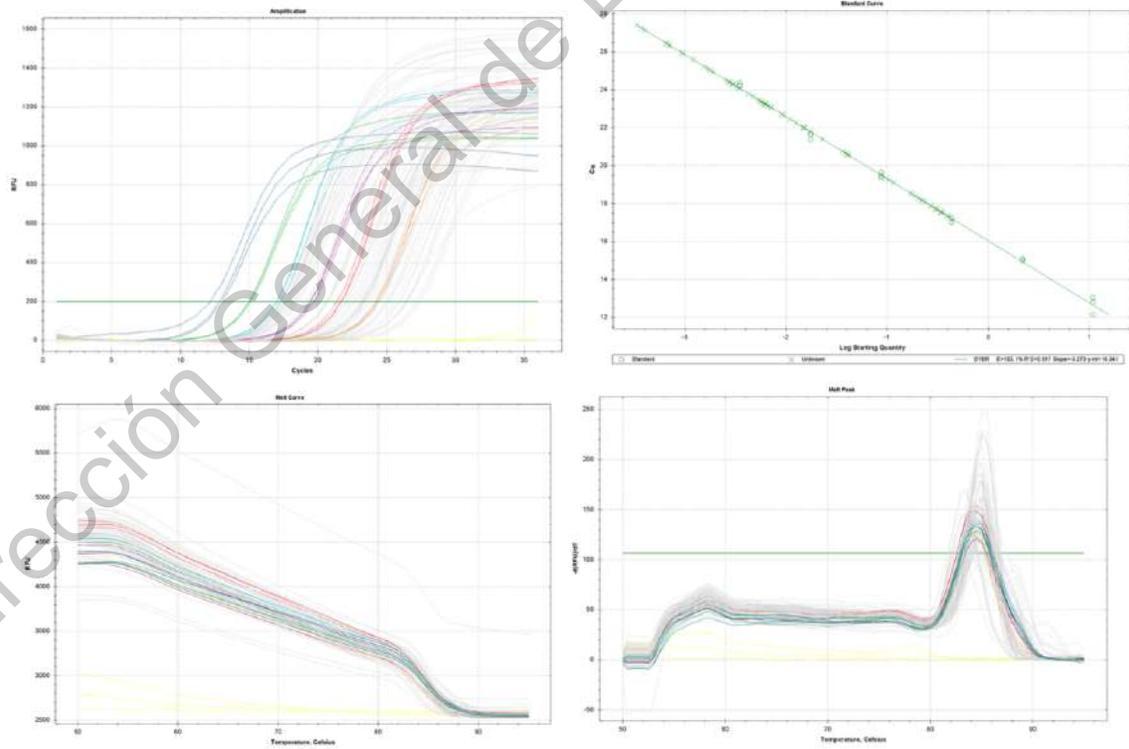
LOTE 4 LAC



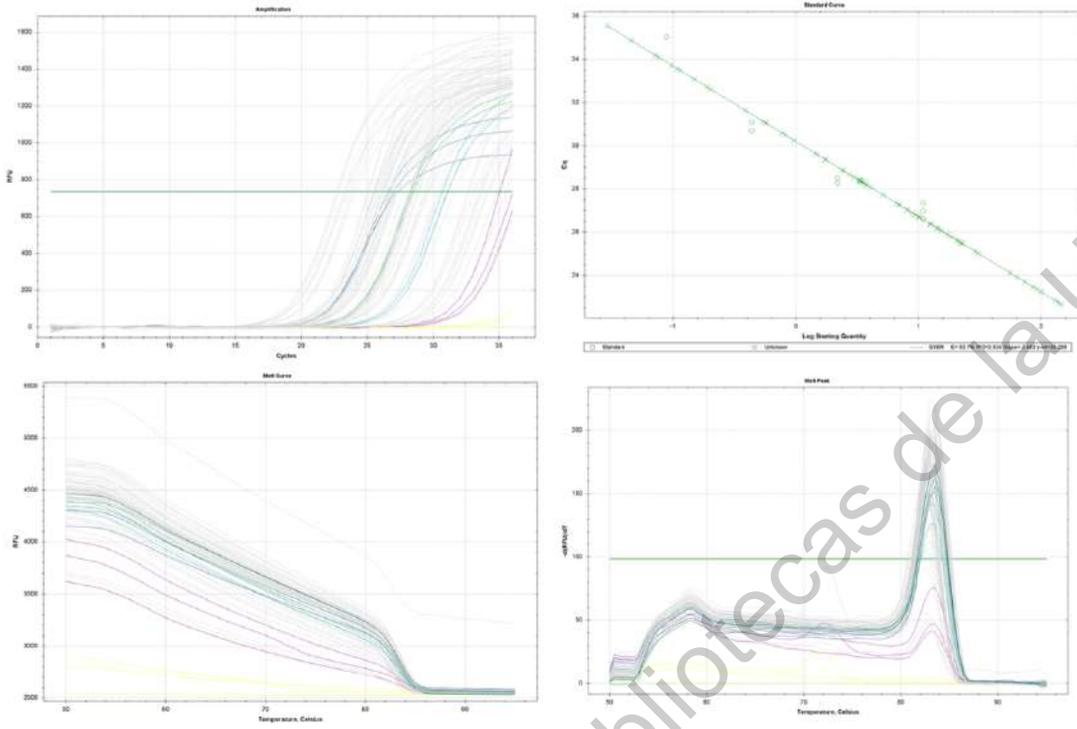
LOTE 5 RPO



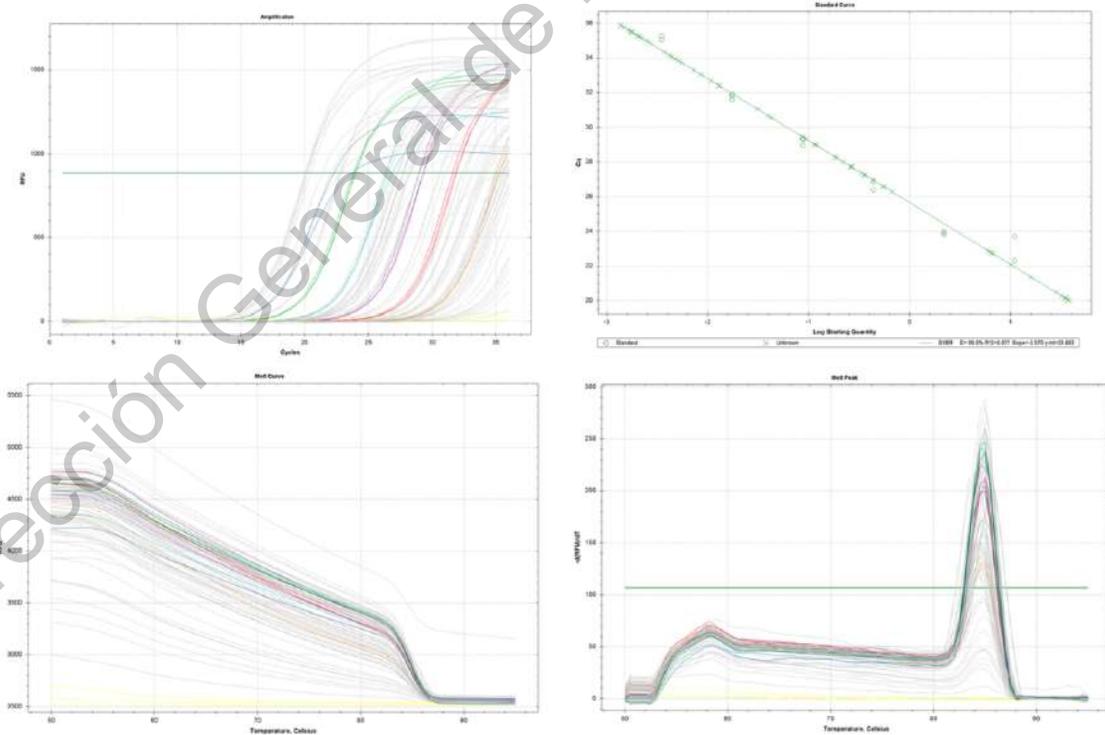
LOTE 5 BPP



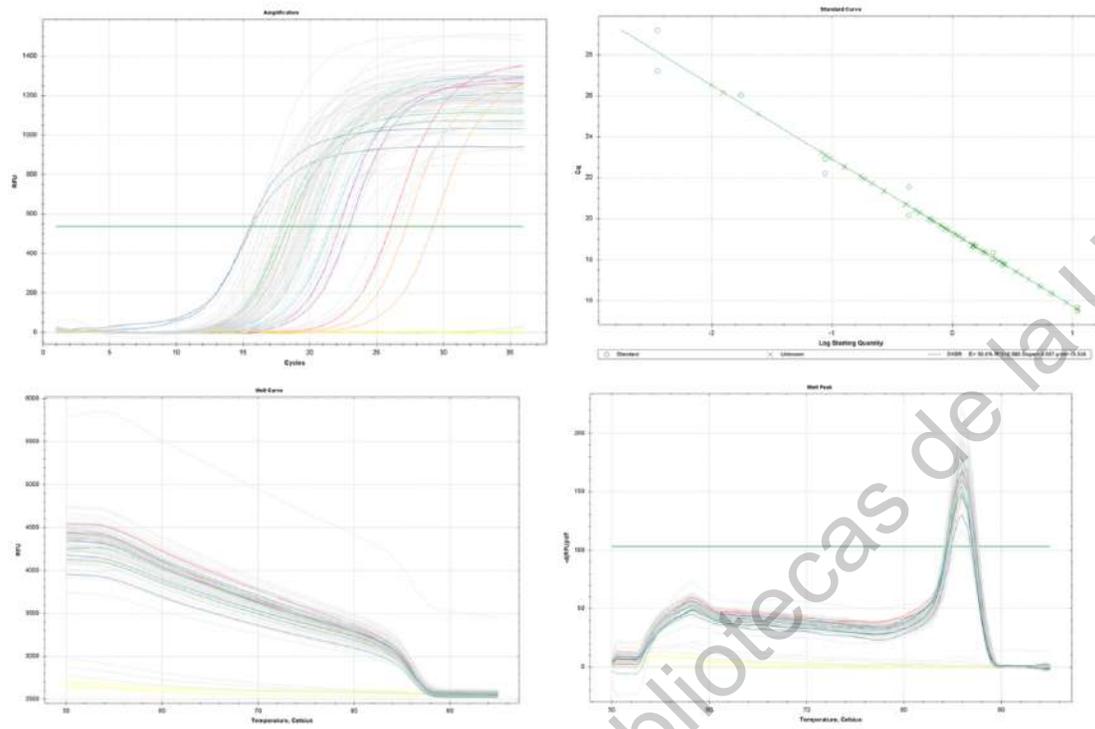
LOTE 5 ECC



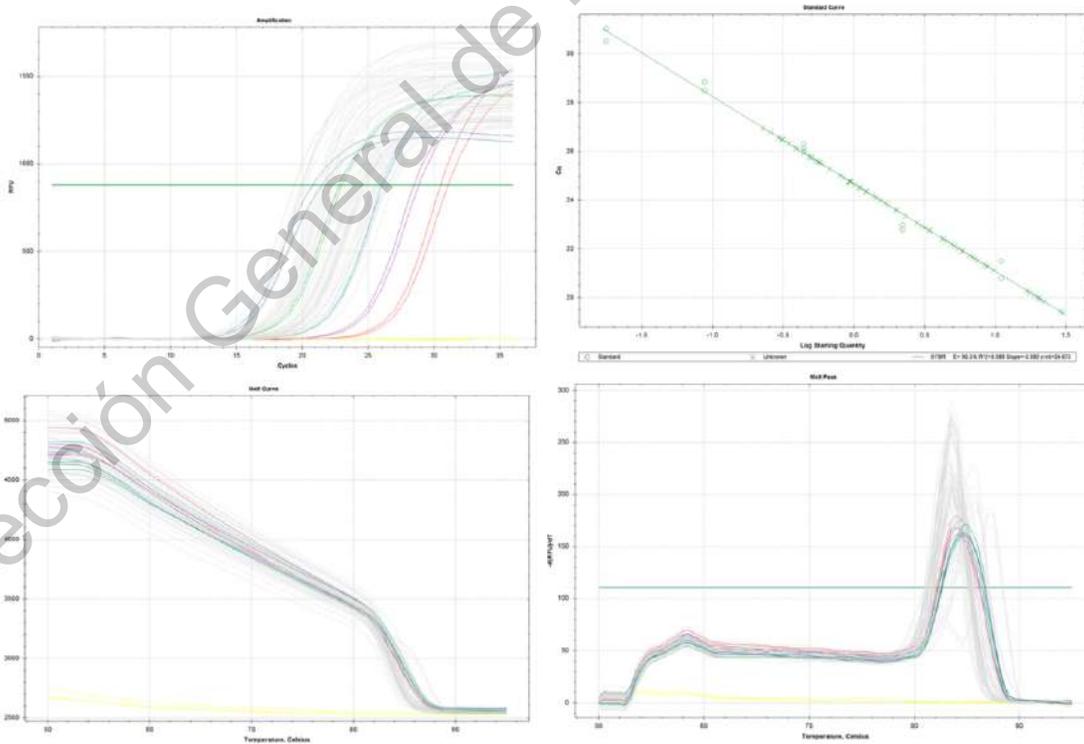
LOTE 5 LAC



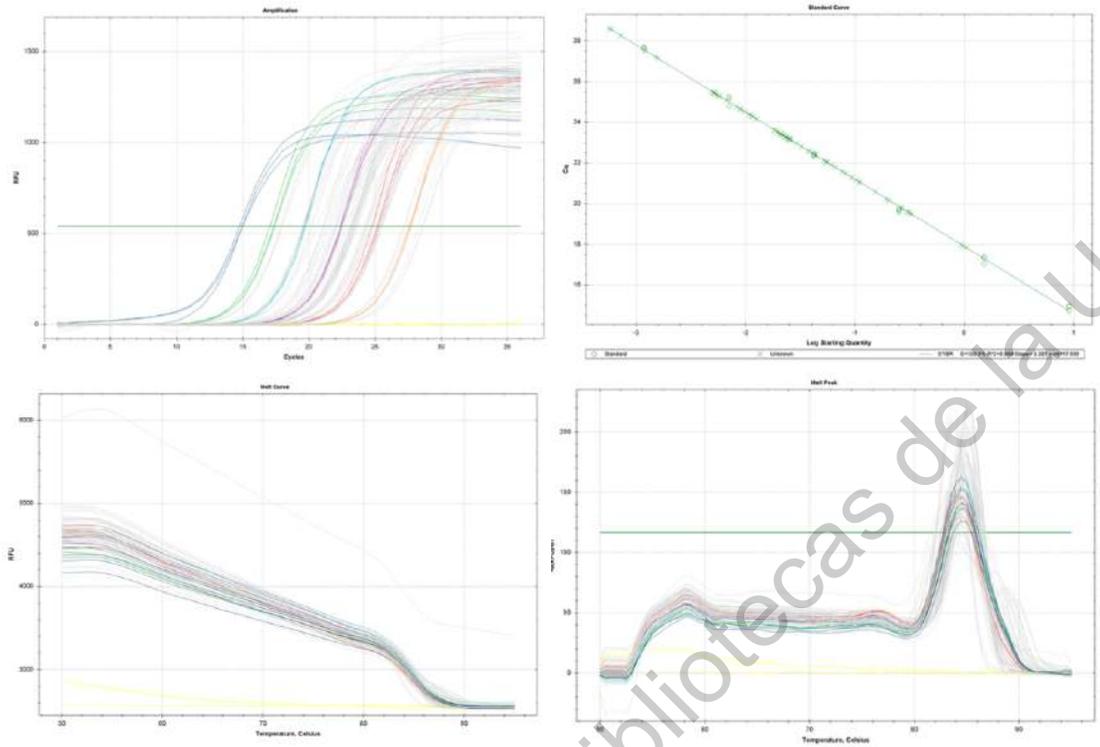
LOTE 5 LRC



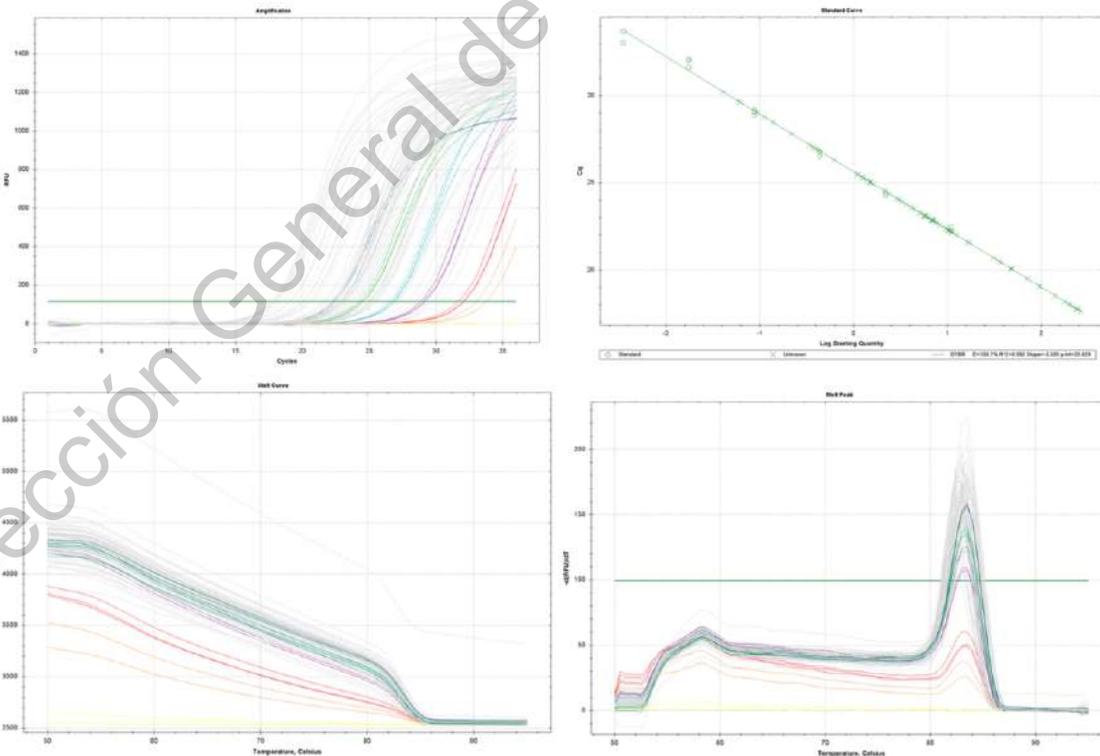
LOTE 6 RPO



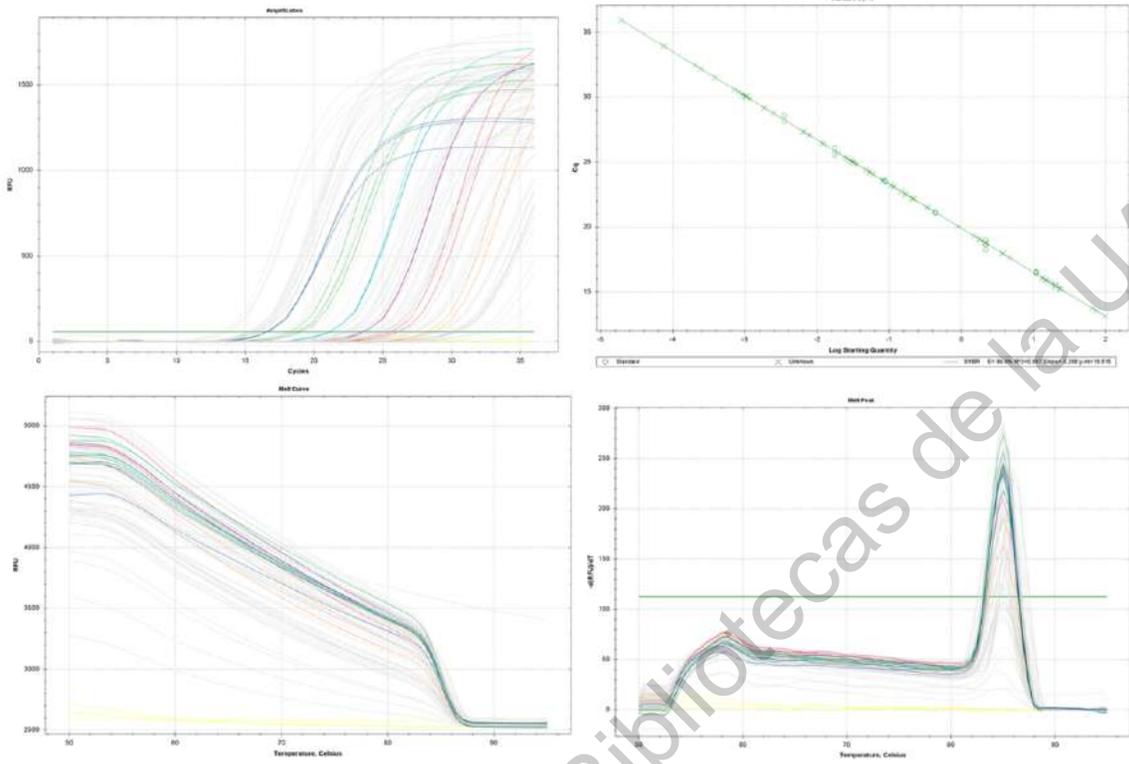
LOTE 6 BPP



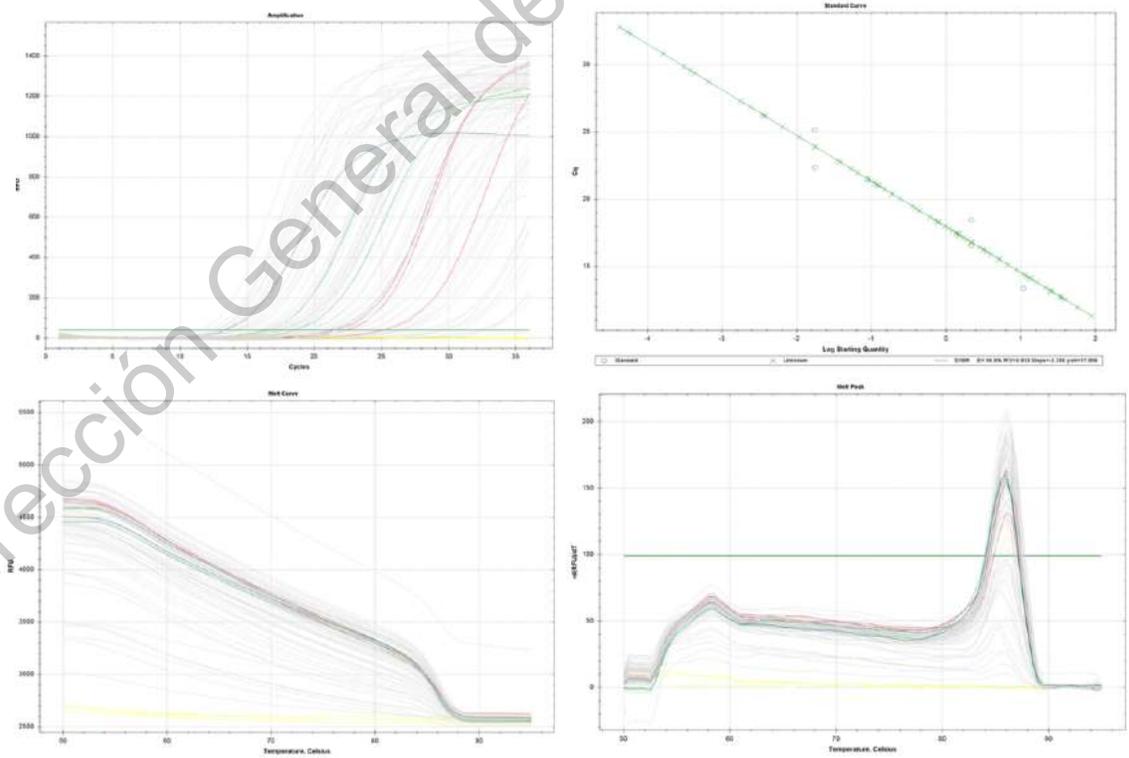
LOTE 6 ECC



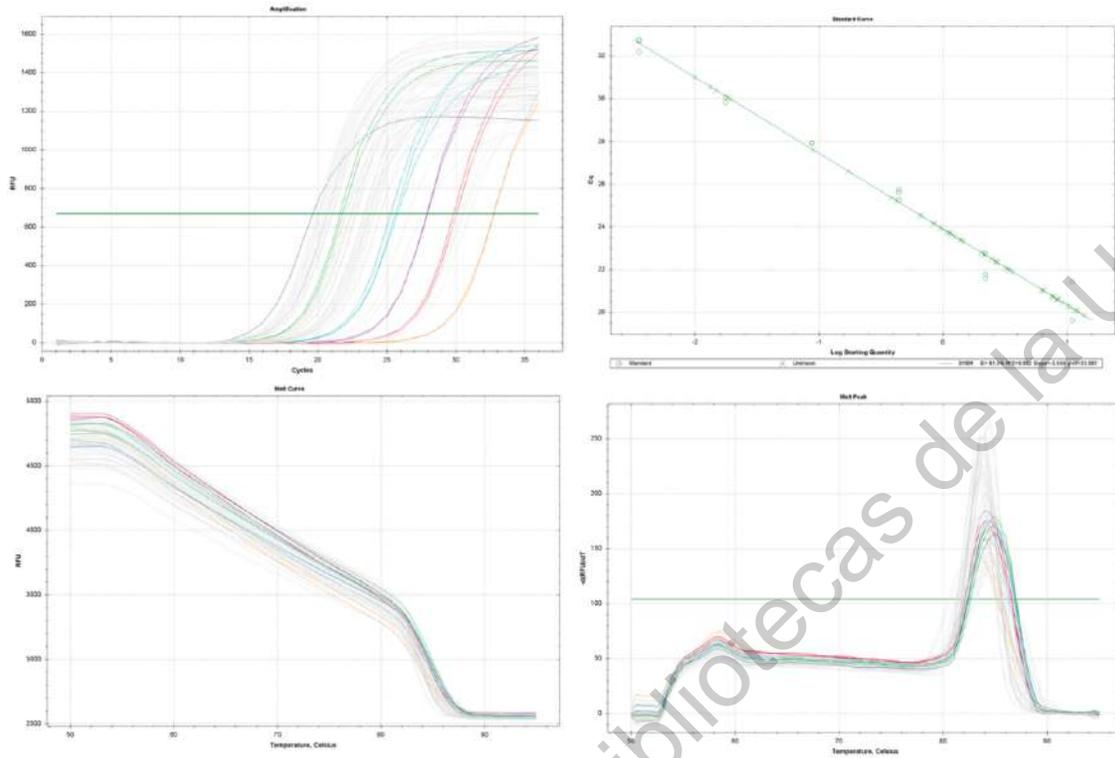
LOTE 6 LAC



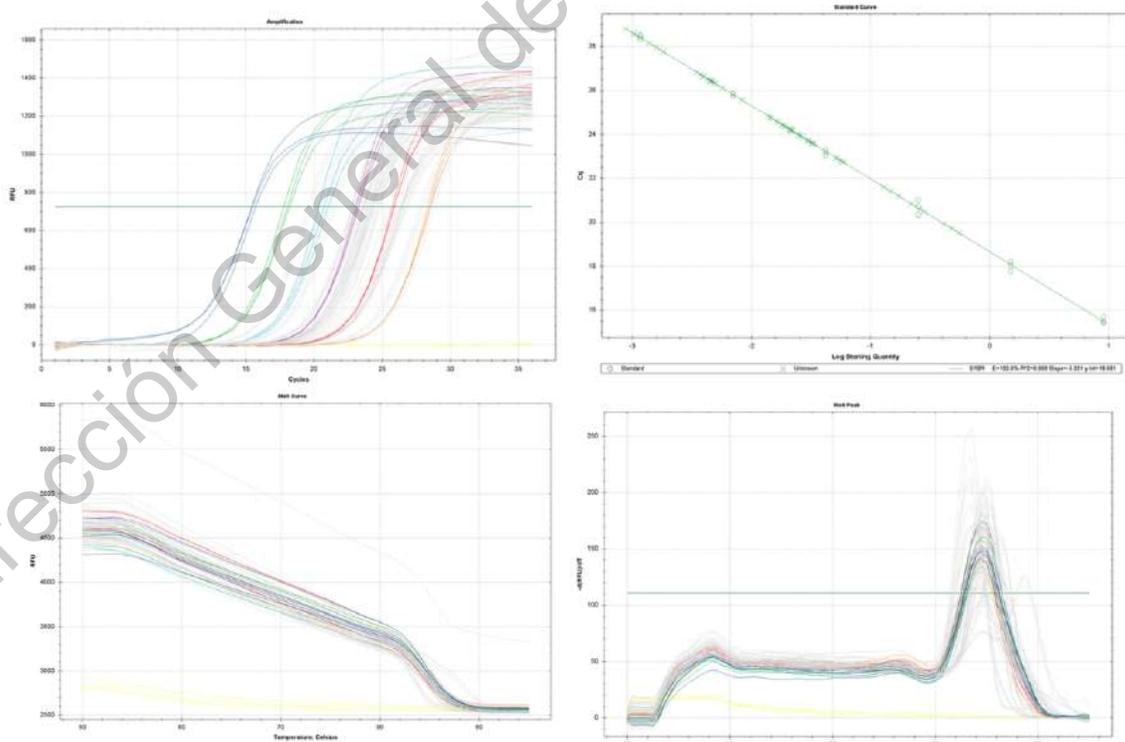
LOTE 6 LRC



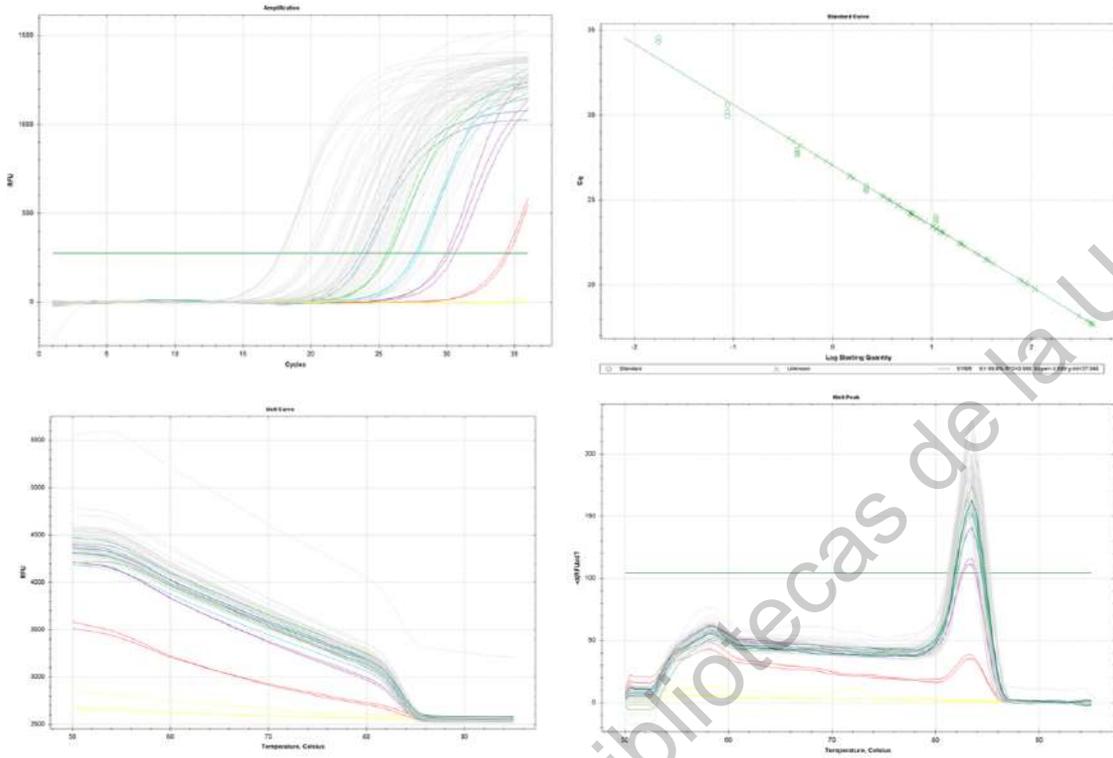
LOTE 7 RPO



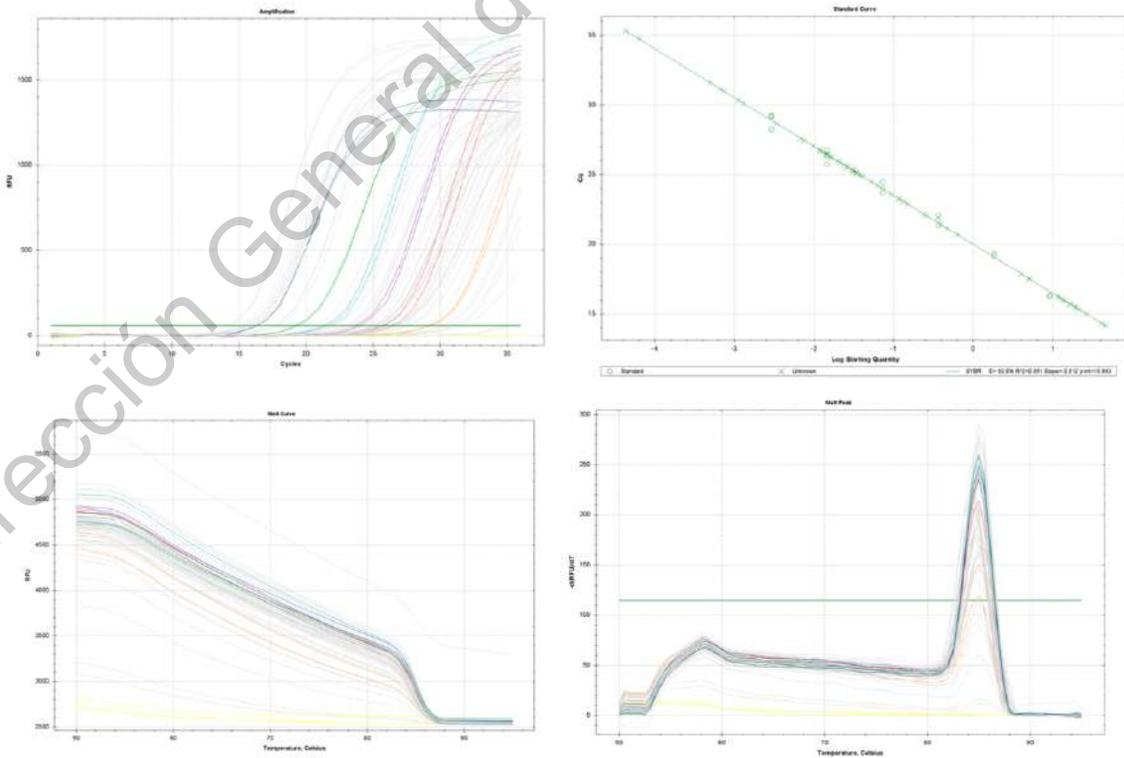
LOTE 7 BPP



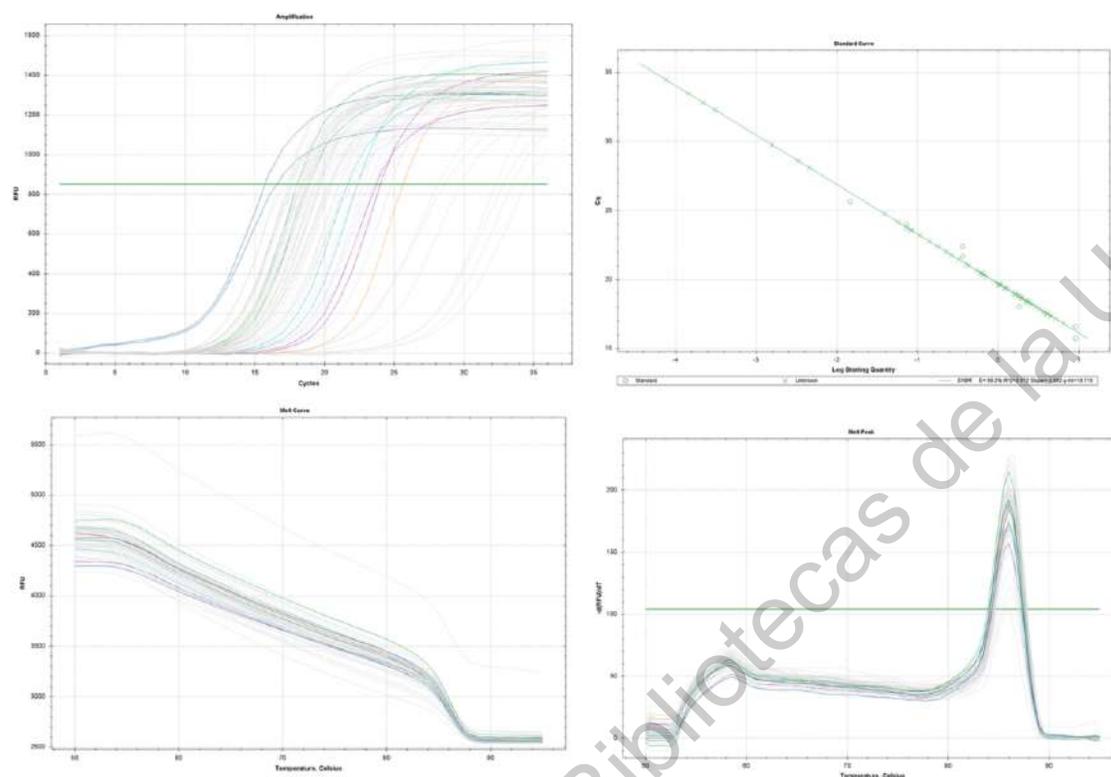
LOTE 7 ECC



LOTE 7 LAC



LOTE 7 LRC



12.12. Eficiencia de las reacciones de qPCR.

# LOTE	MUESTRAS	qPCR	RPO	BPP	ECC	LAC	LRC
1	24	Eficiencia	90.2%	90.3%	90.1%	90.4%	90.8%
		R^2	0.986	0.990	0.990	0.976	0.915
2	25	Eficiencia	90.8%	91.6%	92.7%	91.4%	91.2%
		R^2	0.953	0.996	0.904	0.998	0.959
3	25	Eficiencia	90.2%	99.0%	90.8%	90.1%	94.1%
		R^2	0.980	0.994	0.980	0.987	0.979
4	25	Eficiencia	90.6%	--	95.5%	90.1%	--
		R^2	0.985	--	0.988	0.998	--
5	25	Eficiencia	90.9%	102.1%	90.0%	90.6%	90.0%
		R^2	0.981	0.997	0.980	0.977	0.980
6	25	Eficiencia	90.3%	100.9%	100.7%	96.9%	96.9%
		R^2	0.988	0.999	0.992	0.997	0.913
7	20	Eficiencia	91.3%	100.0%	90.6%	92.6%	90.2%
		R^2	0.982	0.999	0.966	0.991	0.972