



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**« Microbiota intestinal: Su papel en la
endotoxemia y en el perfil metabólico de
jóvenes »**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

Q.B.P. ROMINA BELEN RADILLA VÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NATIVIDAD CASTRO ALARCÓN

Chilpancingo, Gro.

Noviembre del 2013.

“Microbiota intestinal: Su papel en la endotoxemia y en el perfil metabólico de jóvenes”



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de junio de dos mil trece, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "**Microbiota intestinal: Su papel en la endotoxemia y el perfil metabólico de jóvenes**", presentada por la alumna Romina Belén Radilla Vázquez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón
Dirección de tesis

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Isela Parra Rojas

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dra. Yolanda Fabiola Márquez Sandoval

Vo.Bo

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
Biomédicas

Vo.Bo

Dra. Eugenia Flores Alfaro
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas



Agradecimientos

A la Dra. Natividad por su disponibilidad, sus enseñanzas, paciencia, su buena vibra, y sobre todo por cuidar cada detalle del trabajo. Gracias por abrir las puertas de su casa y compartir momentos de alegría. Gracias por sus consejos para hacer de esta investigación un trabajo exitoso.

Agradezco a cada miembro del comité tutorial, el tiempo empleado, su disponibilidad y sobre todo sus recomendaciones para hacer de esta investigación un trabajo de calidad.

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dra. Isela Parra Rojas

Dra. Yolanda Fabiola Márquez Sandoval

Espero que sigan transmitiendo a las nuevas generaciones su sabiduría, sus recomendaciones y sobre todo esa calidad humana que las distingue, me queda claro que a pesar de ser mujeres con muchas ocupaciones, siempre están dispuestas a ayudar a sus estudiantes en pro de la ciencia y eso es de admirarse.

Un agradecimiento muy especial al Laboratorio Estatal de Salud Pública, Dr. Galo Soberón y Parra y en particular a la Mtra. Norma Edith Martínez Hernández, por permitir que llevara a cabo el procesamiento de muestras en sus instalaciones. Gracias Mtra. Norma por su asesoría, su disponibilidad y sobre todo su amabilidad. También gracias a la Q.B.P. Maxi e Irma por sus consejos y ayuda.

Con admiración y respeto, Romina Belen.

Agradecimientos:

A Dios por el privilegio de la vida, por los momentos de tristeza y alegría. Por guiarme cuando más lo necesite y por siempre estar conmigo.

A mis padres por sus palabras de aliento, motivación y por creer en mí.

A mi tutor y profesor de seminario, Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, gracias por su disponibilidad y recomendaciones.

A mis compañeros de generación, gracias por su buena vibra, son personas maravillosas...

A mis compañeros de laboratorio: Jonathan, Pepe, Raquel, Luis, Beto, José y Laura, gracias por su compañía y momentos de alegría.

A mí querido esposo, Salvador Ochoa Espinosa, gracias por tu apoyo, comprensión, motivación, fortaleza, por estar siempre a mi lado. Te amo.

ÍNDICE

Páginas

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIÓN.....	28
ANEXOS.....	30
REFERENCIAS.....	35

RESUMEN

Antecedentes: La microbiota intestinal (MI) juega un papel importante en el metabolismo humano, estudios sugieren que su desequilibrio puede generar una endotoxemia metabólica con impacto en la ganancia de peso y resistencia a insulina.

Objetivo: Analizar la asociación entre los principales grupos bacterianos de la MI, el lipopolisacárido y el perfil metabólico de jóvenes con obesidad y peso normal.

Material y métodos: Se estudiaron 30 sujetos con obesidad ($\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) y 30 con normopeso ($\text{IMC}=18.5\text{-}24.9 \text{ Kg/m}^2$), con un rango de edad de 18 a 25 años. Los participantes dieron su consentimiento informado, se les aplicó una encuesta y se tomaron las medidas antropométricas. La cuantificación de las bacterias intestinales se realizó mediante PCR en tiempo real. Las unidades de endotoxina se determinaron con el test QCL-1000, Lonza y el perfil bioquímico se realizó bajo un protocolo estandarizado de Spinreact.

Resultados: Los individuos con obesidad presentaron un IMC de 34.5 (32.9-36.4) kg/m^2 , mayor concentración de triglicéridos (123 vs 70 mg/dL), colesterol total (168 vs 142 mg/dL), y LDL-c (114 vs 96.5 mg/dL). Así como un ligero aumento en la temperatura corporal, 1°C más que los de normopeso. La menor cantidad de *E. coli* se asoció a un mayor riesgo de tener niveles de LPS que van desde 1 a 1.3 UE/mL. Además, se encontró una mayor cantidad de bacterias Gram positivas en el grupo de obesidad (*Lactobacillus* y *C. leptum*). La cantidad de *B. fragilis* y bifidobacterias no tuvo valores significativos. Cabe resaltar que se encontró una correlación positiva entre el LPS sérico con los triglicéridos ($r=0.415$, $p=0.001$), circunferencia de cintura ($r=0.347$, $p=0.040$) e IMC ($r=0.426$, $p=0.015$), siendo más evidente en los pacientes obesos, del sexo femenino.

Conclusión: La menor cantidad de *E.coli* en pacientes obesos, acompañado de niveles elevados de triglicéridos en circulación y una acumulación de adiposidad central, pueden ser indicativos de una endotoxemia metabólica subclínica.

ABSTRACT

Background: The intestinal microbiota (MI) plays an important role in human metabolism, studies suggest that the imbalance can cause a metabolic endotoxemia impact on weight gain and insulin resistance.

Objective: Analyze the association between major bacterial groups in the MI, the lipopolysaccharide and the metabolic profile of young obese and normal weight.

Material and methods: We studied 30 obese subjects (BMI \geq 30 kg/m²) and 30 normal weight (BMI = 18.5-24.9 kg/m²), with an age range of 18-25 years. Participants gave informed consent were administered a survey and anthropometric measurements were taken. Quantification of intestinal bacteria was performed by real time PCR. Endotoxin units were determined with the test QCL-1000, Lonza and biochemical profile was performed under a standard protocol of Spinreact.

Results: obese individuals had a BMI of 34.5 (32.9-36.4) kg/m², increased triglycerides (123 vs 70 mg / dL), total cholesterol (168 vs 142 mg / dL), and LDL - c (114 vs 96.5 mg / dL). Just as a slight increase in body temperature 1 ° C higher than those of normal weight. The least amount of *E. coli* were associated with an increased risk of LPS levels ranging from 1 to 1.3 EU / mL. Additionally, we found a greater number of Gram-positive bacteria in the obese group (*Lactobacillus* and *C. leptum*). The amount of *B. fragilis* and bifidobacteria had no significant values. Significantly positive correlation was found between serum LPS with triglycerides ($r = 0.415$, $p = 0.001$), waist circumference ($r = 0.347$, $p = 0.040$) and BMI ($r = 0.426$, $p = 0.015$), being more evident in obese patients, female.

Conclusion: The smallest amount of *E.coli* in obese patients, accompanied by high triglyceride levels in circulation and central adiposity accumulation may be indicative of subclinical metabolic endotoxemia.

INTRODUCCIÓN

La obesidad a nivel mundial está catalogada como un problema de salud pública. Antes de 1980 las tasas de obesidad reportadas estaban por debajo del 10%, en el 2010 la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico reportó que más del 50% de la población mundial tenían obesidad (Conterno *et al.*, 2011). Estos datos son alarmantes de acuerdo con las comorbilidades asociadas, entre las que se destacan la resistencia a insulina.

La obesidad se define por el aumento de tejido adiposo, producto de un desbalance energético, es decir un aumento de la ingesta calórica a partir de la dieta y una disminución de la energía de salida asociada con una baja actividad física. Además, el fondo genético juega un papel importante, en el plazo que se lleva a cabo el gasto energético y el almacenamiento (Vrieze *et al.*, 2010). Creciente evidencia sugiere que hay factores ambientales que contribuyen en el desarrollo de la obesidad, recientemente se ha propuesto a la microbiota intestinal (MI) como uno de ellos, responsable para el control del peso corporal y metabolismo energético (Delzene *et al.*, 2011).

La MI es un socio simbiótico que ayuda en el mantenimiento de la salud, la homeostasis de la MI depende de las características del huésped (edad, sexo, antecedentes genéticos), condiciones ambientales (estrés, ingesta de medicamentos, cirugía gastrointestinal, agentes infecciosos y tóxicos) y los cambios de día a día en la dieta (Delzene *et al.*, 2011).

El intestino humano alberga una gran variedad de microorganismos, donde el grupo predominante y más diverso son las bacterias. En conjunto el microbioma es 100 veces más grande que el genoma humano (Dethlefsen *et al.*, 2007). El microbioma puede ser visto como un órgano exterior que contribuye en el metabolismo, desempeñando un papel importante en la conversión de alimentos en nutrientes y energía. La MI se compone de aproximadamente 10^{14} bacterias, dominada por anaerobios y compuesto de 500 a 1000 especies diferentes (Xu y

Gordon., 2003). Por muchos años fue imposible cultivar la fracción dominante de las bacterias intestinales (anaerobias) y por lo tanto hacía difícil la identificación de las poblaciones de estas bacterias, pero el desarrollo de tecnología basada en la secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal ha facilitado la identificación bacteriana sin necesidad de cultivar (Hsiao *et al.*, 2009; Turbaugh *et al.*, 2006).

Las tres divisiones bacterianas que predominan en el intestino humano adulto son: a) el phylum de los Firmicutes (Gram-positivos) contiene más de 200 géneros, que incluye a *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Mycoplasma* y *Clostridium*; b) Bacteroidetes (Gram-negativos) que incluye 20 géneros y c) el phylum de Actinobacterias (Gram-positivos) (Zoetendal *et al.*, 2006).

La MI desempeña funciones esenciales para el mantenimiento de la salud como: de protección (activación del sistema inmune contra patógenos), estructurales (crecimiento y diferenciación de células epiteliales) y metabólicas; un ejemplo de estas últimas funciones es: la fermentación de sustratos no digeribles por las enzimas del huésped, produciendo ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) como: el acetato, butirato y propionato, además de gases. Los cuales son absorbidos en el colon y ciego, estimulando la absorción de sales, agua y la lipogénesis. Este fenómeno se ve incrementado en ratones obesos, por el aumento de los Firmicutes (figura 1). El acetato es el principal sustrato para la síntesis de colesterol. El butirato es la fuente de energía para las células epiteliales, además, se ha observado que el incremento de butirato en el plasma incrementa la expedición de energía y mejora la sensibilidad a insulina, (figura 1) (Lefebvre *et al.*, 2009).

Es importante resaltar que las incretinas son responsables de la secreción de insulina postprandial en un 70%, las dos principales incretinas son: A) el péptido inhibidor gástrico, secretado en respuesta a la ingesta oral de carbohidratos y lípidos. B) El péptido similar a glucagón 1, secretado por las células L de la mucosa, células del páncreas y neuronas. La secreción del primer péptido, en diabetes tipo 2 es normal, mientras que la secreción del segundo se reduce,

también parece reducirse en pacientes obesos en comparación a pacientes con IMC normal. Por lo tanto, se cree que la composición de la MI en obesos, puede contribuir en la reducción del péptido similar a glucagón 1 (Figura 1) (Vriezeet *al.*, 2010).

Si bien la MI es una aliada, cuando se altera puede ocasionar un desbalance energético en el huésped. Como se describe en el siguiente experimento. Un estudio realizado con ratones axénicos (libres de MI) y ratones con MI (denominados convencionales), mostró lo siguiente: los ratones axénicos a pesar de consumir 30% más alimento que los animales convencionales de la misma edad y peso, tenían 42% menos grasa corporal. Al realizar un trasplante de tubo digestivo de ratones convencionales (donantes) a ratones axénicos (recipientes), se encontró que en solo 10 días los ratones axénicos aumentaron un 57% de grasa corporal total. Dicho fenómeno fue acompañado de una elevación significativa de glucosa, insulina y leptina en circulación. También se observó que los adipocitos de los animales con MI eran de mayor tamaño que aquellos de los ratones axénicos. Esto por el aumento de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima implicada en la captación celular de ácidos grasos a partir de las lipoproteínas y en la acumulación de triglicéridos en los adipocitos (Stappenbeck *et al.*, 2002). Esta mayor actividad LPL se debe a la inhibición de Fiaf (“Fasting-Induced Adipocyte Factor”) por la MI; Fiaf es una hormona expresada constitutivamente en la mucosa intestinal de los ratones axénicos y que actúa como inhibidor circulante de la LPL (Figura 1) (Backhed *et al.*, 2004; Mandard *et al.*, 2006).

Diversos experimentos sugieren que la administración de una dieta alta en grasas por 4 semanas, altera la MI de los ratones, lo que provoca un predominio de bacterias Gram-positivas y disminución de bacterias Gram-negativas, esto comparado con el perfil de MI de un ratón no obeso. Este fenómeno tiene por consecuencia el incremento de 2-3 veces en las concentraciones plasmáticas de

lipopolisacárido (LPS), lo que genera una endotoxemia metabólica (Cani *et al.*, 2007 y 2008).

El LPS es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que se compone de una porción lipídica, muy conservada entre las especies, denominado lípido A, y una porción hidrofílica compuesta por azúcares que presentan una gran variabilidad estructural. El lípido A es responsable de las propiedades fisiopatológicas (secreción de citocinas, fiebre, hemorragias, etc...) de la endotoxina. El polisacárido O, le confiere a la bacteria la especificidad serológica (Rojas, 1995). La afinidad del LPS por las grasas permite su acumulación principalmente a nivel de tejido adiposo y otros órganos como músculo e hígado. Donde al interactuar con su receptor TLR4 y correceptor CD14, desencadena una serie de procesos inflamatorios, con la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1, MCP-1) (Lee *et al.*, 2010). La constante secreción de estas citocinas provoca una fosforilación inhibitoria del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1), lo que reduce la capacidad de los IRS-1 de asociarse a su receptor de insulina y por lo tanto inhibe la señalización río abajo y la acción de la insulina. Ocasionando que la glucosa no puede ser internalizada, lo que genera un estrés celular. Todo esto acompañado de hipertrofia e hiperplasia a nivel de tejido adiposo (figura 1) (Shoelson y Yuan, 2003).

El primer estudio que describe los cambios cualitativos de la MI en personas obesas se publicó por Ley *et al* (2006). En este estudio, el análisis de materia fecal de individuos obesos y delgados mostró un cambio en los filos de bacterias presentes en la materia fecal (menos Bacteroidetes y más Firmicutes en los obesos). Curiosamente, los autores observaron que después de la pérdida de peso (dieta baja en calorías, restringida en grasas y carbohidratos), la relación Bacteroidetes - Firmicutes se acercó al perfil de un paciente con IMC normal. Otro estudio realizado por Armougom *et al* (2009), donde participaron 20 pacientes obesos, 9 anoréxicos y 20 con normopeso, todos sin tratamiento. Mostró que la

concentración de *Bacteroides* fue menor en los pacientes obesos, mientras que la cantidad de *Lactobacillus* fue mayor.

Estos hallazgos indican, que los pacientes con obesidad tienen una composición distinta de la MI que los pacientes con normopeso. Sin embargo, aún queda por esclarecer el fenómeno de endotoxemia en estos pacientes, lo cual es muy importante ya que el LPS sérico tiene un impacto dramático en la inflamación de bajo grado y la resistencia a insulina (Cani *et al*, 2007).

El objetivo del presente estudio fue, analizar la asociación entre los principales grupos bacterianos del intestino, LPS y perfil metabólico de jóvenes con obesidad y peso normal. Esto con la finalidad de conocer el perfil bacteriano de nuestra población, así como los niveles de LPS sérico. Lo cual sentara las bases para estudios posteriores, que en conjunto podrán ser aplicados para brindar una asesoría nutricional, adecuada para cada paciente. Donde se incluyan las terapias con nuevos prebióticos o probióticos y/o simbióticos, lo que puede mejorar la salud de los Guerrerenses.

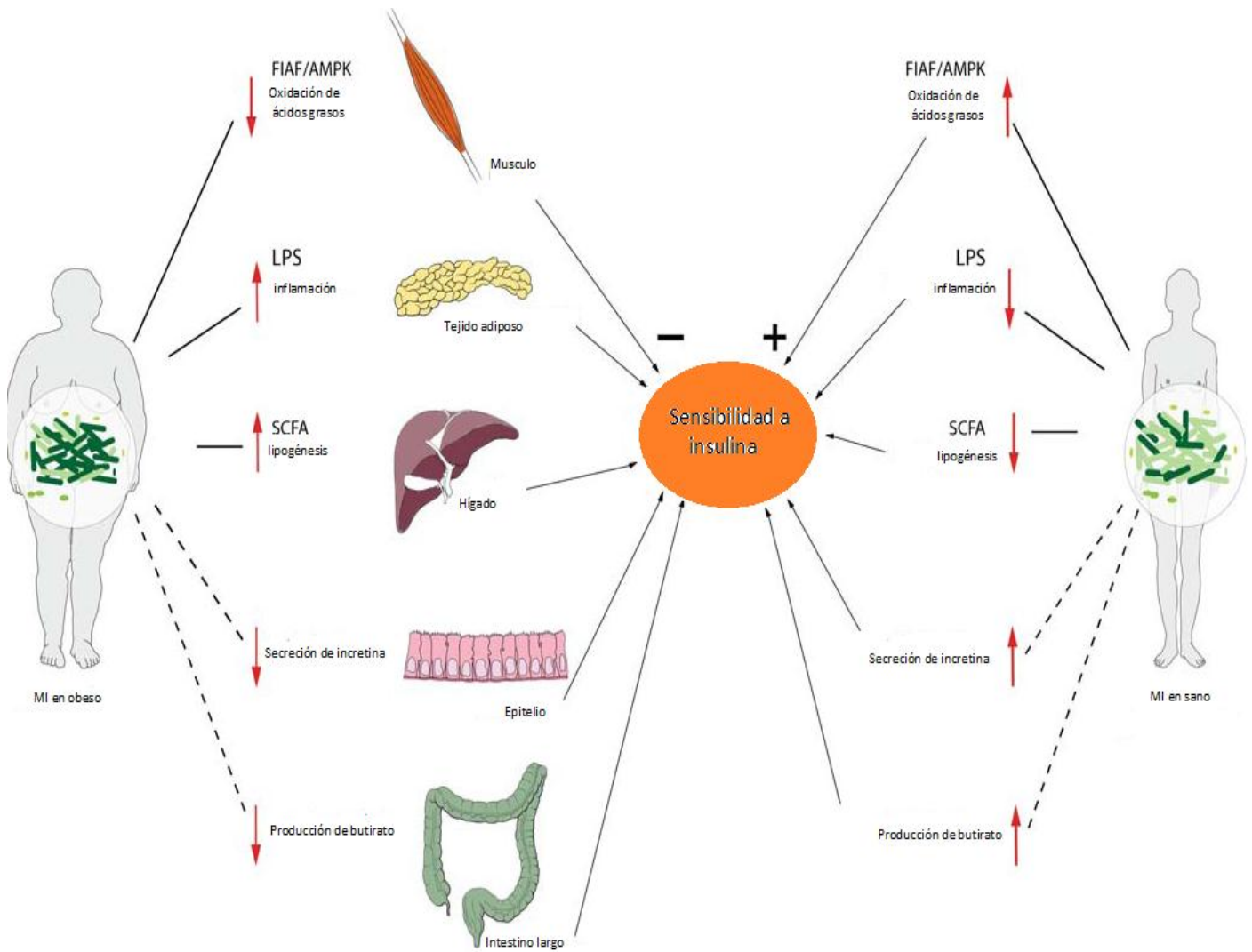


Figura 1. Los posibles vínculos entre la microbiota intestinal y el metabolismo. Basado en experimentos murinos (Modificado de Vrieze *et al.*, 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Los participantes fueron seleccionados durante el periodo de junio a noviembre del 2012. Se incluyeron hombres y mujeres de 18-25 años originarios del Estado de Guerrero, México. A cada uno de los jóvenes se le realizó una evaluación antropométrica, la cual consistió en la evaluación de peso, IMC, porcentaje de grasa y masa magra, determinados por impedancia bioeléctrica empleando la báscula de presión Tanita tbf-300, la talla se midió con un estadiómetro portátil de la marca Seca y la circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica. También se les aplicó un cuestionario sobre datos socioeconómicos, hábitos alimenticios, actividad física y antecedentes de enfermedades crónicas. A cada individuo se le explicó de manera verbal y escrita sobre el estudio, firmando así un consentimiento informado. De tal manera se formaron dos grupos de estudio: uno con $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ y otro con $IMC = 18.5-24.9 \text{ kg/m}^2$. Se excluyeron del estudio a pacientes bajo tratamiento con antibióticos y/o con suplementación con probióticos o prebióticos y mujeres embarazadas.

Toma de muestra y análisis bioquímico

La toma de muestra sanguínea se efectuó con 8 horas de ayuno previo, mediante venopunción, se utilizó un tubo al vacío sin anticoagulante para la obtención del suero y con ello realizar el perfil bioquímico. Las mediciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL-c y LDL-c se determinaron mediante un ensayo colorimétrico empleando reactivos de la marca Spinreact, así como un equipo semiautomatizado de Spinlab.

Determinación de LPS sérico

Para la determinación sérica de LPS se utilizó un kit basado en el extracto de limulus amebocito (QCL-1000, Lonza Grupo Ltd), validado por la FDA. Para cada cuantificación de LPS se construyó una curva estándar con las siguientes concentraciones: 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 unidades de endotoxina por mL (UE/mL)

(anexo 1). Las mediciones se realizaron en un equipo automatizado a 405 nm (Tecan 3500).

Recolección de materia fecal y extracción de ADN.

La materia fecal recolectada fue inmediatamente colocada en criotubos de 1.5 mL y congelada a -70°C , hasta su posterior análisis. Para la extracción de ADN se utilizó el mini kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany).

Análisis de la microbiota intestinal por PCR en tiempo real.

Los géneros bacterianos cuantificados en esta investigación fueron los siguientes; *Clostridium leptum*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* del grupo *fragilis*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* y *E. coli* (Cuadro 1). Se utilizaron cebadores descritos previamente para los diferentes géneros bacterianos (Matsuki *et al.*, 2008 y 2009). En la detección y amplificación por PCR se utilizó SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) utilizando el sistema ABI PRISM 7500-PCR (Applied Biosystems). Cada mezcla de reacción y protocolo de amplificación se basó en un ensayo de Matsuki *et al.*, 2009. Con modificaciones solo en las temperaturas de alineamiento (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía un 1 μL de ADN (10-30 ng), 1 μL de iniciadores a 0.25 μM y 5.5 μL de agua des-ionizada estéril.

Cuadro 1. Oligonucleotidos usados en la amplificación por PCR en tiempo real.

Grupo bacteriano	Iniciadores (5' \leftrightarrow 3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)
Bacterias totales	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT ATTACCGCGGCTGCTGGC	600	60
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATAGCCTTTTCGAAAGRAAGAT CCAGTATCAACTGCAATTTTA	495	50
<i>Clostridium leptum</i>	AAATGACGGTACCTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	239	50
<i>Prevotella spp</i>	CACRGTAACGATGGATGCC GGTCGGGTTGCAGACC	513	55
<i>Escherichia coli</i>	CATGCCGCGTGTATGAAGAA CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	95	60
<i>Bifidobacterium spp</i>	CTCCTGGAAACGGGTGG GGTGTCTTCCCGATATCTACA	550	55
<i>Lactobacillus</i>	TACATCCAACCTCCAGAACG AAGCAACAGRACCACGCC	90	55

Consideraciones éticas y de bioseguridad.

El proyecto fue realizado bajo los principios y lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki, Corea 2008. El consentimiento informado fue otorgado por cada participante. Los resultados de las mediciones somatométricas y bioquímicas fueron entregados en un formato de reporte especial a cada participante. Todos los RPBlS se trataron de acuerdo a la NOM-87-ECOL-SSA1-2002, la cual establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte y disposición final de los residuos peligrosos biológicos- infecciosos.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software STATA versión 11. Los datos no paramétricos fueron expresados en medianas y percentiles 25 y 75, las diferencias estadísticas se determinaron con la prueba de Mann-Whitney. La correlación de las variables fue calculada usando el coeficiente de correlación de Spearman. Las variables paramétricas se reportaron en media y desviación estándar y sus diferencias estadísticas fueron calculadas con la prueba de *t* student. En cuanto a los datos cualitativos se reportaron en frecuencias absolutas y relativas, haciendo la comparación entre grupos con χ^2 . En la comparación de medianas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y la asociación de las bacterias Gram negativas con el LPS se evaluó mediante modelos de regresión logística multinomial.

RESULTADOS

- Características clínicas y bioquímicas.

La edad promedio para ambos grupos de estudio fue de 21 años. Con una distribución homogénea por género. Siendo los jóvenes con obesidad los que presentaron un IMC de 34.5 (32.9-36.4) kg/m², mayor cantidad de triglicéridos, colesterol total, LDL-c, temperatura y circunferencia de cintura respecto a los individuos con normopeso. Los niveles de glucosa y HDL-c no mostraron diferencias significativas (cuadro 2). Además se encontró una correlación positiva entre la temperatura e IMC ($r=0.387$, $p=0.001$), donde se incluyeron ambos grupos de estudio.

Cuadro 2. Características clínicas y bioquímicas de los sujetos de estudio.

Características	Jóvenes con Normopeso (n=32)	Jóvenes con Obesidad (n=32)	P
Edad (años) ^a	21.06±1.93	21.43±1.93	0.443
Sexo n (%) ^b			
Femenino	19(59.38)	16(50.0)	0.451
Masculino	13(40.63)	16(50.0)	
IMC (kg/m ²) ^{&}	21.35 (19.85 - 22.8)	34.5 (32.9 - 36.45)	<0.001 *
Cintura (cm)	78.75(73.6-81)	108.5(102.6-116.1)	<0.001 *
Temperatura (°C)	35.85(35.5-36.45)	36.3(36.15-36.75)	0.001 *
Glucosa (mg/dL)	81(75-84.5)	80(74.5-87.5)	0.999
Colesterol total (mg/dL)	142(109.5-165)	168(151-194.5)	<0.001 *
HDL-c (mg/dL)	44.5(38-55.5)	44(37-55)	0.772
LDL-c (mg/dL)	96.5(80.5-119.5)	114(107-149.5)	0.002 *
Triglicéridos (mg/dL)	70(58.5-89.5)	123(95.5-156.5)	<0.001 *

^a Datos mostrados en media y desviación estandar, [&] medianas y percentiles 25 y 75, ^b frecuencias absolutas y relativas. * Valor significativo ($p < 0.05$) calculado con la prueba de t-student para datos independientes, Mann-Whitney y X^2 , respectivamente.

- Cuantificación de la microbiota intestinal

La cantidad de bacterias totales fue mayor para los individuos delgados en comparación con los individuos con obesidad. Sin embargo el grupo de obesidad presentó mayor cantidad de células/g de *Clostridium leptum* y *Lactobacillus* ($p < 0.001$) y un menor número de células/g de *Prevotella* y *E.coli* ($p < 0.001$). *Bacteroides fragilis* y *Bifidobacterium* permanecieron constantes en ambos grupos de estudio ($p > 0.050$) (cuadro 3).

Cuadro 3. Microbiota intestinal en individuos con Normopeso e individuos con obesidad.

Grupo Bacteriano	Jóvenes con Normopeso^{&} (n=32)	Jóvenes con Obesidad^{&} (n=32)	p
Bacterias totales	11.0[10.6-11.2]	10.7[10.4-11.0]	0.046*
Gram positivas			
<i>Clostridium leptum</i>	8.2[7.5-8.3]	8.9[8.3-8.9]	<0.001*
<i>Lactobacillus</i>	6.4[6.25-6.4]	6.9[6.6-6.9]	<0.001*
<i>Bifidobacterium</i>	7.1[6.1-7.9]	6.8[5.9-7.8]	0.527
Gram negativas			
<i>Bacteroides fragilis</i>	9.2[8.5-9.6]	8.7[7.0-9.8]	0.148
<i>Prevotella</i>	9.0[7.26-9.4]	7.6[6.1-7.6]	<0.001*
<i>E.coli</i>	9.7[8.8-10.1]	8.5[7.7-9.0]	<0.001*

[&] Mediana y percentiles 25 y 75 de \log_{10} células/g de materia fecal. *Valor significativo ($p < 0.05$) calculado con la prueba de Mann-Whitney.

- Unidades de endotoxina y su correlación con medidas antropométricas y niveles de triglicéridos.

Los niveles de LPS (endotoxina) sérico en el grupo con obesidad fueron de 1.22 (0.96- 1.51) UE/mL, ligeramente mayor que en el grupo con normopeso con 1.14 (0.72 – 1.31) UE/mL, sin diferencias significativas (figura 2). En la correlación del LPS sérico con IMC, por grupo de estudio, se observó que a medida que se elevan sus niveles también aumenta el índice de masa corporal, siendo mayor en el grupo de obesidad ($r=0.426$, $p=0.015$) que en el grupo con normopeso ($r=0.302$, $p=0.092$) (figura 3). Curiosamente al comparar las UE/mL por sexo, se encontró un ligero aumento del LPS en el sexo femenino 1.20 (0.85 - 1.52), respecto al sexo masculino 1.16 (0.97 - 1.35), pero sin diferencias significativas. Este fenómeno permaneció constante al correlacionar el LPS sérico con la circunferencia de cintura, para las mujeres se obtuvo una $r= 0.347$, con un valor $p= 0.040$ y para hombres una $r=0.169$, con un valor $p=0.325$ (Figura 4).

En la figura 3, se observa que los niveles de LPS correlacionan de manera positiva con los niveles de triglicéridos, siendo 0.415 veces mayor en los individuos con obesidad, que en los de normopeso. Además esta tendencia aumenta si el individuo es del sexo femenino ($r=0.358$, $p=0.034$), y disminuye drásticamente si es del sexo masculino ($r=0.044$, $p=0.817$) (figura 4).

También se evaluó la asociación entre el LPS y la temperatura corporal, sin encontrar diferencias significativas ($r=0.083$, $p=0.513$).

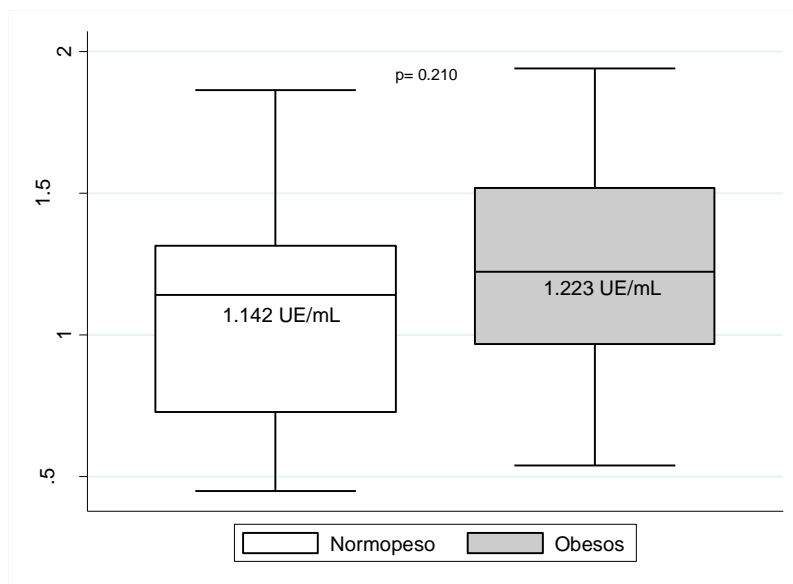
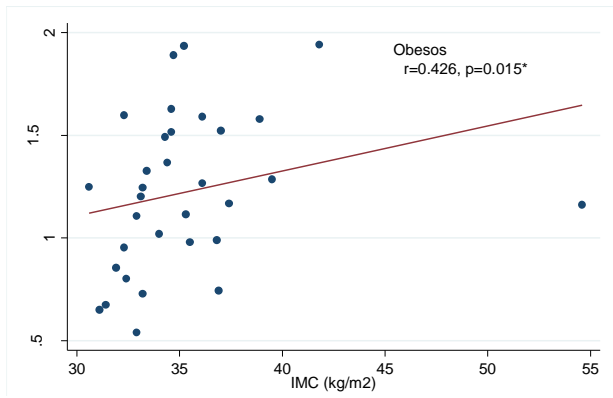
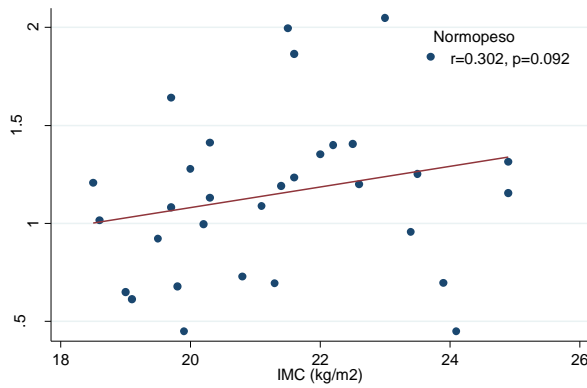


Figura 2. Niveles de LPS en individuos con normopeso y obesidad. Los resultados se presentan en medianas (p25 y p75). No se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos de estudio ($p > 0.05$), se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

A)



B)

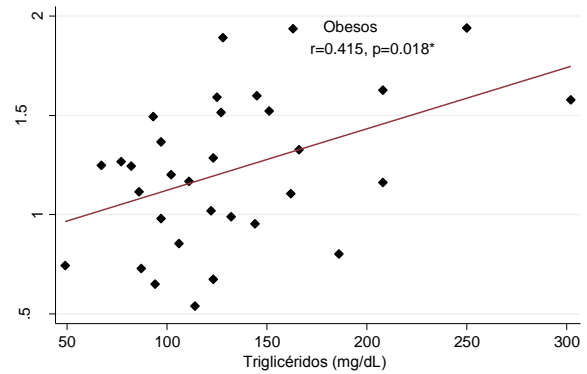
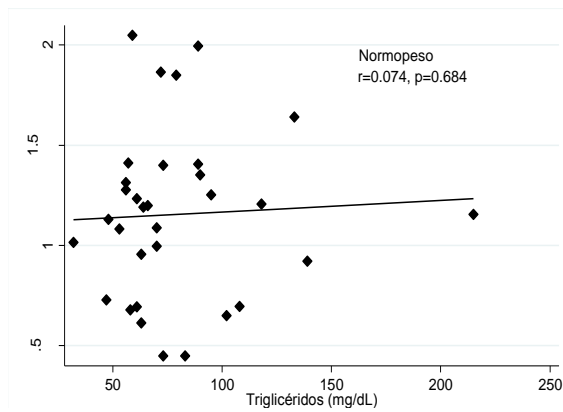
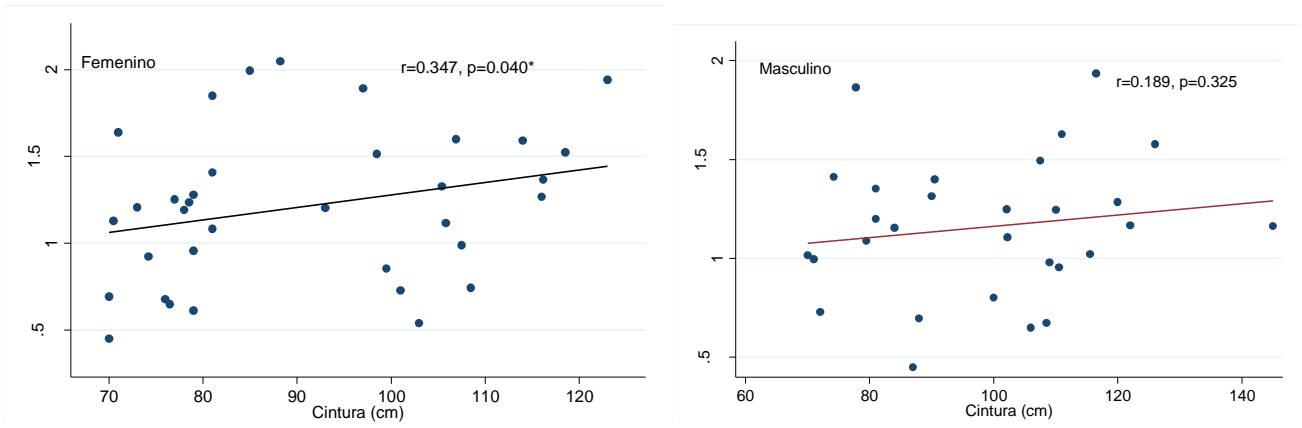


Figura 3. Correlación entre el LPS con IMC y triglicéridos, comparación por grupo de estudio. **A)** gráficos para el IMC. **B)** gráficos para triglicéridos. *Valor significativo ($p < 0.05$) por correlación de Spearman.

A)



B)

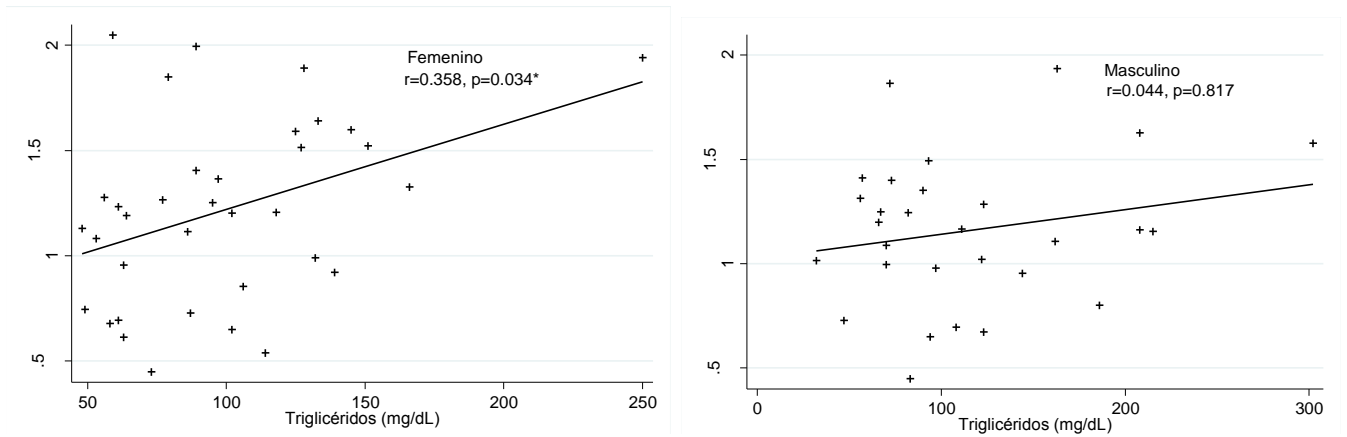


Figura 4. Correlación entre LPS sérico con la circunferencia de cintura y triglicéridos, comparación por sexo. **A)** gráficos para la circunferencia de cintura. **B)** gráficos para triglicéridos. *Valor significativo ($p<0.05$) por correlación de Spearman.

- Bacterias Gram negativas asociadas a la endotoxemia metabólica subclínica.

En la tabla 4 se muestra una comparación del número de bacterias Gram negativas presentes en cada tercil de LPS, es importante resaltar que para la bacteria *E. coli* se obtuvo una diferencia significativa, siendo el segundo tercil (1/1.3UE/mL) el que presentó menor número de bacterias, respecto del primero y segundo tercil. En cuanto a *Prevotella* y *B. fragilis* no se observa ninguna diferencia significativa, pero el menor número de bacterias se encontró en el primero tercil y segundo tercil respectivamente.

Tabla 4 .Bacterias Gram negativas de acuerdo a los terciles de endotoxina.

Bacterias Gram negativas^a	< 1 UE/mL (21)	1/1.3 UE/mL (21)	>1.3 UE/mL (22)	p
<i>E.coli</i>	9.431(8.823 - 9.974)	8.627(8.089 - 9.070)	9.279(8.627 - 9.441)	0.036*
<i>Prevotella</i>	7.047(6.398 - 7.394)	7.122(6.398 - 7.394)	7.368(6.398 - 7.394)	0.789
<i>B. fragilis</i>	8.953(8.466 - 9.012)	8.569(7.521 - 9.164)	9.021(8.569 - 9.960)	0.526

^a Se muestra mediana y percentiles 25 y 75 de log₁₀células/g de materia fecal. UE/mL (unidades de endotoxina por mililitro).*Valor significativo (p<0.050) calculado por la prueba de Kruskal-Wallis.

Si bien el riesgo de sufrir una endotoxemia metabólica subclínica está ligado a la presencia de bacterias Gram negativas, es importante saber que géneros en específico están involucrados. Por lo cual, en la tabla 5 se refleja que la bacteria *E.coli* representa un riesgo alto y significativo en la producción de una endotoxemia metabólica subclínica, con cifras que van desde 1.0 a 1.3 UE/mL.

En el caso de *Prevotella* tiene un valor significativo, pero el riesgo de sufrir una endotoxemia es bajo. Por otro lado *B. fragilis* tiene un riesgo mayor de 1, sin una diferencia significativa.

Tabla 5. Bacterias Gram negativas y el riesgo de producir una endotoxemia subclínica.

Bacterias Gram negativas	< 1 UE/mL^a (21)	1/1.3 UE/mL (21)	>1.3 UE/mL (22)
<i>E.coli</i>	1	4.378 (1.559 - 12.292) 0.005*	2.438 (0.975 - 6.096) 0.057
<i>Prevotella</i>	1	0.404 (0.164 - 0.993) 0.048*	0.645 (0.975 - 6.096) 0.276
<i>B. fragilis</i>	1	1.431 (0.617 - 3.317) 0.403	0.751 (0.331 - 1.707) 0.495

^a Categoría de referencia. OR (IC95%), ajustado por sexo. * Valor significativo (p<0.05).

- *Clostridium leptum* y su correlación con IMC y triglicéridos.

Es importa mencionar que se encontró una correlación positiva y significativa entre la bacteria *Clostridium leptum* con el IMC (r=0.414, p=0.007) y los triglicéridos (r=0.306, p=0.013) en circulación.

DISCUSIÓN

Recientemente, han surgido múltiples publicaciones que plantean un posible rol de la MI, tanto en el desarrollo de obesidad como de la diabetes. Esta hipótesis nace de la observación de que pacientes obesos presentan un cambio en la cantidad de bacterias intestinales de la MI, en comparación con los de individuos con normopeso, que presentan mayor número de bacterias Gram negativas y menor número de Gram positivas (Til, 2010). Además el LPS presente en las bacterias Gram negativas, ha sido señalado como factor desencadenante de inflamación de bajo grado, causante de una endotoxemia metabólica (Cani *et al.*, 2007). Sin embargo, este hecho no se ha esclarecido en humanos. Por ello, en el presente estudio se planteó encontrar una asociación entre los principales grupos bacterianos de la MI (bacterias Gram negativas y Gram positivas), el LPS sérico y los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos) de jóvenes con obesidad y peso normal.

Para esto se midieron los parámetros bioquímicos y antropométricos de cada grupo de estudio. Como se esperaba, los jóvenes con obesidad tuvieron niveles elevados de colesterol total, LDL-c y triglicéridos, así como una mayor circunferencia de cintura y temperatura corporal. Las características antropométricas (IMC, cintura, edad y temperatura) indicadas en este estudio son muy similares a lo reportado por Corona y García (2011), que al igual trabajaron con jóvenes obesos y con normopeso del Estado de Guerrero, cabe mencionar que en el perfil bioquímico solo se pudo comparar con los niveles de glucosa (en ambos estudios no hubo diferencias significativas), ya que los demás parámetros no fueron reportados. Además, aunque no hubo diferencias significativas en los niveles de HDL-c, se nota que estos valores son muy bajos en ambos grupos de estudio, lo cual indica que los pacientes no llevan un estilo de vida saludable y con el paso de los años podrían ser propensos a sufrir alguna enfermedad metabólica (Ferranti y Mozaffarian, 2008).

Otros estudios han demostrado que la obesidad abdominal está asociada con inflamación crónica de bajo grado (Moreno y Martínez, 2002). En nuestros resultados se encontró que la circunferencia de cintura en hombres y en mujeres supera el límite normal y caen dentro de la zona de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus o enfermedad cardiovascular, lo que concuerda con el estudio de Carranza y López, 2009.

Por muchos años se ha pensado que el factor desencadenante de la obesidad es la relación gasto-consumo y que también son relevantes los genes que interaccionan con el ambiente, alimentación, estrés y actividad física (Harris *et al*, 2012). Pero hoy en día ha surgido un nuevo modelo donde la relación es triangular, es decir, que la interacción es gen- ambiente y metagenoma intestinal (Harris *et al*, 2012). Este nuevo modelo surge de los resultados observados en ratones, donde claramente se ve que dietas altas en grasas causan un desequilibrio en la MI (disbiosis intestinal), ocasionando una endotoxemia metabólica (Backhed *et al*, 2004; Cani *et al* 2007 y Delzene *et al.*, 2011). Aunque en nuestro estudio no se evaluó la ingesta de grasas, esta variable se refleja de manera indirecta en los niveles de triglicéridos y colesterol total, LDL-c y HDL-c. De esta forma se encontró que en los pacientes obesos la cantidad de bacterias totales fue menor, dato muy similar a lo reportado por Santacruz *et al*, (2009). Este fenómeno se puede atribuir a una disbiosis intestinal, reflejada en un menor número de bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Prevotella*) y mayor número de bacterias Gram positivas (*C. leptum* y *Lactobacillus*), comparando con los individuos de normopeso, estos resultados coinciden con lo reportado por Ley *et al*, (2006) y Armougom *et al* (2009). Aunque el número de células de *Bacteriodes fragilis* y *Bifidobacterium* se mantuvo constante en ambos grupos de estudio.

En los niveles de LPS sérico no se encontraron diferencias significativas por grupo de estudio, aunque se observó un ligero aumento de esta molécula en los pacientes obesos (0.08 UE/mL), lo que a largo plazo podría resultar nocivo para la salud de estos individuos. Una explicación por la cual no se encontraron

diferencias significativas en los niveles de LPS, podría ser que las muestras de sangre se tomaron solo en condiciones de ayuno en un horario de 7 a 9 de la mañana, y los experimentos con ratones indican que el aumento del LPS se da después del tratamiento con grasas (aceite de oliva), alcanzando su concentración máxima en condiciones de oscuridad, que cuando se expone a la luz (Cani *et al*, 2007). Además, un estudio en pacientes con obesidad mórbida, indica que el aumento del LPS solo se presenta en condiciones de hipertrigliceridemia postprandial (Postigo *et al.*, 2010). Por esto, se comparó entre los jóvenes con triglicéridos mayores a 150 mg/dL, encontrando que de los 64 pacientes, solo 10 presentaron esta característica, de los cuales 9 pertenecían al grupo de obesos y solo 6 de ellos tuvieron concentraciones altas de LPS >1.31 UE/mL (datos no mostrados). Estas tendencias sugieren que efectivamente el incremento del LPS se ve favorecido cuando hay una hipertrigliceridemia, las cuales generalmente se dan después del consumo de alimentos, lo que facilitan el aumento de tejido adiposo. Este hecho que se correlaciona con los siguientes resultados; donde a medida que se eleva el LPS sérico, también se incrementan los triglicéridos en circulación, la circunferencia de cintura y el IMC, siendo esta tendencia mayor si el paciente es obeso del sexo femenino. Esta situación se explica debido a que las mujeres pueden almacenar mayor grasa corporal que los varones (Moreno y Martínez, 2002).

Dado que el LPS tiene la característica de ser un pirógeno endógeno, se buscó una correlación con el incremento de temperatura, sin embargo no se encontró asociación con este parámetro y se observó una correlación positiva con el IMC ($r=0.387$, $p=0.001$), lo que sugiere que el aumento de temperatura solo se debe al peso corporal. Los pacientes con obesidad acumulan tejido adiposo, el cual no almacena agua e impide la libre transpiración corporal, este hecho se complica en estaciones calurosas como lo es primavera - verano, y se ve reforzado con una baja actividad física, ya que hay poca liberación de energía, lo que favorece el aumento de la temperatura interna (Moreno y Martínez, 2002). Es importante

mencionar que la captación y toma de medidas clínico- antropométricas se hicieron en épocas de verano e inicios de otoño (Junio- Noviembre 2012).

El LPS es continuamente producido en el intestino a través de la lisis de las bacterias Gram negativas, dicho fenómeno facilita la disponibilidad de esta molécula para su absorción al torrente sanguíneo, lo que ocasiona generalmente la disminución de estas bacterias (Cani *et al*, 2007). Este hecho concuerda con lo encontrado en nuestro estudio, ya que cuando hay un menor número de células de *E.coli* hay un mayor riesgo de tener niveles de LPS que van desde 1 a 1.3 UE/mL, este comportamiento se ve reflejado también con *B. fragilis* solo que esta bacteria no presento una diferencia significativa, por otro lado *Prevotella* tuvo un comportamiento distinto al descrito, presentando un riesgo bajo en el segundo tercil de endotoxina (1/1.3 UE/mL).

Seguramente hay otras bacterias Gram negativas de la familia de las Enterobacterias que no se incluyeron en la investigación, que pueden estar aportando LPS. Además, hay que tener en cuenta que en la cavidad oral también hay bacterias Gram negativas que mueren constantemente y llegan a la luz intestinal, de manera normal hay pequeñas cantidades de endotoxinas (endotoxemia metabólica) que cruzan la barrera de la mucosa intestinal y alcanzan la circulación portal al hígado y otros órganos como, tejido adiposo y músculo (Wiedermann *et al.*, 1999; Manco *et al*, 2010). Estas moléculas llegan a ser eliminadas, por el sistema fagocítico mononuclear en el hígado y solo conducen a una activación localizada y restringida del sistema inmune del huésped. Sin embargo, la translocación de las endotoxinas se vuelva peligrosa, cuando una excesiva cantidad de estas moléculas cruza la barrera intestinal, y supera al sistema fagocítico mononuclear, o por otro lado, que la capacidad del hígado para destoxificar este comprometida. Lo que puede causar una sepsis, con valores de 3.1- 4.4 UE/mL (Danner, 1991; Venet, 2000). Hasta al momento no están establecidos los parámetros normales de endotoxinas en pacientes sanos o con un IMC normal, hay estudios que reportan a esta molécula como no detectada y

en otros casos concentraciones de hasta 1.3 ± 0.2 UE/mL (Wigg, 2001; Thuy, 2008). Estas cifras varían dependiendo de la población de estudio y por supuesto de su tipo de dieta; en una investigación realizada por Amar *et al.*, (2008) reportan que las concentraciones plasmáticas del LPS, inducidas por dietas altas en grasas, son suficientes para desencadenar enfermedades metabólicas, tales como la obesidad y la resistencia a insulina a través de la inflamación mediada por el receptor CD14, principal receptor del LPS, esto en base a estudios con modelos animales. Por otro lado en humanos se encontró una relación positiva entre la ingesta de alimentos y el LPS en plasma, lo cual refuerza la hipótesis de que las grasas favorecen el transporte de LPS, transporte mediado principalmente por los quilomicrones a nivel de torrente sanguíneo (Postigo *et al.*, 2012).

Se conoce que las bacterias Gram positivas pertenecientes al Phylum Firmicutes fermentan gran cantidad de carbohidratos complejos. Dentro de este grupo tenemos a los *Mollicutes*, *Lactobacillus* y *C. leptum*, solo por mencionar algunos (Turnbaugh *et al.*, 2006). Entre los productos de la fermentación de estas bacterias destacan los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés), los cuales son utilizados a nivel hepático para sintetizar *lípidos de novo* los cuales pueden ser incorporados al metabolismo humano o bacteriano. Un hecho interesante es que en las deposiciones de los pacientes obesos se ha encontrado poca cantidad de SCFA y en los normopeso hay mayor cantidad de SCFA. Esto concuerda con los estudios del genoma bacteriano, donde las bacterias aisladas de sujetos obesos tienen vías metabólicas altamente funcionales, encargadas de extraer toda la energía posible de los alimentos. Cabe mencionar que en nuestro estudio las bacterias Gram positivas cuantificadas *C. leptum* y *Lactobacillus*, estuvieron en mayor número en los individuos con obesidad respecto a los pacientes con normopeso. Además, se encontraron correlaciones entre *C. leptum* con los triglicéridos en circulación e IMC, donde a medida que aumenta el número de células de esta bacteria también incrementan los triglicéridos y el IMC. Este fenómeno puede estar ligado al metabolismo particular de *C. leptum*, que de manera constitutiva expresa lipasas, pero su expresión puede estar influenciada

por las condiciones nutricionales del ambiente como dietas ricas en grasas, ya que algunas lipasas hidrolizan los triglicéridos exógenos para proporcionar ácidos grasos que funcionan como fuente de energía para las bacterias. Además, el glicerol resultante se puede usar en la síntesis de ácidos teicoicos o lipoteicoicos. Los ácidos lipoteicoicos son moléculas anfifílicas ancladas a la membrana citoplasmática por interacciones hidrofóbicas, mientras que los ácidos teicoicos son moléculas que están covalentemente unidos al peptidogluclano de la pared celular. Si bien estas son solo algunas características de la adaptabilidad bacteriana, cruciales para su supervivencia y permanencia en el intestino humano (Gutierrez y Cardoso, 2006). Lo que contribuye a un aporte extra de energía, que en humanos se almacena en forma de tejido adiposo.

Finalmente, se esperaba una disminución de las bifidobacterias en los sujetos obesos, así como en el número de *B. fragilis*, pero no fue así, la cantidad de estos microorganismos permaneció constante en ambos grupos de estudio, lo cual concuerda con la cantidad de LPS encontrado en los pacientes obesos (sin diferencias significativas). Según lo reportado por Cani *et al* (2008), cuando hay niveles elevados de LPS, el número de bifidobacterias tienden a disminuir, así también el número de bacteroides, esto por la mayor permeabilidad del epitelio intestinal.

Como se explicó, hay diferentes vías por las cuales la MI puede participar en el metabolismo humano, todo dependerá de nuestro estilo de vida y claro la carga genética. Sin embargo, para complementar el estudio será interesante cuantificar de manera general el Phylum de Bacteroidetes y Proteobacterias presentes en la MI, en particular el género de *Enterobacter*, ya que un estudio publicado por Fei y Zhao (2013), lo cita como un patógeno oportunista causante de obesidad. Además, será importante hacer la medición del LPS antes y después de la ingesta de alimentos, si es posible medir la fracción de cada lipoproteína (quilomicrones, LDL-c, HDL-c y VLDL-c) unida al LPS, ya que se cree que el complejo -LPS-LBP- (Protein binding to LPS) Quilomicrones- puede ser un mecanismo de defensa local

del intestino contra la translocación de la toxina bacteriana, ya que este mecanismo impide la activación celular por parte del LPS (Vreugdehil *et al.*, 2003). Por lo que no se ha podido esclarecer el fenómeno de endotoxemia metabólica como tal en humanos.

Entender la participación de la MI en el metabolismo humano no es fácil, ya que son procesos muy complejos, en los que participan de manera conjunta, los microorganismos y el huésped, y no en condiciones controladas como se observa en modelos animales. Una finalidad de los estudios epidemiológicos es corroborar si los resultados observados en modelos murinos, también aplican o tienen el mismo comportamiento en humanos, esto para garantizar su confiabilidad.

Es un reto muy grande seguir estudiando la MI y sobre todo poder integrar los conocimientos que se generan día con día, para crear nuevas herramientas y estrategias capaces de mejorar la salud de las personas afectadas por enfermedades crónicas, como la obesidad y comorbilidades asociadas. Para cumplir con este objetivo tenemos que responder a las preguntas siguientes: ¿Es la modulación de la microbiota intestinal una estrategia útil para tratar a pacientes con estas enfermedades? y, en caso afirmativo, ¿Cómo serían las características de una supuesta microbiota intestinal 'ideal'? ¿Puede ser transformado este conjunto de características por medio de intervenciones nutricionales o farmacéuticas? ¿Son los prebióticos y/o probióticos una buena opción?, de ser así, ¿Qué bacterias serían las ideales? Es de esperar que las respuestas a estas preguntas pudieran contribuir a mejorar la calidad de vida de centenares de millones de pacientes en todo el mundo.

CONCLUSIÓN

- Los pacientes con obesidad presentaron una mayor concentración de triglicéridos, colesterol total y LDL-c, así como una mayor circunferencia de cintura y temperatura corporal, esto en comparación a los individuos con normopeso.
- Los pacientes con obesidad presentaron una menor cantidad de bacterias totales que los pacientes con normopeso, posiblemente por una disbiosis intestinal.
- En los jóvenes obesos la cantidad de células de *C. leptum* y *Lactobacillus* fue mayor y el número de células de *E.coli* y *Prevotella* estuvo en menor cantidad que en los pacientes con normopeso.
- Los niveles de endotoxina para cada grupo de estudio fueron muy similares y no mostraron diferencias significativas.
- Se correlacionó el incremento de LPS con el aumento de los triglicéridos en circulación, la circunferencia de cintura y el IMC.
- La bacteria Gram negativa de *E. coli* mostro un aporte significativo del LPS, el cual va de 1.0 a 1.3 UE/mL.
- El incremento de *C. leptum* está correlacionado con el aumento de los triglicéridos y el IMC.

- En nuestro estudio se encontró que el riesgo de sufrir una endotoxemia metabólica subclínica por *E.coli* es mayor y significativo que el riesgo de sufrir una endotoxemia por *Prevotella* o *B. fragilis*
- Tener obesidad abdominal y ser del sexo femenino pueden favorecer la endotoxemia metabólica subclínica.

ANEXOS

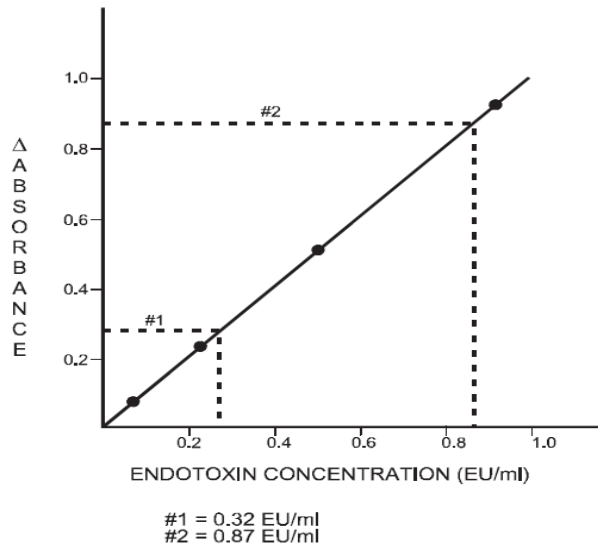
Anexo 1

Procedimiento del ensayo del Lisado de Limulus Amebocito (LLA).

Técnica de Microplaca.

1. Pre-incubar la microplaca a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ en un block adaptador.
2. Dispensar 50 μL de la muestra problema o estándar (deben tener una temperatura de 20 a 25 $^{\circ}\text{C}$).
3. En el caso del control negativo, agregar 50 μL del agua LAL.
4. Mezclar e incubar a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos.
5. Posteriormente agregar 100 μL la solución del substrato (previamente incubado a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$).
6. Mezclar e incubar a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 minutos.
7. Inmediatamente agregar 100 μL el reactivo de parada (ácido acético al 25%).
8. Mezclar inmediatamente y medir la absorbancia con un filtro de 405-410 nm. La reacción es estable por 10 minutos.

Curva estándar



Anexo 2

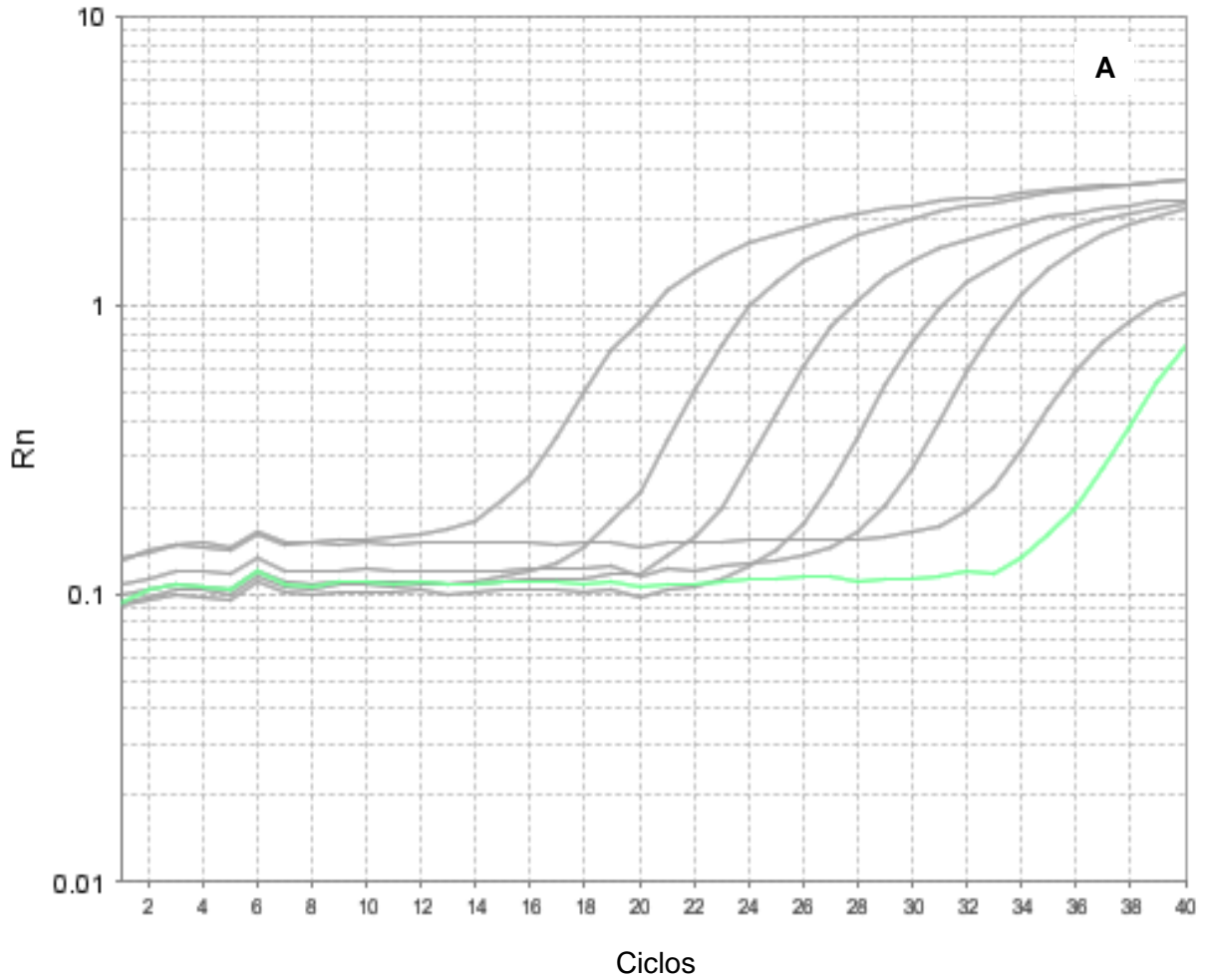
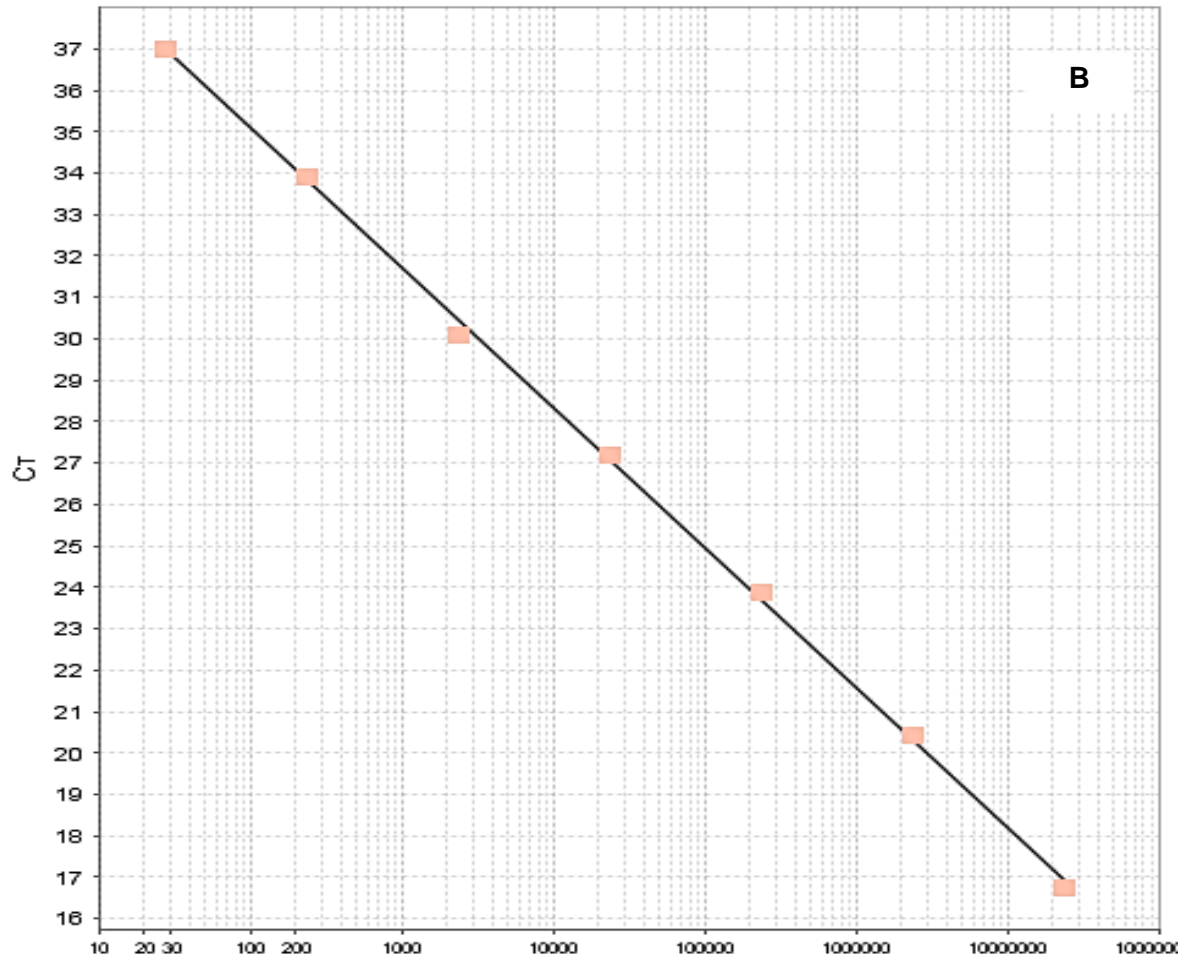
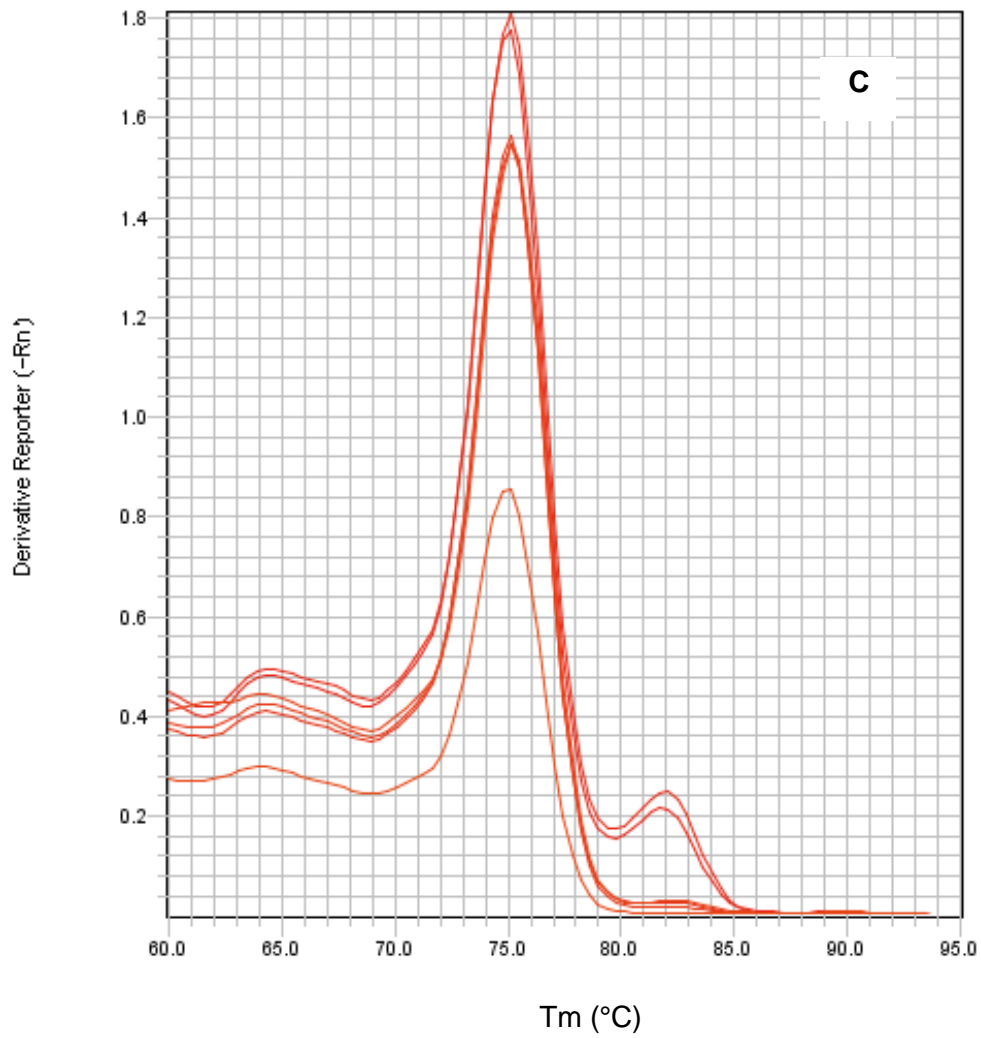


Figura 5. Estandarización de la PCR en tiempo real. A) amplificados derivados de una serie de diluciones del ADN de *E. coli* ATCC 25922 (se partió de un stock de 24×10^6 UFC/ μ L), se incluye un control negativo (línea verde).



B) Curva estándar: R^2 : 0.999, pendiente: -3.375.



C) en la curva de disociación se observa un solo conjunto de picos apilados, lo cual garantiza la especificidad de los iniciadores utilizados.

REFERENCIAS

Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J., et al. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The Ameri J of Clinical Nutri*, 87:1219-23.

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:e7125.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., et al. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 15718 –23.

Cani, P., Amar, J., Iglesias, M., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56: 1761-72.

Cani, PD., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, AM., Delzenne, NM., et al. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet–induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57: 1470-81.

Carranza-Madrigal, J y López-Corona, S. (2009). Resistencia a insulina sin síndrome metabólico: ¿Cuáles son sus implicaciones cardiometabólicas? *Med Int Mex*, 25 (4): 255-62.

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

Corona, C y García, V. Prevalencia de resistencia a insulina y acantosis nigricans en jóvenes con obesidad y bajo peso. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero, 2011.

Danner, RL., Elin, RJ., Hosseini, JM., et al. (1991). Endotoxemia in human septic shock. *Chest*, 99:169–175.

Delzenne, N., Neyrinck, A., Cani, P. Review. (2011). Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in

the context of obesity and metabolic syndrome. *Microbi cell factories*, 10(Suppl 1):S10.

Dethlefsen, L., Fall-Ngai, M., Relman, DA. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*, 449:811–818.

Fei, N and Zhao, L. (2013). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME Journal*, 7, 880-884.

Ferranti, S and Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction and metabolic consequences. *Clinical chemistry*, 54:945-55.

Harris, K., Kassis, A., Major, G., Chou, C. Review. (2012). Is the Gut Microbiota a New Factor Contributing to Obesity and Its Metabolic Disorders? *J of Obesity*. doi:10.1155/2012/879151.

Hsiao., CM, Fraser-Liggett. (2009). Human Microbiome Project–paving the way to a better understanding of ourselves and our microbes. *Drug Discov Today*, 14:331-333.

Knop, FK., Vilsboll, T., Hojberg, PV et al. (2007). Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*, 56:1951–1959.

Lee, JY., Zhao, L., Hwang, DH. (2010). Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr Rev*, 68:38–61.

Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B. (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*, 89:147–191.

Ley, R.E., P.J. Turnbaugh, S. Klein and J.I. Gordon. (2006). Microbial ecology Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444:1022–3.

Manco, N., Putignani, y L., Bottazzo, G. (2010). Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocrine Review*, 31(6):817-844.

Mandard, S., Zandbergen, F., van Straten, E., Wahli, W., Kuipers, F., Muller M, et al. (2006). The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem*, 281: 934-44.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., et al. (2002). Development of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*, 68:5445-51.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., Tanaka R. (2004). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*, 70:7220–8.

Moreno, M y Martinez, J. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *ANALES Sis San Navarra*, Vol. 25, suplemento 1.

Postigo, C., Ortuño, Q., Murri, M., et al. (2012). Endotoxin increase after fat overload is related to Postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J of lipid research*.

Rojas, N. (1995). El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. *Rev. Costarricense de Ciencias Médicas*. 16-3:71-87.

Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí A., Matillas, M., Campoy, C. (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity*, 17: 1906-15.

Stappenbeck, TS., Hooper, LV., Gordon, JI. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 15451-5.

Shoelson, SE., Lee, J., Yuan, M. (2003). Inflammation and the IKK α /I β /NF- κ B axis in obesity—and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27(Suppl 3): S49–S52.

Turnbaugh, PJ., Ley, RE., Mahowald, MA., Magrini, V., Mardis, ER., Gordon, JI. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*; 444: 1027-31.

Thuy, S., Ladurner, R., Volynets, V., Wagner, S., Strahl, S., et al. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr*, 138:1452–1455.

Venet, C., Zeni, F., Viallon, A., Ross, A., et al. (2000). Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock. *Intensive Care Med*, 26:538–544.

Vilsboll, T., Holst, JJ. (2004) Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 47:357–366.

Vreugdenhil, A., Rousseau, C., Hartung, T., et al. (2003). Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein Mediates LPS Detoxification by Chylomicrons. *J of Immunology*, 170:1399-1405.

Vrieze, A., Holleman, F., Zoetendal, E., et al. (2010). Review. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, 53:606-613.

Wiedermann, C., S, Kiechl, S, Dunzendorfer., et al. (1999). Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol*, 34:1975–81.

Wigg, AJ ., Thomson, IC., Dymock, RB., McCarthy, PJ., Grose, RH., Cummins AG. (2001). The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor_ in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 48:206–211.

Xu J, Gordon JI. (2003). Inaugural article: honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:10452–10459.

Zoetendal, E., Vaughan, E., de Vos W. (2006). A microbial world withinus. *Mol Microbiol*, 2006:59:1639–1650.