



**Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla**

Licenciatura en Biomedicina



Título:

**“Evaluación del marcador molecular *pqqCDE* en
muestras fecales de individuos con Síndrome
Metabólico”**

Tesis para obtener el título de: Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Alexis Macías Villafuerte

Asesor de tesis:

D. C. Ricardo Carreño López

Puebla de Zaragoza, octubre de 2022

Índice

1. Introducción ()
2. Antecedentes
 - 2.1 Generales ()
 - 2.2 Específicos ()
3. Justificación ()
4. Planteamiento ()
5. Hipótesis ()
6. Objetivo ()
7. Metodología
8. Resultados
9. Discusión
10. Conclusión
11. Perspectivas
12. Referencias

Resumen

En los últimos años se ha hecho evidente que el estrés oxidativo ha sido uno de los componentes clave en el desarrollo de múltiples anomalías metabólicas relacionados con el síndrome metabólico (SM).

El hallazgo de disbiosis intestinales en el SM ha aperturado el estudio de los mecanismos moleculares que provocan el desarrollo progresivo del SM, la inflamación crónica y la microbiota involucrada.

En este trabajo se aborda la función antioxidante de la quinona de pirroloquinolina y su potencial producción en el bacterioma intestinal de individuos que padecen SM.

Se evaluó la posibilidad de analizar el bacterioma potencialmente productor de PQQ, a través del marcador molecular *pqqCDE*, para lo cual se evaluó la posibilidad de amplificar por PCR dicho marcador molecular en muestras fecales de individuos “sanos” y con diagnóstico de SM.

Los resultados muestran que es posible amplificar por PCR el marcador molecular *pqqCDE* de muestras fecales, observando que en los individuos sanos hubo menos amplificadas que en los individuos con Síndrome Metabólico.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Metabólico (SM) es un término que suena cada vez más, pues su alta utilización del marcador molecular *pqqCDE* prevalencia, así como su relación con el constante aumento de obesidad en el mundo lo han convertido en un riesgo para la salud mundial. El SM es una epidemia que día tras día aumenta su presencia en países desarrollados y subdesarrollados. En México, más de la mitad de la población tiene sobrepeso u obesidad declarada, mientras que un 90% de la población mantiene una vida poco activa, lo que los convierte en personas muy vulnerables ante esta epidemia. La predisposición genética y en particular, el escaso consumo de alimentos de alto valor nutricional, los cuales han sido reemplazados con alimentos hipercalóricos, ha generado un aumento progresivo en los casos de gente diagnosticada con Diabetes Mellitus y enfermedades cardiovasculares (Skogberg *et al.*, 2022). Dichas enfermedades provocan una inflamación prolongada en diferentes tejidos del organismo, lo que conlleva a un incremento considerable del estrés oxidativo en individuos que las padecen, aumentando su morbilidad a niveles alarmantes. Según diversos estudios, el cambio en la composición microbiana intestinal se ha convertido en un punto clave para el aumento progresivo en todas estas anomalías, pues este cambio tan significativo permite la colonización de múltiples patógenos que potencian más la respuesta inflamatoria, reflejando un aumento masivo de moléculas altamente reactivas que provocan un deterioro a nivel celular (Xia *et al.*, 2016).

En los últimos años, se ha estudiado el potencial antioxidante de la quinona de pirroloquinolina, PQQ por sus siglas en inglés (**P**irrole-**Q**uinoline **Q**uinone) molécula generada exclusivamente en bacterias con funciones de cofactor enzimático en deshidrogenasas, pero que también posee un alto poder antioxidante, el cual quizás pueda ser de ayuda en respuesta a la alta cantidad de agentes oxidantes presentes en el microambiente intestinal (Sasakura *et al.*, 2017), por lo que es de nuestro particular interés brindar nueva información acerca de la presencia de bacterias potencialmente productoras de PQQ en el intestino, sobre todo de pacientes que

sufren inflamación crónica y estrés oxidativo continuo como en el Síndrome Metabólico.

ANTECEDENTES GENERALES

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es conocido por ser una de las afecciones más riesgosas, debido a que engloba enfermedades metabólicas con mayor índice de morbilidad como la dislipidemia, hipertensión, diabetes tipo 2 y múltiples enfermedades cardiovasculares. Según la OMS los individuos que padecen SM deben evidenciar insulinoresistencia más 2 de otras 4 alteraciones (hipertensión, dislipidemia, obesidad y microalbuminuria) (Tabla 1) (Spahis *et al.*, 2017).

Tabla 1. Enfermedades adyacentes en el síndrome metabólico.

Padecimiento	Descripción
Dislipidemia	Aumento plasmático de triglicéridos (>150 mg/dL) y colesterol total (>200 mg/dL).
Diabetes tipo 2	Aumento de glucosa sérica en ayunas (>125 mg/dL) por resistencia a insulina.
Microalbuminuria	Aumento de microalbumina en orina (>20 ug/min)
Hipertensión	Aumento de la presión sistólica igual o mayor a 140 mmHg y diastólica 100 mmHg
Obesidad	Aumento en el diámetro de la cintura >80 cm en mujeres y >90 cm hombres.
Disbiosis	Disminución de Bacteroidetes y aumento exponencial de Firmicutes y organismos oportunistas. Inflamación intestinal crónica.
Estrés oxidativo	Aumento exacerbado de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Disminución de antioxidantes y progresivo deterioro de macromoléculas estructurales.

Modificado de Spahis y COL (2017).

La hipertensión arterial modifica el flujo sanguíneo tanto a nivel macro como microvascular debido a la disfunción endotelial que se genera, provocando así una disminución considerable del tono vascular periférico. Si bien la hipertensión generalmente suele tener un origen hereditario, este también puede ser inducido

gracias al aumento masivo de algunos componentes séricos relacionados con el SM, tales como la glucosa y algunos ácidos grasos (colesterol y triglicéridos).

La hiperglicemia en un individuo que padece SM suele estar correlacionada con el desarrollo de la resistencia a la insulina (diabetes tipo 2) en la cual al individuo se le dificulta catabolizar la glucosa presente en su cuerpo, afectando directamente el metabolismo celular de varios tejidos del organismo. Esto a su vez induce la activación de rutas metabólicas alternativas que conllevan a un aumento exponencial en la síntesis de ácidos grasos que son rápidamente almacenados en el tejido adiposo. Estas alteraciones bioquímicas y estructurales generan un aumento considerable de peso, el cual se ve reflejado en la grasa visceral acumulada, llegando inclusive a desarrollar obesidad mórbida. Los pacientes que han sido diagnosticados con SM pueden padecer de microalbuminuria, siendo este un marcador biológico precoz para una nefropatía diabética y un potencial factor de riesgo cardiovascular debido a su relación con la alteración vascular sistémica y la hipertensión.

El sedentarismo, la edad, la susceptibilidad genética y factores cotidianos, principalmente la alimentación, representan un riesgo potencial para el padecimiento de enfermedades metabólicas crónicas (Skogberg *et al.*, 2022). Todas estas alteraciones fisiológicas incrementan la morbilidad en los individuos que las padecen y han sido relacionadas directamente con el estrés oxidativo causado por el desequilibrio de los sistemas antioxidantes (Palmieri *et al.*, 2006).

Estrés oxidativo

La oxidación es un proceso químico que se define por la pérdida de electrones que se encuentra siempre asociado a un proceso de captación denominado reducción. En cualquier organismo vivo estos procesos son vitales puesto que participan en los procesos de obtención de la energía celular; no obstante, durante un exceso de oxidación se comienza el proceso de estrés oxidativo a partir de moléculas con un alto potencial redox denominados “radicales libres”. Algunas de las isoformas de la óxido nítrico sintetasa (NOS) como la L-arginina y NADPH: oxígeno reductasa

generan el óxido nítrico (NO), molécula que puede comportarse tanto como agente reductor como oxidante, dependiendo de las condiciones redox intracelulares. Esta molécula participa en diversos procesos fisiológicos, siendo la activación de la enzima di-guanilato ciclasa la más relevante, ya que al unirse a su grupo hemo sintetiza al segundo mensajero GMPc, abriendo directamente canales de calcio o activando proteincinasas de serina/treonina, regulando así diferentes procesos intracelulares. El NO también regula la inducción directa postranscripcional que modifica de manera reversible residuos de cisteína en proteínas y además, actúa como neurotransmisor de terminales inhibitoras parasimpáticas no adrenérgicas-no colinérgicas (Xia *et al.*, 2016). A pesar de ser considerado como un radical libre, el NO no es altamente reactivo debido ya que únicamente reacciona con otros radicales libres con grupos sulfhidrilo, metales de transición y proteínas como la guanilato ciclasa, receptores glutamatérgicos, citocromo C y algunas otras moléculas. Sus principales reacciones dentro de sistemas biológicos son con la oxihemoglobina, centros metálicos de algunas proteínas y su degradación por el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Molina *et al.*, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) interactúan de manera positiva en las células estimulando la transducción de señales e impulsando las actividades celulares, así como su protección cuando se encuentran en bajas concentraciones (Janssen *et al.*, 2008). No obstante, la sobreproducción de ROS Y RNS conlleva a la oxidación irreversible de macromoléculas, la modificación redox de enzimas críticas como la isocitrato y α -cetoglutarato deshidrogenasa, así como sitios reguladores que finalmente desencadenan la alteración de la señalización celular y apoptosis.

El incremento en la actividad de la NADPH oxidasa produce una elevación en las concentraciones del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) el cual es el principal ROS en el estrés oxidativo e interactúa con el NO produciendo peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), el cual posee una reactividad directa con hemoproteínas, DNA, CO_2 , lípidos y residuos de proteínas, así como reactividad indirecta dependiente de CO_2 mediadas por radicales oxidantes fuertes como el nitrógeno radical dióxido (NO_2) y el radical

carbonato (CO_3^{2-}). De igual manera, el incremento en la actividad de NOS durante condiciones inflamatorias provoca su interacción con NO formando trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), el cual medía la nitrosilación de compuestos diana como los tioles (Chiurchiù y Maccarrone, 2011).

En condiciones patológicas como la inflamación, diabetes, aterosclerosis e isquemia, enzimas como NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa, xantina oxidasa, mieloperoxidasa, lipoxigenasa y ciclooxigenasa son sobreactivadas produciendo ROS y RNS de manera exacerbada; este desequilibrio redox desencadena la alteración de la señalización celular, produciendo especies radicales como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radicales hidroxilos (OH^\bullet) y óxido nítrico (NO), y no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso y peroxinitrito (ONOO^\bullet) (Xia *et al.*, 2016).

El $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO pueden afectar químicamente a otras moléculas reaccionando con ellas; el $\text{O}_2^{\bullet-}$ posee una vida media larga de hasta 14 horas activo en bajas concentraciones, mientras que el NO tan solo de 30 a 50 segundos, debido a su alta capacidad de interacción con muchas otras moléculas y a su propia oxidación a nitritos y nitratos. Ambas moléculas tienen alta capacidad de difusión intracelular y alto potencial de convertirse a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Molina *et al.*, 2002). El H_2O_2 al igual que $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO están sujetas a mecanismos de regulación Redox intracelulares y reaccionan con residuos de proteínas específicas compuestas por cisteína, metionina y selenocisteína (Bartberger *et al.*, 2002). Sin embargo, su sobreproducción conlleva a la generación del oxidante $^\bullet\text{OH}$, el cual reacciona aleatoriamente con todas las macromoléculas más importantes induciendo la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas, ADN y carbohidratos, conduciendo al deterioro celular.

Sistemas antioxidantes

Naturalmente, la maquinaria enzimática como la glutatión peroxidasa y reductasa, catalasa, peroxiredoxinas, así como compuestos endógenos como el glutatión reducido, ácido úrico, bilirrubina, ceruloplasmina, β -caroteno, flavonoides, polifenoles y vitaminas A, C y E neutralizan a las moléculas oxidantes previniendo la oxidación celular. De igual forma, el grupo de metaloenzimas Superóxido dismutasa (SOD) que están presentes en el citosol, mitocondrias y matriz extracelular, catalizan la conversión del anión $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , controlando las concentraciones de ROS (Spahis *et al.*, 2017). El glutatión reducido y el glutatión disulfuro son utilizados como indicador del entorno redox, siendo los tampones redox por excelencia a nivel intracelular al neutralizar diversas especies oxidantes como los $\cdot OH$, $HClO$ y $ONOO$. Por otro lado, Lönn y Col. (2012) afirman que el ácido ascórbico (vitamina C) es la primera defensa antioxidante en los tejidos al ser capaz de donar un electrón a radicales oxidantes potencialmente dañinos y actuando sinérgicamente con la vitamina E, la cual es el principal antioxidante en LDL y membranas lipídicas, cuyo producto de oxidación es el radical α -tocoperoxilo.

Se ha mencionado anteriormente el efecto dominó que posee el estrés oxidativo sobre el metabolismo global del individuo, desde que el anión superóxido y el óxido nítrico interactúan con macromoléculas o se convierten en agentes con un mayor potencial oxidativo como en el caso de los grupos hidroxilo y peroxinitritos, siendo este el principal detonante para el desarrollo de anomalías metabólicas crónicas.

El aumento en la actividad de los agentes oxidantes puede tener diferentes orígenes, desde deficiencias nutricionales hasta una respuesta exacerbada del sistema inmunológico, el cual supera en gran medida a la capacidad del organismo para hacer frente a ello, por lo que la respuesta a la solución de estos problemas puede ser bastante obvia. El uso de un compuesto que posea la capacidad de neutralizar en gran medida a los diferentes agentes oxidantes en el organismo y favorezca la longevidad celular abriría nuevas puertas en el campo de la medicina preventiva. Este compuesto podría ser la quinona de pirroloquinolina.

IL1, IL6 y FNT- α en el proceso inflamatorio crónico

El sistema inmunológico también ejerce un gran papel durante el estrés oxidativo, ya que durante los procesos de la inflamación crónica las células endoteliales sufren cambios provocados por la expresión de moléculas de adhesión para los neutrófilos, los cuales son activados por mediadores locales y liberan quimiocinas que atraen a macrófagos al sitio de inflamación. (Goldsby *et al.*, 2004). Se sabe que además de los LPS y el péptido β amiloide, el aumento en la biosíntesis del NO es provocado por algunas citocinas proinflamatorias como interleucina IL-1, interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) debido a que favorecen la expresión de la NOS (Förstermann, 2000). Fisiológicamente, los macrófagos se encargan de liberar citocinas como IL-1 e IL-6 así como el FNT- α , las cuales promueven la coagulación e incrementan la permeabilidad vascular en un proceso inflamatorio agudo; no obstante, una reacción inflamatoria crónica se convierte en un proceso fisiopatológico mediado por la sobreproducción de citocinas y la autodestrucción de los tejidos. Por el contrario, Bolaños y Col. (1997) indican que la expresión de NOS puede ser reducida bajo el efecto de otras citocinas como IL-4, IL10, IL27, IL28, IL33, IL8 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF)- β , además de la noradrenalina, el AMPc, los inhibidores de cinasas de tirosina y del factor nuclear (NF)- κ B, y glucocorticoides como el cortisol y la cortisona.

Además de esto, González y Col. (2002) han señalado al tejido adiposo como una glándula endocrina de alta actividad, ya que además de secretar hormonas como la leptina, adiponectina, resistina y grelina, también sintetiza y secreta FNT- α y una tercera parte del total de IL-6 en el organismo, la cual tiene múltiples efectos en diversos tejidos y su producción se encuentra correlacionado con el índice de masa corporal excesivo. La IL-6 promueve la secreción hepática de triglicéridos contribuyendo a la hipertrigliceridemia. El mayor efecto de la IL-6 en el metabolismo lipídico depende directamente del grado de activación de la citocina, ya que sus altas concentraciones inhiben la acción de la lipoproteín-lipasa hepática, lo que conlleva a un aumento de la secreción de la VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) y de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres. Debido a esto, IL-6

se ha propuesto como un marcador del síndrome metabólico por su relación directa con las diversas afecciones que este engloba. (Stefano *et al.*, 2016)

LA INFLAMACIÓN PROVOCA LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Fisiológicamente, la unión de la insulina a su receptor desencadena una cascada de señalizaciones en la cual la insulina se une a la subunidad alfa de su receptor, lo que provoca un cambio conformacional que permite la unión de ATP a la subunidad beta; de esta manera se le confiere la actividad de tirosina cinasa iniciando la fosforilación en tirosina en proteínas intracelulares las cuales promueve la translocación del transportador de glucosa (GLUT) a la membrana celular permitiendo así la entrada de glucosa (Wilcox, 2005). No obstante, durante condiciones de inflamación crónica, Cheng y Col. (2002) revelan que el FNT- α provoca una inhibición de la autofosforilación de los residuos de tirosina del receptor de insulina, la cual es elemental para promover la cascada de señalización para la captura de la glucosa, provocando así la resistencia a la insulina.

Por otra parte, Spranger y Col. (2003) indican que IL-6 induce la sobreproducción de la proteína SOCS-3, la cual inhibe la señal de transducción de insulina en hepatocitos al interrumpir su autofosforilación y la fosforilación del sustrato del receptor de insulina, siendo una de las causas de resistencia a la insulina. De esta manera se sustenta que la inflamación crónica es producto de un pobre control glicémico el cual conlleva a la producción de especies reactivas causantes de daño tisular y que promueven la acción de citocinas, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas de manera constante (Hernández *et al.*, 2016).

Diabetes mellitus tipo II

Otra de las anomalías fisiológicas causadas por el estrés oxidativo se ve en la alteración de la dinámica mitocondrial, el cual es un sistema de control de supervivencia y apoptosis producido por procesos de fusión, fisión, biogénesis y mitofagia. De acuerdo con Shen (2012), la inhibición de la fusión mitocondrial está relacionada la producción de ROS, y sus alteraciones en órganos metabólicos

energéticos como el hígado, páncreas, músculo esquelético y tejido adiposo blanco que dan paso al desarrollo de la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y obesidad. En la resistencia a la insulina e intolerancia de glucosa, un grupo aldehído del azúcar reacciona con los aminoácidos causando glicación de proteínas y degeneración oxidativa la cual provoca reacciones proliferativas, inflamatorias y trombogénicas. La hemoglobina glicada reduce el intercambio los gases a tejidos al tener una mayor afinidad por el oxígeno, mientras que la lipoproteína de baja densidad glucosilada pierde su afinidad por el receptor de LDL. A juicio de Stefano y Col. (2016), la degeneración oxidativa en DT2 por LDL es un proceso proinflamatorio que contiene partículas proaterogénicas y lípidos inflamatorios que favorecen la aterosclerosis. Cuando los adipocitos son sometidos al estrés oxidativo, estos producen un estado inflamatorio sistémico por la presencia de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-6, la liberación de leptina y altas cantidades de glucosa que actúan como mediadores proinflamatorios.

Los estudios de Haffner y Taegtmeyer (2003) han demostrado que el estrés oxidativo conlleva al desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) y uno de los principales factores de riesgo en enfermedades cardiovasculares. La DM2 ha sido descrita como una enfermedad metabólica asociada a elevadas concentraciones de ROS y RNS que conllevan a la resistencia a la insulina e intolerancia de glucosa. Los mecanismos involucrados en la producción de ROS y RNS en endotelio vascular se ven incrementados por la acumulación de ácidos grasos libres en plasma y tejido adiposo estimulando isoformas de la NADPH oxidasa y reduciendo la actividad de las enzimas antioxidantes. La exposición del estrés oxidativo en tejido adiposo provoca el desarrollo del estado inflamatorio sistémico asociado a la obesidad, vasculopatías y morbilidad cardiovascular (Chattopadhyay *et al.*, 2015).

Hipertensión y estrés oxidativo

Varias formas de hipertensión clínica están asociadas al estrés oxidativo. En diversos estudios como los de Badimón y Martínez (2006), se ha demostrado que se producen mayores cantidades de ROS en la pared arteriolar durante hipertensión. Las principales ROS generadas en las células vasculares son el anión

superóxido y peróxido de hidrógeno. Fearheller, *et al.* (2009) propusieron que la NADPH Oxidasa es la fuente bioquímica primaria de ROS actuando como un regulador positivo en la hipertensión por mecanismos humorales y de señales. El mayor efecto del $O_2^{\bullet-}$ generado por la NADPH oxidasa es la inactivación del óxido nítrico al formar peroxinitrito, molécula que potencialmente daña la acción vasodilatadora del endotelio y desacopla a la enzima NOS endotelial (Kuzkaya *et al.*, 2003).

La actividad de la NADPH oxidasa es estimulada en gran medida por la angiotensina II, la cual es una hormona peptídica derivada del angiotensinógeno que posee un gran potencial vasoconstrictor y aumenta en gran medida la presión arterial mediante la estimulación de la proteína Gq en las células del músculo liso vascular; su efecto sobre la NADPH oxidasa provoca un aumento de las ROS en el organismo. También posee la capacidad de inducir la disfunción endotelial afectando directamente a la diguanililciclasa soluble, lo que según Touyz (2004) ocasiona daño en la señalización de ON/GMPc. La disfunción endotelial conlleva al deterioro en su capacidad de dilatación, el aumento del estado proinflamatorio y de la actividad protrombótica; finalmente, un estado de inflamación vascular mediado por macrófagos y neutrófilos contribuyen a un estado de hipertensión crónica.

Microbiota intestinal y síndrome metabólico

El intestino humano alberga una comunidad diversa de bacterias comensales, en una relación de simbiosis con el anfitrión, de modo que influye permanentemente en su fisiología. Actualmente, la microbiota intestinal pasó a considerarse como un órgano metabólico, cuyas funciones se centran principalmente en la nutrición, regulación del sistema inmune, la inflamación sistémica, entre muchas otras. (Neish, A., 2009). La diversidad de genes en la comunidad microbiana proporciona una gran variedad de enzimas y vías bioquímicas distintas de los recursos propios del anfitrión. La fermentación de carbohidratos constituye una fuente de energía importante para la proliferación bacteriana los cuales sintetizan ácidos grasos de cadena corta que el anfitrión puede absorber para recuperar energía de la dieta, favoreciendo la absorción de iones como calcio, magnesio y hierro en el ciego

(Hooper *et al.*, 2001). Sin embargo, en algunos casos puede impactar de manera negativa, afectando la bioquímica del hospedero, siendo una importante causa de varias patologías.

La microbiota intestinal también ejerce un importante efecto sobre la respuesta inmune del humano. Los estudios de Wolowczuk *et al.* (2008) sobre la capacidad inmunomoduladora de la microbiota coincidieron con los datos epidemiológicos de la obesidad y la diabetes tipo 2 debido a la disminución de hasta un 50% del phylum *Bacteroidetes* y un aumento considerable de *Firmicutes* en el intestino. Esto permite la colonización de bacterias patógenas que metabolizan los nutrientes de manera diferente a través de diferentes vías que contribuyen a la acumulación de grasa y cascadas de interleucinas proinflamatorias que promueven el estrés oxidativo. Un gran número de estudios recientes han demostrado que el desarrollo del síndrome metabólico está vinculado con alteraciones en la microbiota intestinal, conocida como disbiosis. Hamer *et al.*, (2012) señalan que el crecimiento excesivo de bacterias del género *Clostridium*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en intestino delgado y el aumento de su permeabilidad conlleva potencialmente a la cirrosis hepática y trastornos sistémicos que se relacionan con la actividad de endotoxinas y translocación bacteriana.

Las evidencias sobre el papel de la microbiota intestinal representan un factor ambiental que afecta predisposición en el desarrollo de la obesidad y adiposidad. El primer mecanismo consiste en una mayor cosecha de energía promovida por el metabolismo de la microbiota intestinal, a través producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que promueven la hidrólisis y fermentación de polisacáridos. Hooper *et al.* (2001) señalaron que los AGCC más relevantes son el propionato, butirato y acetato, los cuales además de ser absorbidos y utilizados como fuente de energía, ejercen funciones metabólicas más complejas como el aumento de la lipogénesis, inhibición de la oxidación de ácidos grasos, la absorción y recolección de energía estimulando la expresión del transportador sodio / de glucosa-1. De igual forma, contribuyen a modular el apetito del huésped e ingesta de alimentos al

interactuar con proteínas G acopladas a células enteroendocrinas liberando el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y péptido YY (Tolhurst et al., 2012).

De acuerdo con Cani *et al.* (2007), otro de los mecanismos por los cuales la microbiota intestinal se ve involucrada en el síndrome metabólico se da en dietas altas en grasas que aumentan la proporción de especies gramnegativas las cuales liberan diversos fragmentos bacterianos, especialmente lipopolisacáridos (LPS) absorbidos en mayor cantidad por el intestino causando endotoxemia metabólica, la cual representa un deterioro del equilibrio metabólico del hospedero. Los antígenos bacterianos como el peptidoglicano y los lipopolisacáridos (LPS) son reconocidos por receptores NOD1, CD-14 y TLR-4 de células dendríticas intestinales, activando la inflamación de la mucosa y la translocación bacteriana a través de la activación de la vía NF- κ B. (Bensussan y Routhiau., 2010). En conclusión, la microbiota intestinal promueve el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 al inducir la inflamación crónica por endotoxemia metabólica.

Quinona de pirroloquinolina

A finales de la década de los 70s, se descubrió un nuevo cofactor enzimático en bacterias que posteriormente se describiría como una molécula esencial para la activación de diversas enzimas designadas como quinoproteínas, entre ellas oxidasas, descarboxilasas y deshidrogenasas, siendo estas últimas las más estudiadas. La quinona de pirroloquinolina (PQQ) es un cofactor perteneciente a la familia o-quinona el cual actúa de manera covalente en enzimas como la metanol, glucosa, sorbitol y glicerol deshidrogenasas. La PQQ fue descrita inicialmente en bacterias metilotróficas como un cofactor soluble en agua y de naturaleza termoestable, la cual es sintetizada durante la fase estacionaria gracias a la expresión de al menos 5 genes descritos actualmente en diversos géneros y especies bacterianos; sin embargo, se han reportado que algunas bacterias poseen hasta 8 genes relacionados con la síntesis de este cofactor (Stites *et al.*, 2000).

Posteriores investigaciones revelaron la presencia de esta molécula no solo en bacterias, sino que también se encuentra ampliamente distribuido en plantas, animales, alimentos y fluidos biológicos debido a la presencia de bacterias que la sintetizan. Misra *et al.* (2004) describen su destacada función en bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) interactuando con quinoproteínas como la glucosa deshidrogenasa generando ácidos orgánicos que permiten la solubilización de fosfatos.

En organismos superiores como los animales, se descubrió que posee notables efectos en la salud, fertilidad, desarrollo neonatal y metabolismo energético, particularmente por su potencial efecto antioxidante. Se ha demostrado que la PQQ ejerce efectos neuroprotectores, cardiovasculares, antiinflamatorios y antitumorales al neutralizar ROS durante el estrés oxidativo produciendo moléculas no reactivas, protegiendo así al DNA, proteínas y lípidos de la oxidación (Rucker *et al.*, 2009).

Además, diversos estudios acerca del PQQ señalan que su uso en el campo de la medicina preventiva se debe a su capacidad para estimular la biogénesis mitocondrial que confiere una mayor capacidad para producir energía, mientras que su potencial antioxidante permite neutralizar radicales libres que pudieran provocar daño molecular; esto le confiere tanto a células somáticas como germinales prolongar su periodo de vida (Sasakura *et al.*, 2017). Otro de sus notables efectos se refleja en la prevención de la apoptosis; ejemplo de ello es la protección contra la isquemia cardíaca, lesión por reperfusión y cirrosis, tal como afirman Bagatini y Col. (2011). Actualmente es muy bien conocido su papel neuroprotector al estimular la producción del factor de crecimiento nervioso en astrocitos (Rucker *et al.*, 2009).

Genes involucrados en la síntesis de PQQ

A lo largo de los años se han hecho diversos estudios, mayormente análisis bioinformáticos, los cuales revelan que más de 140 especies bacterianas, entre las que destacan Gram-negativas incluyendo patógenas, contienen en su genoma diversos genes que codifican para la síntesis de PQQ. La disposición y número de los genes necesarios para la síntesis de esta molécula varía entre géneros,

especies e inclusive cepas. Los genes descritos para su síntesis son *pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD* y *pqqE*, los cuales se encuentran organizados en operón; en algunas bacterias también se han encontrado los genes *pqqF*, *pqqG* y *pqqH*, aunque la expresión de estos no es esencial para su síntesis (Sasakura *et al.*, 2017).

pqqA

El gen *pqqA* codifica para el péptido precursor para la síntesis de PQQ, el cual se ve incrementado en la fase estacionaria bajo condiciones de pH ácido y 50% de oxígeno disuelto. Este péptido tiene un tamaño de 23 y 39 aminoácidos, ya que varía entre géneros y especies; a pesar de ser el precursor esencial en prácticamente todas las especies, estudios hechos por Misra *et al.* (2004) bajo la inactivación de *pqqA* en *Methylobacterium extorquens* señalaron que la producción de PQQ continua activa, aunque en menores concentraciones, por lo que se piensa que algún péptido similar mantiene su síntesis ligeramente activa. PqqA posee una región altamente conservada en su secuencia de aminoácidos, entre el glutamato y la tirosina que conforman este péptido (Glu-X-X-X-Tir) (Vera *et al.*, 2017).

pqqB

El gen *pqqB* codifica para una proteína de la familia de las metalo beta-lactamasas. Estudios mutagénicos de *Klebsiella pneumoniae* revelaron que dicha proteína juega un papel de transportador, ya que su ausencia conlleva a la acumulación de PQQ en el citoplasma. No obstante, Stites y Col. (2000) afirmaron que la expresión de este gen no es necesaria para la biosíntesis de PQQ.

pqqC

Este gen codifica para una proteína enzimática cuya función es catalizar el paso final de la biosíntesis de PQQ, facilitando la oxidación y ciclación de una forma reducida de PQQ, ejerciendo su función en ausencia de algún cofactor, pero si en presencia de oxígeno molecular. Además, Rucker *et al* (2009) han argumentado que el gen *PqqC* es altamente conservado entre géneros y especies con todo tipo de variaciones, por lo que se ha propuesto como marcador molecular filogenético.

pqqD

La función de la proteína del *PqqD* se desconoce a ciencia cierta, aunque los biólogos moleculares que lo estudian han sugerido que podría actuar como un receptor de PQQ debido a que adquiere una carga desigual en un sitio putativo de unión a PQQ (Bagatini *et al.*, 2011).

pqqE

Este gen codifica a una proteína compuesta por aproximadamente 380 residuos de aminoácidos y que mediante análisis *in silico* se ha determinado que pertenece a la familia de proteínas del radical S- adenosilmetionina (Vera *et al.*, 2017). Esta enzima posee el potencial de usarse en rutas metabólicas como la transmetilación, trans-sulfuración y aminopropilación. Es producida únicamente en condiciones anaerobias con excepción de *E. coli* y se le encuentra únicamente en cuerpos de inclusión (Sasakura *et al.*, 2017).

Marcador molecular de PQQ

El gen *pqqC* ha sido utilizado como un marcador molecular en *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfatos, como complemento de otros marcadores usados en estudios de filogenia, principalmente en *Pseudomonas* (Meyer *et al.*, 2011). El clúster *pqq* hace alusión al grupo de genes involucrados para su síntesis, el cual tiene el potencial de ser utilizado como un marcador molecular filogenético para todas aquellas bacterias productoras de este cofactor.

Con base en el trabajo de Gutiérrez, F. (2019), se determinó que a partir del alineamiento de los genes *pqqC*, *pqqD* y *ppqE* existe secuencias altamente conservadas. Sus análisis filogenéticos muestran resultados favorables para agrupar los géneros bacterianos similarmente a como lo hace el marcador molecular 16sDNAr.

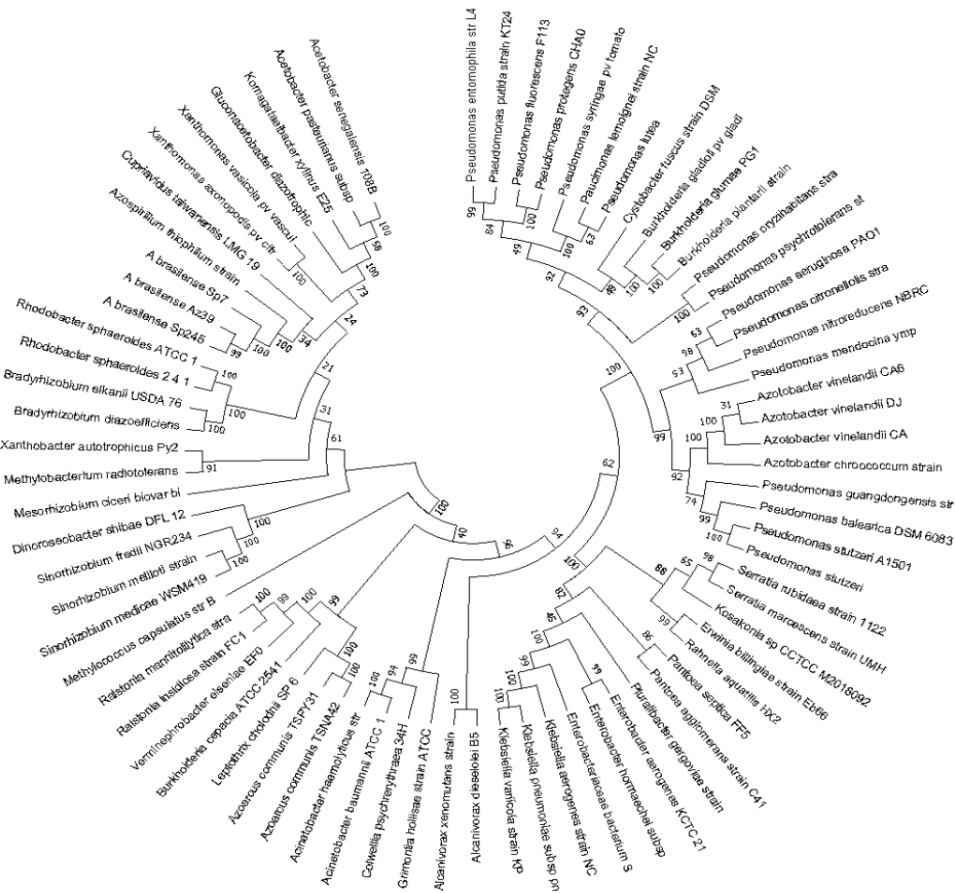


Figura 1.Árbol filogenético del gen 16sDNAr

La figura muestra la agrupación taxonómica de una amplia comunidad bacteriana. La secuenciación de este gen permite determinar la filogenia molecular de grupos bacterianos en sus respectivos géneros y especies gracias a la secuencia conservada del gen 16s ribosomal.

Las regiones conservadas en los genes *pqqC*, *pqqD* y *pqqE* fueron usadas para diseñar oligonucleótidos con capacidad de marcador molecular

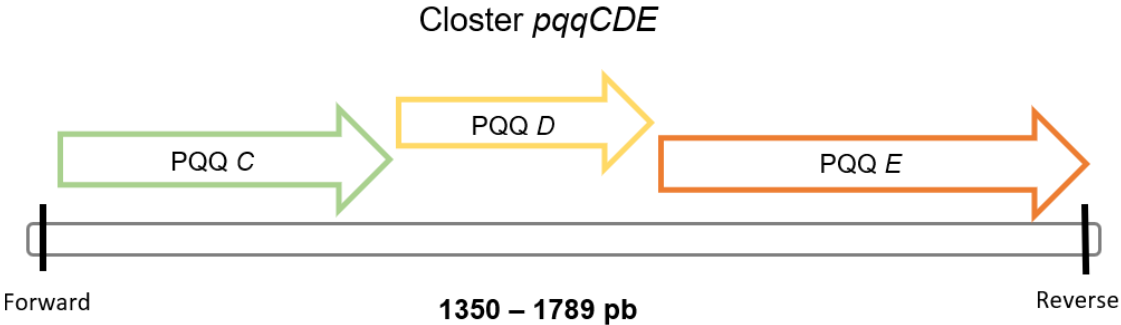


Figura 3. Esquema del clúster *pqqCDE* en proteobacterias

Planteamiento

El síndrome metabólico engloba a una cantidad de afecciones metabólicas tales como la hipertensión, la resistencia a la insulina, dislipidemia y principalmente el estrés oxidativo, el cual genera daño tisular e inflamación prolongada, que podría estar modificando el bacterioma intestinal en respuesta al estrés oxidativo generado. Se plantea que parte del bacterioma modificado posea los genes relacionados a la síntesis de PQQ, una molécula antioxidante, en una respuesta adaptativa al estrés oxidativo generado por el hospedero.

Hipótesis

El bacterioma potencialmente productor de PQQ en individuos con síndrome metabólico se podrá determinar con el marcador molecular *pqqCDE*.

Nula

El bacterioma potencialmente productor de PQQ en individuos con síndrome metabólico no se podrá determinar con el marcador molecular *pqqCDE*.

Objetivos

General

- Evaluar la amplificación del marcador molecular *pqqCDE* en muestras fecales de personas con síndrome metabólico.

Particular

- Obtener muestras fecales de individuos con síndrome metabólico.
- Purificación de DNA de muestras fecales de individuos con síndrome metabólico.
- Determinar mediante análisis *in silico* los tamaños de amplicones esperados con el marcador molecular *pqqCDE* en algunas proteobacterias.
- Amplificar el marcador molecular *pqqCDE* en muestras fecales de individuos con SM.

Justificación

Aproximadamente una cuarta parte de la población mundial ha sido diagnosticada hipertensa, mientras que la prevalencia de la diabetes tipo 2, siendo esta la más frecuente, se presenta en un 6-8% del total de la población adulta. Ambas enfermedades representan factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares potencialmente mortales. Así mismo, según los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) realizada en 2021 en México, indica que existe una prevalencia conjunta de sobrepeso y obesidad en la población mayor a 20 años que se correlaciona con un aumento en los casos de síndrome metabólico. En México, la prevalencia del SM es cada vez más alta, principalmente en adultos cuya esperanza de vida se va desvaneciendo cada vez más, debido al alto índice de individuos que la padecen actualmente.

Investigaciones han concluido que el microbiota intestinal juega un papel fundamental en el progreso fisiopatológico del síndrome metabólico; su alteración varía entre cada individuo, lo que generalmente ejerce efectos negativos en función de cada género y especie predominante en él. Este trabajo tiene como finalidad aportar nueva información acerca del bacterioma intestinal productor de PQQ en individuos diagnosticados con síndrome metabólico.

Metodología

Obtención de muestras

Las muestras fecales analizadas fueron obtenidas del Centro de salud de Santa María Coronango, Puebla, las cuales fueron donadas bajo el consentimiento informado de cada paciente, siendo personas mayores de edad pertenecientes al estado de Puebla y diagnosticados con síndrome metabólico. Se utilizaron los siguientes criterios de inclusión para individuos enfermos y “sanos”:

Individuos con síndrome metabólico (9, previamente diagnosticados)

- Contar con los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en ayuno por encima de los parámetros de referencia.
- Padecer de hipertensión o taquicardia.
- Presentar obesidad abdominal y sobrepeso.
- Llevar una vida sedentaria o de baja actividad física.
- No estar bajo tratamiento de antibióticos o alguna enfermedad metabólica.
- Tener una dieta desbalanceada alta en carbohidratos y grasas.

Individuos sanos (4 previamente diagnosticados)

- Contar con los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en ayuno dentro de los parámetros normales.
- No padecer o tener antecedentes familiares de diabetes, hipertensión y dislipidemia.
- Tener una actividad física moderada (no sedentarismo).
- No presentar obesidad abdominal y sobrepeso.
- No estar bajo tratamiento de antibióticos o alguna enfermedad metabólica.
- Llevar una dieta balanceada y constante.

A cada donador se le brindaron las indicaciones específicas para la recolección de la muestra, solicitando únicamente la primera muestra del día y procurando evitar cualquier tipo de contaminación. Durante el momento de la evacuación, se utilizó

plástico autoadherible estéril colocado entre la taza y el asiento del inodoro en el cual se recolectó una pequeña cantidad de heces. Con ayuda de un abatelenguas, la muestra fue colocada en un bote de recolección estéril y llevada a congelación a una temperatura de -70°C . Los pasos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por la Organización panamericana de la salud (2010).

Extracción de DNA cromosómico bacteriano

Las muestras se purificaron mediante un kit comercial de extracción de DNA (QIAamp fast DNA Stool mini Kit) de la empresa QIAGEN siguiendo las instrucciones del proveedor:

1. Se realizó un raspado de 200 (± 20 mg) de heces por cada muestra, aislando cada una en su respectivo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y agregando 1 mL de tampón InhibitEX para después colocar los tubos en hielo.
2. Las muestras fueron agitadas en vortex hasta homogenizarlas y se incubaron a 90°C durante 5 minutos agitando suavemente cada 15 segundos.
3. Las muestras se centrifugaron durante 1 min para sedimentar las partículas de heces asegurándose de evitar la presencia de sedimentos en el sobrenadante.
4. Se pipetearon 15 μL de proteinasa K en tubos nuevos de microcentrífuga añadiendo 200 μl del sobrenadante obtenido y 200 μl de tampón AL agitando en vórtex por 15 s. Las muestras se centrifugaron brevemente para eliminar posibles gotas del interior de la tapa del tubo y después se incubaron a 70°C durante 10 minutos.
5. A cada muestra se añadieron 200 μl de etanol al 96% mezclando en vórtex, obteniendo 600 μl de cada lisado aislando cada uno en una columna de centrifugación QIAamp. Se centrifugó durante 1 minuto y se colocó cada columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, desechando los tubos que contenían el filtrado. Se repitió este proceso cargado todo el lisado en la columna.
6. Se añadieron 500 μl de tampón AW1 en cada columna, centrifugando a máxima velocidad durante 1 min. Colocamos la columna de centrifugación

QIAamp en un nuevo tubo de 2 mL desechando el tubo que contenía el filtrado. Se añadieron 500 µl de tampón AW2 centrifugando durante 3 minutos. Finalmente, se desechó cada tubo de recolección que contenía el filtrado al igual que el lavado.

7. Se colocó cada columna QIAamp en un tubo de recolección nuevo de 2 mL desechando los tubos de recolección viejos con el filtrado, centrifugando a durante 3 min.
8. Se transfirió cada columna QIAamp a un tubo tubo eppendorf de 1,5 mL nuevo y etiquetado añadiendo 100 µl de tampón ATE directamente en la membrana QIAamp, incubando durante 1 min a temperatura ambiente.
9. Finalmente, se centrifugaron nuevamente durante 1 min para eluir el ADN.

Extracción manual mediante protocolo Q (no comercial)

1. Se diluyeron 1 g de heces fecales en 1 mL de tampón AI por cada muestra y se agitaron en vortex hasta homogenizar junto con 0.6 g de perlas estériles de zirconia.
2. Se incubaron 200 µL del sobrenadante a 95 °C durante 15 min y se agitaron en vortex durante 10 min a la velocidad máxima.
3. Se centrifugaron a 16.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente.
4. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL mezclando con 300 µL de tampón de lisis (Na₂EDTA; 1M Tris; Triton X-100) – Sigma-Aldrich repitiendo los pasos anteriores.
5. Se añadieron 260 µL de acetato de amonio 10M y agitar en vortex por 5 minutos para después incubar en hielo durante 5 min
6. Centrifugar a 16,000 x g durante 10 min a 4 ° C.
7. Transferir el sobrenadante en dos tubos de 1.5 mL y mezclar con 300 µL de tampón de lisis.
8. Se añadieron 260 µL de acetato de amonio, se agitaron en vortex por 5 min e incubaron en hielo durante 5 min.

9. Se centrifugaron por 10 min hasta pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
10. Se añadieron 750 μ L de isopropanol incubados en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 min.
11. Se eliminó el sobrenadante y se lavó cada producto con .5 mL de Etanol al 70% dejando secar al vacío.
12. Finalmente, se disolvieron en 20 μ L de agua grado biología molecular.

Con el fin de eliminar metales pesados y polisacáridos que pudieran inhibir la PCR, se utilizó una resina comercial Chelex siguiendo la metodología del proveedor:

1. Se pesaron 1 mg de resina por cada 200 μ L de DNA.
2. Se agregó resina a cada muestra agitando durante 1 min.
3. Se decantó cada muestra de la resina.
4. Se agregó lentamente cada muestra a la columna.
5. Se desechó el búfer inicial del vacío.
6. Se recolectó el efluente hasta obtener una muestra libre de metales pesados.

Método de precipitación de DNA con isopropanol (Green y Sambrook, 2017).

1. Se añadió una concentración final de 0.3 M. de acetato de sodio (pH 5.2) a la solución de DNA.
2. Se agregó un volumen de 0.7 μ L de isopropanol a temperatura ambiente mezclando manualmente.
3. La muestra se centrifugó a 14,000 RPM durante 20 min en un tubo de microcentrífuga a temperatura ambiente.
4. El sobrenadante fue desechado cuidadosamente por decantación.
5. El sedimento obtenido fue lavado con etanol al 70% frío para lo cual se agregó 500 μ L y se centrifugó a 14,000 RPM durante 5 minutos.
6. Se eliminó el sobrenadante por decantación y los restos fueron retirados con micropipeta.

7. El sedimento fue secado en estufa a 37°C y resuspendido en 5 µL de agua inyectable.

Electroforesis en Gel de agarosa al 0.7 % con buffer de acetatos

Se prepararon múltiples geles de agarosa al 0.7% en buffer TAE 1X (Tris, acetato y EDTA) a partir de una solución 50X con 242 g de Tris, 57.1 mL de ácido acético glacial, 37.2 g de EDTA por cada litro de agua. Para cada gel se utilizaron 0.21 g de agarosa para diluir en 30 mL de buffer TAE 1X. Se calentó la mezcla contenida en un matraz en horno de microondas con pulsos de 20-30 segundos hasta lograr mezclas homogéneas, las cuales se dejaban enfriar unos minutos hasta llegar a una temperatura adecuada para poder agregarlas a la bandeja del gel y permitir su gelificación.

Se colocó cada bandeja dentro del dispositivo de electroforesis el cual se llenó con el buffer TAE hasta sumergir el gel. Se agregaron 0.1 µL de buffer de carga y 10 µL de muestra de DNA en cada pozo corriendo el gel a 110 volts por más de una hora hasta observar la migración del DNA al polo positivo. Finalmente, cada gel fue teñido durante 40 segundos con una solución de bromuro de etidio 1x, añadiendo 0.2 mL de solución stock 1000X en 200 mililitros de agua desionizada. Finalmente, se observó cada producto en un transiluminador UV para determinar la cantidad y calidad del DNA extraído.

Análisis *in silico* del cluster *pqqCDE*

Se hicieron múltiples búsquedas de genomas bacterianos en la base de datos del NCBI que nos indicaron la presencia de genes relacionados con la síntesis de PQQ. La secuencia de los genes *pqqCDE* en Alfa, Beta, Gama y Delta proteobacterias se identificó mediante un modelo aleatorio de cada grupo en la base de datos y fueron alineados con la secuencia de cada oligonucleótido utilizado para amplificar el marcador molecular *pqqCDE* (PQQCF19 y PQQCR17). Como control positivo se utilizó *Pseudomonas protegens*, la cual sabemos que produce PQQ.

También, se realizó un análisis *in silico* de cada par de oligonucleótidos utilizando el programa “Primer Select” para determinar su afinidad y estabilidad, así como

posibles bucles, homodímeros y heterodímeros con el objetivo de prevenir resultados negativos durante la reacción. Por último, se estableció la temperatura óptima para cada par de oligonucleótidos analizando la T_M de cada secuencia mediante el Primer Designing Tool del NCBI, obteniendo un promedio de 56°C para la reacción.

Reacción en cadena a la polimerasa

Debido a que una baja o alta concentración de DNA fácilmente inhibe la reacción, se optó por ensayar diferentes concentraciones de DNA, además de oligonucleótidos, DNTPs y agua, con el fin optimizar la reacción. Se ensayaron las siguientes mezclas de reacción con volúmenes finales de 20-25 μL :

H2O ultra purificada	14 μl
Buffer Taq 10x	2.5 μl
DNTPS	1 μl
Oligo F	1 μl
Oligo R	1 μl
DNA	5 μl
Taq polimerasa	0.5 μl

Tabla PCR 1

H2O ultra purificada	7 μl
Buffer Taq 10x	2.5 μl
DNTPS	8 μl
Oligo F	1 μl
Oligo R	1 μl
DNA	5 μl
Taq polimerasa	0.5 μl

Tabla PCR 2

H2O ultra purificada	13.5 μl
Buffer Taq 10x	2 μl
DNTPS	1 μl
Oligo F	1 μl
Oligo R	1 μl
DNA	1 μl
Taq polimerasa	0.5 μl

Tabla PCR 3

H2O ultra purificada	8.5 ul
Buffer Taq 10x	2 ul
DNTPS	1 ul
Oligo F	4 ul
Oligo R	3 ul
DNA	1 ul
Taq polimerasa	0.5 ul

Tabla PCR 4

H2O ultra purificada	12.6 ul
Buffer Taq 10x	2 ul
DNTPS	1 ul
Oligo F	1 ul
Oligo R	1 ul
DNA	2 ul
Taq polimerasa	0.4 ul

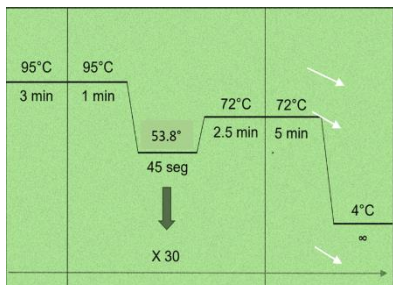
Tabla PCR 5

H2O ultra purificada	13.6 ul
Buffer Taq 10x	2 ul
DNTPS	1 ul
Oligo F	1 ul
Oligo R	1 ul
DNA	1 ul
Taq polimerasa	0.4 ul

Tabla PCR 6

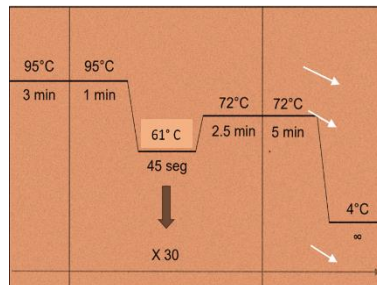
Cada producto fue centrifugado unos segundos para asegurar el correcto descenso de los reactivos hasta mezclar correctamente todo el contenido y se introdujeron a un termociclador con las siguientes condiciones óptimas teóricas para cada par de oligonucleótido empleado:

Figura 4



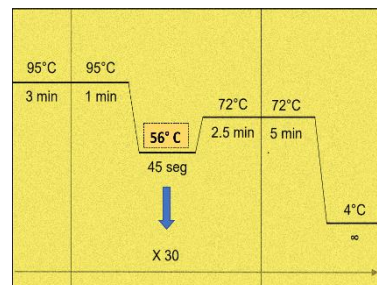
Condición 1

Figura 5



Condición 2

Figura 6



Condición 3 (Definitiva)

Resultados

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas para este estudio se obtuvieron gracias al trabajo de Gutiérrez, F. (2019) quien diseñó y determinó que estos oligonucleótidos amplificaban una secuencia del clúster *pqqCDE* según los análisis realizados durante su experimentación con diversos modelos bacterianos.

Secuencia de oligonucleótidos

PQQCF1	GGGTCGCCAACCGCTTCTACT
PQQCR2	CTTCGTAGTAGTCCGGGGTGACG
PQQCF14	GCCGAACCGCTTCTTACTACCAG
PQQCF15	GTGAACCGTTTCTACTACCAG
PQQCF16	GCCAACCGCTTCTATTACCAG
PQQCR17	CTGATAGTAGTAGCGGTTTCGC
PQQCR18	GCGAACAGTCGGTGCAGCG
PQQCF19	TGGCGAACCGCTTCTACTACCAG
PQQCF20	CCCCGAACCGCTTTTATTATCAG
PQQR21	AGCTGGCTGCCGCTGCTCAGGC
PQQR22	GTCCAGTACTACGGCTGGGC

También, los análisis genómicos de la secuencia *pqqCDE* en el Gen Bank demostraron que la longitud del cluster *pqqCDE* fue variable entre cada especie analizada, por lo que su determinación mediante experimentación nos indicó el tamaño real aproximado para cada amplicón de diferentes especies de alfa, beta, gamma y delta proteobacterias.

Tamaño aproximado de los amplicones en proteobacterias

- Alfa PB - *Cereibacter sphaeroides*... (1484 pb)
- Beta PB - *Burkholderia cepacia*... (1350 pb)
- Gamma PB - *Klebsiella aerogenes*... (1410 pb)
- Delta PB - *Bradyrhizobium diazoefficiens*... (1739 pb)
- Control Positivo - *P. Protegens*... (2403 pb)

Productos de PCR en gel de agarosa

Los resultados obtenidos en las figuras 7 y 8 nos permitieron determinar las condiciones definitivas empleadas para la PCR a través de variaciones en las concentraciones de DNTPS, DNA Total y oligonucleótidos. En la figura 7 se muestran los amplicones obtenidos con las muestras de individuos sanos 1 y 2 con los que se pretendió determinar que concentraciones para la reacción permiten un mayor amplificado bajo la condición 1, esperando resultados de bandas con tamaños de entre 1200 y 1800 pb, mientras que en la figura 8 se utilizó la muestra de DNA de *P. Protegens* para analizar las diferentes concentraciones del control, esperando una banda de aproximadamente 2403 pb.

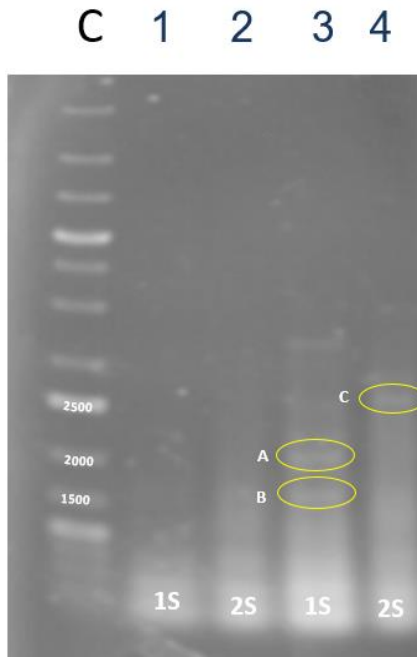


Figura 7.- Análisis electroforético de la amplificación PCR de marcador *pqqCDE* en muestras de individuos sanos 1 y 2. **C:** Marcador de peso molecular (3 ul) Thermo scientific O'geneRuler 1 kb, **Carril 1 y 2:** Migración de DNA sin amplificación, **Carril 3:** Bandas de amplificado A y B en paciente 1S, **Carril 4:** Banda de amplificado C en paciente 2S.

Se realizó un amplificado con las muestras 1S y 2S usando las concentraciones descritas en la **Tabla PCR 1** bajo la condición 1 (**Figura 4**) mediante el uso de los oligonucleótidos PQQE F1 y PQQCR2. En los carriles 1 y 2 se observa la nula amplificación.

Por otra parte, también se realizó un amplificado en las muestras 1S y 2S con una mayor concentración de DNTPS (Tabla PCR 2) bajo la condición 1. Se obtuvieron 2 amplificados en el carril 3 del individuo 1S (bandas A y B). La banda **A** posee un peso aproximado de 1900-2000 pb que pudiera pertenecer a una Delta PB tomando como referencia los pesos moleculares obtenidos en el análisis *in silico*, mientras que la banda **B** posee un menor peso molecular de 1500-1600 perteneciente a una Gamma PB. Por último, el carril 4 muestra una banda inespecífica del individuo 2S de aproximadamente 2500 pb (banda **C**).

Nuevamente, se intentó realizar una amplificación mediante los oligonucleótidos PQQCF1 y PQQCR2 con el DNA obtenido por protocolo QIAMP en las muestras de individuos sanos 1 y 2 con variación en las concentraciones de la mezcla de PCR (tabla PCR 3) utilizando la condición 2 (**figura 4**). Los resultados fueron negativos ya que no se observó ninguna banda en el análisis electroforético.

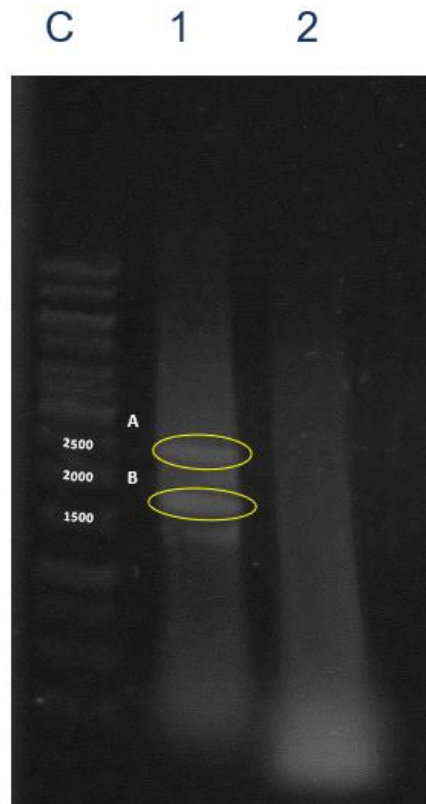


Figura 8.- Análisis electroforético de amplicones utilizando el marcador molecular *pqqCDE* con DNA del control positivos *P. Protegens*. **C:** Marcador de peso molecular (3 ul) Thermo scientific O'geneRuler 1 kb, **Carril 1:** Banda de amplificado A y B en *P. Protegens*, **Carril 2:** Migración de DNA sin amplificación.

En figura 8 carril 1 se observa la amplificación del control positivo correspondiente a *P. Protegens* mediante los oligonucleótidos específicos para esta bacteria PQQE F17 y R19 utilizando la mezcla de reacción descrita en la tabla PCR 3 y la condición 1 (figura 4). La banda **A** corresponde al peso molecular esperado de 2403 pb, mientras que la banda **B** corresponde a un amplificado inespecífico de menor peso molecular de aproximadamente 1600-1800 pb.

El segundo carril de la figura 8 también pertenece al mismo grupo control de *P. Protegens*, en el cual se utilizó un mix con los oligonucleótidos PQQCF14, PQQCF15, PQQCF16, PQQCF20, PQQCR18, PQQCR21 y PQQCR22, utilizando la mezcla de reacción descrita de la tabla PCR 4 y la condición 1. Se observa la migración del DNA sin obtener algún amplificado.

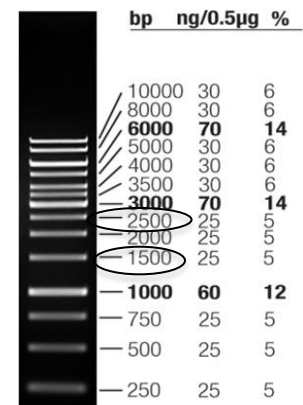
Se realizaron diferentes combinaciones entre cada par de oligonucleótidos *pqqCDE* (forward y reverse) para determinar cuál de esos pares permitiría amplificar mejor el clúster estudiado en la muestra control de *P. protegens*, en individuos sanos y con SM. Se utilizó la mezcla de reacción indicada en la Tabla 5 usando las condiciones de PCR mostradas en la **Figura 5** (condición 2).

En la siguiente tabla (**Tabla 2**) se muestran las combinaciones de cada par de oligonucleótidos y el número de cada carril en el gel de agarosa:

Tabla 2

Oligos	No. de carril		
	P. Protegens	Sanos	SM
1 y 2	1	8	15
15 y 22	2	9	16
14 y 22	3	10	17
20 y 22	4	11	18
17 y 19	5	12	19
16 y 21	6	13	20
16 y 22	7	14	21

Marcador de peso molecular



C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

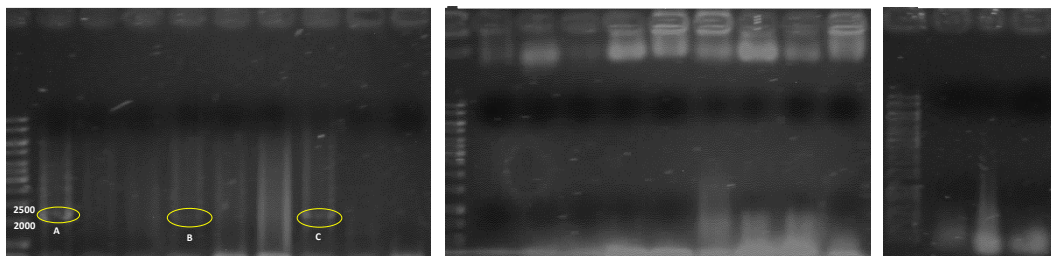


Figura 9.- Análisis electroforético de los amplicones obtenidos por PCR con el marcador molecular *pqqCDE*, utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos. **C:** Marcador de peso molecular (3 ul) Thermo scientific geneRuler 1 kb.

En la figura 9 carriles 1-7 se observa los productos de la PCR del marcador molecular *pqqCDE* de la muestra control de *P. Protegens* en los carriles 1,4 y 7 con un tamaño aproximado de 2403 pb. De la figura nueve podemos observar que al menos 3 pares de oligonucleótidos son capaces de amplificar la cepa control. (Pares de oligonucleótidos PQQCF1 y PQQCR2 (carril 1), PQQCF20 y PQQCR22 (carril 4) y PQQCF16 y PQQCR22 (carril 7).

En los carriles 2 y 3 no hay presencia del DNA debido a un posible error durante la carga, mientras que en los carriles 5 y 6 si se observa la migración del DNA sin obtener algún amplicón.

En los carriles 8-14 se utilizaron las muestras de DNA de individuos sanos 3 y 4. En los carriles 8 y 9 no se observa la migración del DNA debido a un posible error durante la carga, mientras que en los carriles 10-14 no se observan amplificados.

Los carriles 15-21 son las PCR de las muestras de individuos con SM sin observar amplificación del marcador molecular.

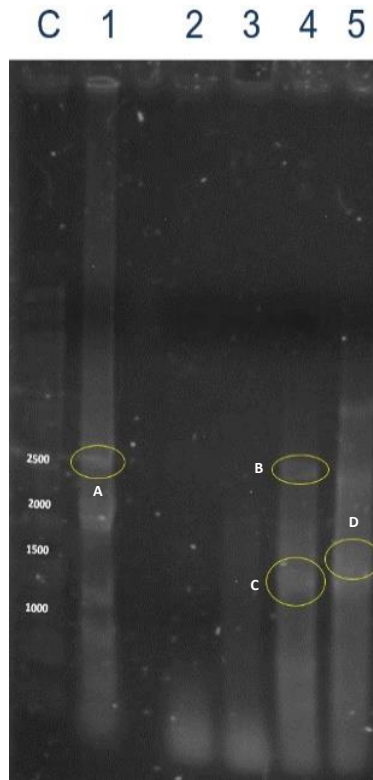


Figura 10.- Análisis electroforético de los amplicones obtenidos por PCR con el marcador molecular *pqqCDE* con DNA concentrado mediante precipitación con Isopropanol en individuos sanos. C: Marcador de peso molecular (3 ul) Thermo scientific O'geneRuler 1 kb, 1: Banda A de *P. Protegens*, 4: Banda B inespecífica y banda C de 1350 - 1484 pb, 5: Banda D de 1739 pb.

En la figura 10 se muestran los resultados de los amplicones obtenidos del DNA concentrado mediante la técnica de isopropanol, esperando un mejor resultado al obtener una mayor concentración para la reacción. Para este análisis se utilizaron las muestras obtenidas de individuos sanos 1S, 2S, 3S y 4S. La técnica fue realizada con los oligonucleótidos PQQCF1 y PQQCR2 utilizando la mezcla de reacción descrita en la tabla PCR 6 y la condición número 3 (figura 6). La banda A corresponde a la amplificación del control positivo *P. Protegens* con un peso de 2403 pb. En los carriles 2 y 3 se observan las muestras de DNA de los individuos 1S y 2S sin ninguna banda de referencia. En el carril 4 se observa la banda B del individuo 3S, la cual es una amplificación inespecífica de aproximadamente 2500 pb. En este mismo carril también se observa la banda C de menor tamaño que

encaja con el tamaño esperado de AlfaPB, BetaPB y GammaPB con pesos estimados de 1350 hasta los 1484 pb como se indica en el análisis *in silico*. Por último, el carril número 5 del individuo 4S se observa la banda D, correspondiente a 1739 pb de DeltaPB.

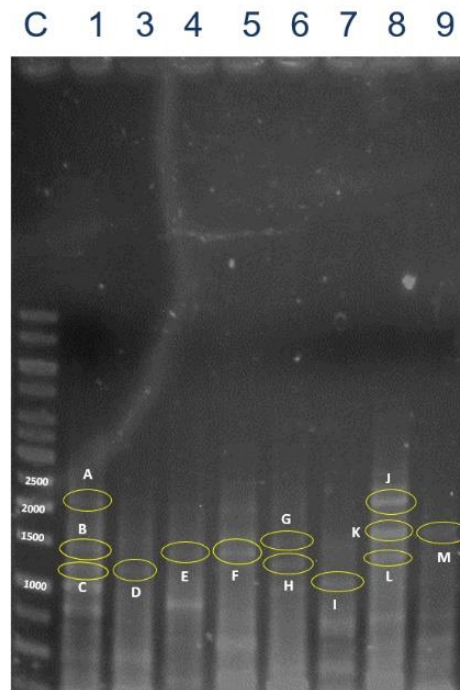


Figura 11. Análisis electroforético de los amplicones obtenidos por PCR con el marcador molecular *pqqCDE* DNA obtenido mediante técnica de precipitación con Isopropanol (Individuos con SM). **C:** Marcador de peso molecular (3 ul) Thermo scientific O'geneRuler 1 kb, 1: Bandas A, B y C de individuo 1SM, 3: Banda D de individuo 3SM, 4: Banda E de individuo 4SM, 5: Banda F de individuo 5SM, 6: Banda G y H de individuo 6SM, 7: Banda I de individuo 7SM, 8: Bandas J, K y L de individuo 8SM, 9: Banda M de individuo 9SM.

En la figura 11 se observan las muestras de individuos con síndrome metabólico del 1 al 9 con excepción del segundo. La técnica fue realizada mediante el uso de los oligonucleótidos PQQC F1 y R2 utilizando la mezcla de reacción indicada en la Tabla PCR6 bajo la condición número 3 (figura 6).

En el primer carril se muestra la banda A inespecífica de aproximadamente 2200-2300 pb. También se observan los amplicones de las bandas B y C entre las 1350 y 1484 Pb correspondientes al tamaño esperado de alfa, beta y gama

proteobacterias. Por debajo de las 1000 pb se hayan 2 bandas inespecíficas cuyo peso molecular es mucho menor a las estimadas según los modelos *in silico* analizados. En el carril 3 y 4 se observan bandas difusas (D y E) de aproximadamente 1350- 1484 pb similares a las anteriores. La banda F en el carril 5 se muestra del mismo tamaño que la banda E aunque más definida en comparación. En el carril 6 también se observan bandas difusas con los mismos pesos moleculares que las anteriores (bandas G y H). El carril 7 muestra una banda inespecífica I de 1000-1200 pb, la cual no corresponden a los tamaños esperados. El carril 8 se observan 3 bandas de amplificadas, la banda inespecífica J con un peso molecular por encima de las 2000 pb, la banda K de 1739 pb correspondiente a Delta PB y la banda L con un peso consistente a las demás proteobacterias esperadas. Finalmente, el noveno carril también presenta una banda difusa M ubicada a la misma altura de la banda K de 1739 pb consistente a las DPB.

Los resultados obtenidos fueron concentrados en la **tabla 3**. Podemos concluir que la mezcla para reacción número 6 bajo la condición 3 obtuvo múltiples amplificadas tanto en individuos sanos como con síndrome metabólico en comparación con las demás reacciones descritas en los resultados. Los ensayos demostraron que los oligonucleótidos PQQC F1 y PQQCR2 consiguieron amplificar el clúster en prácticamente todas las muestras analizadas.

(Tabla 3)

Amplificaciones obtenidas

Muestra	Oligonucleótidos	Condición	Bandas amplificadas	Tamaño en pb
S1	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3.	-	-
S2	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3.	-	-
S3	PQQC F1 y R2	Tabla 2- condición 1 Tabla 6 - condición 3	2 2	1500, 2000 2500, 1500
S4	PQQC F1 y R2	Tabla 2 - condición 1 tabla 6 - condición 3	1 1	2500 1700
SM1	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	3	2200, 1500 y 1000
SM3	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	1	1300
SM4	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	1	1400
SM5	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	1	1400
SM6	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	2	1300 y 1400
SM7	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	1	1300
SM8	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	3	2000, 1700 y 1400
SM9	PQQC F1 y R2	Tabla 6 - condición 3	1	1700

DISCUSIÓN

Las muestras fecales de los pacientes sanos y con SM tenían amplia variabilidad de aspectos a considerar, lo cual depende del tipo de alimentación de cada paciente y de los padecimientos que éste posea. Los resultados de análisis electroforético del DNA purificado indican que en aquellas muestras analizadas de consistencia sólida se obtuvo una menor cantidad de DNA en comparación con las muestras de consistencia acuosa, por lo que se optó por concentrar el DNA recolectado mediante la técnica de precipitación con isopropanol. En muestras fecales de mayor densidad generalmente se hallan fibras vegetales y/o material no procesado con muy bajo contenido en agua, las cuales interfieren con la separación de las bacterias durante el proceso de suspensión debido a que estas se hayan adheridas a ellas. Así mismo, al no ser una muestra de DNA purificado a partir de un cultivo celular, las concentraciones de DNA son considerablemente más bajas en contraste con la muestra control de *P. Protegens*.

Por otro lado, también se concluyó que se obtuvo un mejor purificado al realizar los análisis en aquellas muestras que tuvieron un mejor proceso de congelación durante su recolección, evitando su degradación y posibles contaminaciones, obteniendo las cantidades óptimas de DNA en comparación con aquellas que tuvieron tiempos más prolongados para su manejo, disminuyendo directamente la calidad del DNA obtenido durante el proceso de extracción. También, se realizó un método de extracción alternativo con la finalidad de conseguir mayores concentraciones de DNA que con el KIT comercial empleado originalmente. La extracción manual mediante protocolo Q resultó ser igual o incluso menos eficiente que el KIT comercial, debido a que la metodología empleada resultó ser mucho más laboriosa y sin obtener diferencias considerables en el purificado del DNA.

Así mismo, se realizaron múltiples estudios tanto experimentales como en programas bioinformáticos para determinar las concentraciones óptimas de oligonucleótidos, DNA y DNTPs usadas posteriormente en cada reacción, las condiciones definitivas del termociclador, aunado a diversos análisis para determinar cualitativamente los oligonucleótidos más adecuados para amplificar el

cluster *pqqCDE* en el mayor número de especies bacterianas aisladas de cada muestra.

Después de analizar de manera particular cada uno de los resultados obtenidos con las diferentes variantes utilizadas para realizar la reacción, se concluyó que los oligonucleótidos PQQC F1 y R2 amplificaron un mayor número de muestras bajo la mezcla descrita en la tabla PCR6 y la condición descrita en la figura 6, obteniendo un volumen total de 20 ul para cada PCR incubándose a 56°C durante 30 ciclos en el termociclador.

Los resultados finales condensados en la Tabla 3 demostraron que para solo 2 de los 4 individuos sanos (S3 y S4) presentan la amplificación del marcador molecular *pqqCDE*. Por otra parte, los análisis de individuos con SM mostraron que todos los pacientes estudiados manifiestan el clúster *pqqCDE*. Esto supondría que una amplia diversidad de modelos bacterianos que componen a la microbiota intestinal tanto los de individuos sanos como en SM presenten genomas con los genes relacionados a la biosíntesis de PQQ. Los pesos moleculares de las bandas identificados durante los análisis electroforéticos corresponden a los tamaños esperados según los análisis *in silico* de cada modelo bacteriano. En el análisis definitivo de cada muestra, se identificaron bandas accesorias con pesos moleculares por encima y por debajo de los esperados, algunas sobrepasaban las 2000 pb mientras que la de menor tamaño tenía un peso de 1000 pb. La presencia de dichas bandas supondría dos escenarios, la presencia de genomas bacterianos potencialmente productores de PQQ no caracterizados e independientes a los teóricos o bien amplificaciones inespecíficas de las cuales se deberá verificar mediante la secuenciación de los mismos.

Tal como nos indica la literatura, la presencia de la quinona de pirroloquinolina se encuentra ampliamente distribuido en plantas, animales, alimentos y fluidos biológicos, esto gracias a la presencia de bacterias que la sintetizan y, por tanto, se infiere que su presencia en una gran parte de la población a nivel mundial se deba al consumo de aquellos alimentos que las contengan, dando pie a la creación de nichos potencialmente productores de PQQ en la microbiota intestinal de cada

individuo. Particularmente en individuos diagnosticados con SM, se han descrito decenas de bacterias gram negativas que son potencialmente productoras de esta molécula, incluidas las patógenas y oportunistas, lo que sugiere que la síntesis de PQQ como método antioxidante por parte de estas bacterias les permita nivelar las concentraciones de radicales libres durante un proceso inflamatorio agudo, o bien durante un proceso crónico en aquellos individuos con anomalías metabólicas. Se han mencionado anteriormente los mecanismos moleculares en los cuales la microbiota intestinal modificada se relaciona con el SM, debido al aumento en la proporción de especies gramnegativas en el intestino que liberan diversos fragmentos bacterianos como los son el peptidoglicano y especialmente lipopolisacáridos, generando inflamación y endotoxemia metabólica.

Gracias al diseño de los oligonucleótidos capaces de amplificar la región *pqqCDE* es posible identificar aquellas especies bacterianas mediante la secuenciación de las bandas obtenidas, pudiendo comparar cada una de las secuencias en el Gen Bank del NCBI y de este modo, conocer a detalle la composición microbiana en personas sanas y enfermas.

CONCLUSIÓN

Gracias a los múltiples análisis realizados durante la experimentación con las muestras de individuos sanos y con síndrome metabólico, se concluye que el marcador molecular *pqqCDE* potencialmente puede determinar la presencia de bacterias potencialmente productoras de PQQ tanto en individuos sanos como con SM. Se logró amplificar el clúster *pqqCDE* de proteobacterias en prácticamente todas las muestras utilizando los oligonucleótidos PQQCF1 y PQQCR2. Los tamaños de las bandas obtenidas fueron coincidentes con los análisis *in silico* previos al estudio experimental. Si bien existe una inconcebible diversidad microbiana entre cada individuo, los oligonucleótidos diseñados para amplificar las secuencias conservadas en bacterias productoras de PQQ fueron eficientes y nos permitieron evaluar mediante análisis electroforético los amplificadores obtenidos con el marcador molecular *pqqCDE* de muestras fecales de individuos sanos y con SM.

PERSPECTIVAS

Gracias a los resultados positivos obtenidos en este estudio, la investigación del bacterioma intestinal productor de PQQ sustenta una continuación a partir de los amplicones obtenidos. Debido a que la región amplificada del clúster de *pqqCDE* puede ser analizada posteriormente por secuenciación y comprobar su identidad con el marcador molecular *pqqCDE* y posteriormente poder analizar la filogenia de las bacterias, con lo cual podremos identificar los géneros y especies encontradas en cada una de las muestras estudiadas.

REFERENCIAS

1. Badimón, L. y Martínez, J. (2006). Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología*; 6 (Supl A):21-30.
2. Bagatini, M., Martins, C., Battisti, V., Gasparetto, D., Spanevello, R., Ahmed, M., Schmatz, R., Schetinger, M. and Morsch, V. (2011). Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels* 26:55–63.
3. Bajaj, J., Heuman, D., Hylemon, P., Sanyal, A., Puri, P., Sterling, R., Luketic, V., Stravitz, R., Siddiqui, M. y Fuchs, M. (2014). Ensayo clínico aleatorizado: *Lactobacillus GG* modula el microbioma intestinal, el metaboloma y la endotoxemia en pacientes con cirrosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*; 39: 1113–1125.
4. Bartberger, M., Liu, W. and Ford, E. (2002). "The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry," Proceedings of the *National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 17, pp. 10958–10963.
5. Bensussan, N. y Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology*; 10: 735-744
6. Bolaños, J., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J. and Clark, J. (1997). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*; 68:2227-40.
7. Cani, P., Amar, J., Iglesias M, Poggi M, Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A., Fava, F., Tuohy, K., Chabo, C., Waget, A., Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti J, Gibson G, Casteilla L, Delzenne N, Alessi M. and Burcelin, R. (2007). *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. *Diabetes*; 56: 1761-1772.
8. Chattopadhyay, M., Khemka, K., Chatterjee, G., Ganguly, A., Mukhopadhyay, S. and Chakrabarti, S. (2015). "Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects". *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 399, no. 1-2, pp. 95–103.
9. Cheng, Y., Kim, J., Kim, W., Choi, S. and Yu, P. (2002). Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microscope Reserch Tech*; 59: 264-272.
10. Chiurchiù, V. and Maccarrone, M. (2011). Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 15, no. 9, pp. 2605–2641.
11. Coca, A., Aranda, P., Marín, R. y Calvo, C. (2021). Hipertensión arterial y diabetes no insulinodependiente. *Casos Clínicos en Hipertensión Arterial*. 8va^o ed. Barcelona, España. Masson. pag 101-106.
12. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. (2021). Informe final de resultados.

13. Fearheller, D., Brown, M., Park, J., Brinkley, T., Basu, S. and Hagberg, J. (2009). Exercise training, NADPH oxidase p22phox gene polymorphisms, and hyper-tension. *Medicine and Science in Sports and Exercise*;41(7):1421-8.
14. Förstermann, U. (2000). Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. *En: Mayer B, ed. Handbook of experimental pharmacology: nitric oxide*. Vol. 143. Berlin: Springer.
15. Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B. y Kuby, J. (2004). Inmunología. México: *McGraw-Hill Interamericana*; p. 357-380.
16. González, M., Bastidas, B., Ruiz, B., Godínez, S. y Panderó, A. (2002). Funciones endocrinas de la célula adiposa. *Revista de Endocrinología Nutricional*; 10: 140-146.
17. Green, M. and Sambrook, J. (2017). Precipitation of DNA with Isopropanol. *Cold Spring Harb Protoc.* (8): pdb.prot093385.
18. Gutiérrez, F. (2019). Estudio del “cluster” de PQQ como marcador molecular para bacterias productoras de PQQ. *Tesis de licenciatura en Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México*.
19. Haffner, S. and Taegtmeyer, H. (2003). “Epidemic obesity and the metabolic syndrome,” *Circulation*, vol. 108, no. 13, pp. 1541–1545.
20. Hernández, D., Julio, C., Arana, R., Román, E. y Fausto, S. (2016). Papel en la resistencia a la insulina, inflamación y protección cardiovascular. *Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F., México*.
21. Hooper, L, Wong, M., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. and Gordon, J. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*; 291: 881-884.
22. Janssen, H., Mossman B. and Heintz, N. (2008). “Redox-based regulation of signal transduction: Oxidative Medicine and Cellular Longevity 13 principles, pitfalls, and promises”. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no. 1, pp. 1–17.
23. Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D. and Dikalov, S. (2003). Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncou-pling endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 278(25):22546-54.
24. Lönn, M., Dennis, M. and Stocker, R. (2012). “Actions of “antioxidants” in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 53, no. 4, pp. 863–884.
25. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene pqqC, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Oct;77(20):7345-54. doi: 10.1128/AEM.05434-11.
26. Misra, H., Khairnar, N., Barik, A., Priyadarsini, K., Mohan, H. and Apte, S. (2004). Pyrroloquinoline-quinone: a reactive oxygen species scavenger in bacteria. *FEBS Lett* 578:26–30.

27. Molina, J., Leza, J., Ortiz, S., Moro, M., Pérez, S. and Lizasoain, I. (2002). Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of nitric oxide metabolites are increased in dementia with Lewy bodies. *Neuroscience Letters* 333; 151-3.
28. Neish, A. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*; 136: 65-80.
29. Palmieri, V., Grattagliano, I., Portincasa, P. and Palasciano, G. (2006). "Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome," *Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 12, pp. 3022–3026.
30. Ramírez, P. y Hernández, F. (2019). Prevalencia del síndrome metabólico en niños y adolescentes mexicanos en torno a sus diferentes definiciones. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 18 (2), 23-32.
31. Rucker, R., Chowanadisai, W. and Nakano, M. (2009). Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone. *Alternative Medicine Review*; 14: 268–77.
32. Sasakura, H., Moribe, H. and Nakano, M. (2017). Lifespan extension by peroxidase and dual oxidase-mediated ROS signaling through pyrroloquinoline quinone in *C. elegans*. *Journal of Cell Science*; 130: 2631–43.
33. Skogberg, N., Castaneda, E., Agyemang, C., Koponen, P., Lilja, E. and Laatikainen, T. (2022). The association of depressive and anxiety symptoms with the metabolic syndrome and its components among Russian, Somali, and Kurdish origin adults in Finland: A population-based study. *Journal of Psychosomatic Research, Volume 159*, 110944, ISSN 0022-3999.
34. Shen, G. (2012). "Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders," *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, vol. 12, no. 2, pp. 106–112.
35. Spahis, S., Borys, J. and Levy, E. (2017). "Metabolic syndrome as a multifaceted risk factor for oxidative stress," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 26, no. 9, pp. 445–461.
36. Spranger, J., Kroke, A., Möhling, M., Hoffman, k., Bergmann, M. and Ristow, M. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes. *Diabetes*; 52: 812-817.
37. Stefano, G., Challenger, S. and Kream, R. (2016). "Hyperglycemia associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders". *European Journal of Nutrition*, vol. 55, no. 8, pp. 2339–2345.
38. Stites, T., Mitchell, A. and Rucker, R. (2000). Physiological importance of quinoenzymes and the o-quinone family of cofactors. *Journal of Nutrition*; 130 (4): 719-27.
39. Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y., Parker, H., Habib, A., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F. and Gribble, F. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*; 61: 364-371-PMID: 22190648.

40. Touyz, R. (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*;37(8): 1263-73.
41. Vera, C., Muñoz, J., Munive, J., Marín, V., Flores, M. y Carreño, R. (2017). Pirroloquinolinaquinona (PQQ) y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). De la biosíntesis a los fenotipos. *Alianzas y Tendencias*, vol 2, No. 1.
42. Wilcox, G. (2005). Insuline and insuline resistance. *The Clinical Biochemist Review*; 26:19-38.
43. Wolowczuk, C., Verwaerde, O. and Viltart, C. (2008). Feeding our immune system: Impact on metabolism. *Clinical & Developmental Immunology*. p. 639803.
44. Xia, N., Horke, S. and Habermeier, A. (2016). "Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in perivascular adipose tissue of diet-induced obese mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 36, no. 1, pp. 78–85.