BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

RELACIÓN ENTRE FACTORES AMBIENTALES, MICROBIOTA Y OBESIDAD

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

MARCO ANGEL SIMONI BERRA

Asesor de tesis:
M.C. Constantino Gil Juárez

Noviembre 2017

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

RELACIÓN ENTRE FACTORES AMBIENTALES, MICROBIOTA Y OBESIDAD

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

MARCO ANGEL SIMONI BERRA

Comité Tutoral:

Asesor y Tutor	M.C. Constantino Gil Juárez
Integrante Comité Tutoral	Dra. María Lilia Cedillo Ramírez
Integrante Comité Tutoral	Dr. Fernando Hernández Aldana
Integrante Comité Tutoral	Dra. Sonia Emilia Silva Gómez

Noviembre 2017

BUAP

C. MARCO ÁNGEL SIMONI BERRA

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

Dr. Fernando Hernández Aldana	*Presidente*
Dra. María Lilia Cedillo Ramírez	*Secretario*
M.C. Cristina Lara Ochoa	*1er. Vocal*
Dra. Anabella Handal Silva	*2do. Vocal*
Dra. Edith Chávez Bravo	*Suplente*

designado para la defensa de su tesis "*Relación entre factores ambientales, microbiota y obesidad*" han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
H. PUEBLA DE Z., NOVIEMBRE 7 DE 2017

DR. RICARDO DARÍO PEÑA MORENO
SECRETARIO ACADÉMICO

RDPM/anma
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario

Posgrado en Ciencias Ambientales
Instituto de Ciencias (ICUAP)
Edificio IC6,
Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7056

“Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por becarme durante dos años, en los cuales pude aprender muchas cosas durante la realización de mi tesis y mi estancia en el posgrado”

“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis representa la culminación del esfuerzo conjunto de muchas personas e instituciones sin las cuales no hubiera podido realizarse y a las cuales me es muy difícil expresarles mis agradecimientos en tan solo unas líneas.

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis el M.C. Constantino Gil Juárez, por haberme guiado en todo momento, por sus innumerables consejos y comprensión, sin los cuales este trabajo no hubiera visto la luz.

Cabe destacar que la presente investigación de tesis siempre se vio enriquecida por la valiosa ayuda prestada por mi comité tutorial y sinodales, la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez, la Dra. Edith Chávez Bravo, el D.C. Jorge Alberto Girón Ortiz, la Dra. Anabella Handal Silva, el Dr. Fernando Hernández Aldana, la Dra. Sonia Emilia Silva Gómez, y la M.C. Cristina Lara Ochoa, gracias a todos ustedes por sus numerosas sugerencias, comentarios y correcciones que han contribuido a mejorar este trabajo.

Agradezco a mis padres por estar siempre ahí, llenarme de ánimos, motivarme y apoyarme en todos mis proyectos.

Así mismo quiero agradecer la ayuda de mis profesores, compañeros y amigos del posgrado en Ciencias Ambientales de la BUAP, los cuales siempre han estado dispuestos a enseñarme, apoyarme y animarme.

También agradezco al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, lugar donde realicé gran parte de la tesis.

Gracias a todas y cada una de las personas que formaron parte de esta investigación y me apoyaron con sus muestras y comentarios y a todas las personas que no he nombrado y han puesto de su parte, ayudando a la realización de esta tesis de un modo u otro.

INDICE

RESUMEN I

ABSTRACT II

I. INTRODUCCIÓN 1

II. JUSTIFICACIÓN 2

III. MARCO TEÓRICO 3

3.1 Antecedentes. 3

3.1.1 Nutrición y Cultura 6

3.1.2 Valoración del paciente obeso 7

3.1.3 Tipos de obesidad según la distribución de grasa 9

3.1.4 Alteraciones asociadas a la obesidad 10

3.1.5 Microbiota intestinal. 11

3.1.6 Funciones de la microbiota intestinal 13

3.1.7 Obesidad y composición de la microbiota intestinal 16

3.1.8 Papel de la microbiota intestinal en la función neurohormonal 18

3.1.9 Papel de la microbiota intestinal en la función inmune 20

3.1.10 Microbiota y factores ambientales 22

3.1.11 Prebioticos y Probioticos 23

3.1.12 Psicobióticos 24

3.1.13 Salud Ambiental 25

IV. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 26

4.1 Pregunta de Investigación 26

V. HIPÓTESIS 26

VI. OBJETIVOS 26

6.1 Objetivo General 26

6.2 Objetivos Específicos 26

VII. METODOLOGÍA 27

7.1 Generalidades 27
7.2 Muestra 27
7.3 Fase de campo 29
7.4 Fase de laboratorio 30
7.4.1 Extracción y Purificación del DNA 30
7.4.2 Iniciadores para PCR y Secuenciación 31
7.4.3 Preparación de Gel para Electroforesis 32
7.5 Fase de Gabinete 33
7.5.1 Análisis estadísticos 33
VIII. RESULTADOS 35
8.1 Resultados de la encuesta realizada 35
8.1.1 Características de la población de estudio 35
8.1.2 Dieta 36
8.1.3 Actividad Física y Sedentarismo 38
8.1.4 Hábitos 39
8.2 Análisis de la Microbiota intestinal 39
IX. DISCUSIÓN 42
X. CONCLUSIONES 48
XI. BIBLIOGRAFÍA 49
XII. Anexos 53
12.1 Encuesta 53
12.2 Carta de Consentimiento Informado 55

RESUMEN

La obesidad es el resultado del desequilibrio energético entre la cantidad de calorías consumidas y gastadas, lo que genera un incremento de peso y la predisposición a desarrollar enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus tipo II (DM II) y las enfermedades cardiovasculares. Su etiología es multicausal y abarca desde factores genéticos, ambientales y sociales. La prevalencia de la obesidad cada vez es mayor, constituyendo uno de los principales problemas de salud pública en el estado de Puebla y en México en general.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar qué factores ambientales modifican la composición de los microorganismos: *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en la microbiota intestinal y como esto contribuye a la obesidad de las personas. En la presente investigación, se evaluaron factores ambientales que pueden influir en la obesidad, a través de la aplicación de una encuesta a treinta personas de la ciudad de Puebla (Diez personas padecen obesidad, diez personas son atletas practicantes de triatlón y diez personas con peso normal), con el fin de obtener datos referentes a su dieta, actividad física, sedentarismo, hábitos y nivel socioeconómico; la encuesta se analizó con el programa estadístico GraphPad InStat 3.10. Además de responder la encuesta, todas las personas, proporcionaron una muestra de materia fecal, para determinar la presencia o ausencia de los microorganismos de interés en este estudio mediante la técnica de PCR de punto final y su relación con los factores ambientales. Se determinó que la dieta, la actividad física, el sedentarismo, el estado de ánimo y el estrés, son los principales factores ambientales que modifican la composición de la microbiota intestinal. Lo que sugiere que a través de cambios ambientales se podría hacer frente a la obesidad.

La composición de las bacterias de interés en la presente investigación, no presento diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, sin embargo, se pudo observar una mayor presencia del género *Lactobacillus spp.*, en las personas que consumían una mayor cantidad de carbohidratos con respecto a los otros macronutrientes; la presencia de los microorganismos *Bifidobacterium spp. y Fusobacterium nucleatum* fue la misma en los tres grupos, mientras que *Akkermansia muciniphila* se detectó en mayor medida en el grupo de las personas con obesidad.

ABSTRACT

Obesity is the result of the energy imbalance between the number of calories consumed and spent, which generates an increase in weight and predisposition to develop chronic diseases such as diabetes mellitus type II (DM II) and cardiovascular diseases. It´s etiology is multicausal and includes genetic, environmental and social factors. The prevalence of obesity is increasing, becoming one of the main public health problems in the state of Puebla and in México in general.

The objective of this research work is to determine which environmental factors modify the composition of microorganisms: *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Akkermansia muciniphila and Fusobacterium nucleatum* in the intestinal microbiota and how this contributes to the obesity of people. In the present investigation, environmental factors that can influence obesity were evaluated, through the application of a survey to thirty people from the city of Puebla (Ten people suffer from obesity, ten people are triathlon practicing athletes and ten people with normal weight), in order to obtain data regarding their diet, physical activity, sedentary lifestyle, habits and socioeconomic level; the survey was analyzed with the statistical program GraphPad InStat 3.10. In addition to responding to the survey, all people provided a sample of fecal matter, to determine the presence or absence of the microorganisms of interest in this study using the technique of endpoint PCR and its relationship with environmental factors. It´s was determined that diet, physical activity, sedentary lifestyle, mood and stress are the main environmental factors that modify the composition of the gut microbiota. Which suggests that through environmental changes could be faced with obesity.

The composition of the bacteria of interest in the present investigation, did not present significant differences between the three study groups, however, a greater presence of the genus *Lactobacillus spp.* Could be observed, in the people who consumed a greater amount of carbohydrates with respect to the other macronutrients; the presence of microorganisms *Bifidobacterium spp*. and Fusobacterium nucleatum was the same in the three groups, while *Akkermansia muciniphila* was detected to a greater extent in the group of people with obesity.

I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es uno de los problemas crónicos de salud más frecuentemente debatidos en el mundo y cuya prevalencia ha aumentado significativamente en las dos últimas décadas (Bibiloni, Membrez y Chou, 2009). Esta patología se debe a la alteración del proceso biológico encargado de regular el peso corporal, provocando un desequilibrio entre la ingesta (consumo de alimentos) y el gasto de energía (actividad física). La etiología de estos padecimientos es multicausal (Ruiz *et al.*, 2010) y abarca desde factores genéticos, ambientales, socioculturales, conductuales y psicosociales (Bibiloni *et al.,* 2009). El sobrepeso y la obesidad se incrementan en proporciones sobredimensiónales en todo el mundo (Ruiz *et al.,* 2010), donde cada año mueren más de 2.8 millones de personas a causa de esta enfermedad Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017). México ocupa el primer lugar a nivel mundial en obesidad tanto en niños como en adultos, además que ya se presentan casos en bebés, debido a que no reciben leche materna y se les alimenta con fórmulas lácteas. A largo plazo, la obesidad favorece la aparición de enfermedades tales como diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, altos niveles de colesterol, insuficiencia renal, entre otros. Debido a esto, la obesidad ha sido reconocida como el problema de salud pública más importante de nuestro país (Barquera *et al.*, 2013).

Se han relacionado factores conductuales, genéticos y medioambientales con el sobrepeso y la obesidad y datos recientes indican que la población de microorganismos residentes en el intestino, conocida como microbiota intestinal, puede influir sobre la absorción de nutrientes y el almacenamiento de energía. La comida es el sustrato para el crecimiento de la microbiota y afecta directamente a su composición (Tavares, Araújo y Bressnan, 2013). Los seres humanos son considerados como ecosistemas microbianos, que comprenden bacterias, arqueas, eucariotas y virus con los que se ha co-evolucionado y que colonizan diferentes hábitats del cuerpo (Greenhalgh, Meyer, Aagaard y Wilmes, 2016). El rol de los microorganismos que colonizan el aparato digestivo en el desarrollo de la obesidad ha comenzado a ser recientemente objeto de investigación. La microbiota intestinal tiene varias funciones beneficiosas relacionadas con la salud del hombre y estudios sugieren una posible relación con la presencia de enfermedades metabólicas como la obesidad. En personas con obesas se eleva la razón *Firmicutes/Bacteroidetes*, razón que puede ser modificada con determinados cambios en el estilo de vida.

Las interacciones entre microbiota intestinal, sistema inmune, inflamación, obesidad y comorbilidades sugieren que la respuesta inmune podría ser nociva en condiciones de sobrecarga

metabólica y que la acumulación de energía en forma de grasa, sobre todo intraabdominal, podría ser una respuesta del organismo frente a modificaciones desfavorables de la microbiota intestinal; modificaciones en la microbiota intestinal conducen a un estado crónico de endotoxemia, el cual es un factor clave asociado a incremento de tejido adiposo (Ruiz *et al.*, 2010).

El incremento de la prevalencia de obesidad durante las últimas décadas es alarmante y no puede ser atribuido únicamente a factores genéticos. La investigación sobre el rol de las bacterias en el incremento de peso, está señalando actualmente a la microbiota intestinal, como factor ambiental que afecta a la obesidad.

II. JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas más comunes asociado al estilo de vida actual es el exceso de peso. La frecuencia de pacientes con sobrepeso aumenta cada día, trayendo consigo un importante número de complicaciones asociadas a esta enfermedad y supone una creciente carga económica. De acuerdo con datos de la OMS, en 2005 había en el mundo un aproximado de 400 millones de adultos obesos y se calculó que para el 2015 habría por lo menos 2,300 millones de individuos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad. La prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños y adultos mexicanos se ha incrementado de manera alarmante en las últimas dos décadas (Barquera, Campos, Rojas y Rivera, 2010) tanto que hoy en dia México ocupa el primer lugar a nivel mundial en obesidad. Se ha sugerido mayor susceptibilidad genética a la obesidad en la población mexicana comparada con otras poblaciones. Sin embargo, los factores genéticos no explican los aumentos inusitados de la prevalencia de obesidad en la población mexicana en un periodo de tiempo tan corto. Este gran aumento en la prevalencia de obesidad, parece obedecer a cambios en el entorno, donde el ambiente juega un papel importante.

A menudo los cambios en los hábitos alimentarios y de actividad física son consecuencia de cambios ambientales y sociales asociados al desarrollo y a la falta de políticas de apoyo en sectores como la salud; agricultura; transporte; planeamiento urbano; medio ambiente; procesamiento, distribución y comercialización de alimentos, y educación OMS (2017). La microbiota intestinal es una nueva frontera en la búsqueda para entender la biología humana y su evolución. Aunque en los últimos años la microbiota intestinal se ha empezado a relacionar con la prevención y control de la obesidad, existen pocos datos conclusivos al respecto, además, los estudios sobre los factores

ambientales y su relación con la obesidad son escasos, por lo que hay poca información sobre el tema en el estado de Puebla.

Por este motivo, en el presente trabajo de investigación, se planteó analizar la relación entre, los factores ambientales, la microbiota y la obesidad, desde la perspectiva de las ciencias ambientales, es decir, desde una perspectiva científica multidisciplinaria, que relacione al ser humano con el medio ambiente que lo rodea, con la finalidad de identificar las causas asociadas a este problema de salud pública, así como de ampliar el conocimiento y aportar más datos sobre el tema, para hacerle frente a la obesidad de manera más efectiva.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes.

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial consecuencia de la interacción del genotipo y ambiente (López y Soto, 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) define al sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El cuerpo almacena la energía extra en el tejido adiposo (grasa), lo cual provoca un aumento de peso y representa un importante factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades (Marchat y Zamorano, 2007).

El sobrepeso y la obesidad se incrementan en proporciones sobredimensiónales en todo el mundo (Ruiz *et al.,* 2010). Si bien el sobrepeso y la obesidad tiempo atrás eran considerados un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente ambos trastornos están aumentando en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos. Desde 1980, la obesidad se ha duplicado en todo el mundo, alcanzando proporciones epidémicas a nivel mundial. En los países en desarrollo con economías emergentes (clasificados por el Banco Mundial en países de ingresos bajos y medianos) el incremento porcentual del sobrepeso y la obesidad en los niños ha sido un 30% superior al de los países desarrollados OMS (2017). En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, es decir cerca del 39% de la población, de los cuales más de 600 millones eran obesos (13%) Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia UNICEF (2015). En la actualidad es la enfermedad metabólica más prevalente en los países desarrollados y en las últimas décadas ha experimentado un progresivo y alarmante incremento a nivel mundial que se acompaña de un incremento de morbimortalidad asociada (López *et al.,* 2010).

En la mayoría de los países situados en África, América Latina, Asia y Oceanía se han reportado mayores niveles de sobrepeso y obesidad entre las mujeres. En contraste con las regiones de Europa y América del Norte donde las tasas de prevalencia de sobrepeso masculino fueron más pronunciadas (Kobyliak *et al.*, 2016). Los países con más recursos suelen ser los que más obesos tienen por kilómetro cuadrado. Esta evidencia la corrobora el mapa mundial de obesidad creado por la OMS (Figura 1), donde los países con un mayor índice de personas obesas son México (35.2%), Estados Unidos (34.9%), Nueva Zelanda y Australia (27%), Gran Bretaña, Irlanda y Rusia (25%). Los países en los que menor obesidad padecen las personas son naciones del centro, centro-sur y centro-norte de África, Pakistán, Afganistán, Camboya, Vietnam, Malasia, Indonesia, India, Japón y Corea (Menor al 5%) OMS (2017).

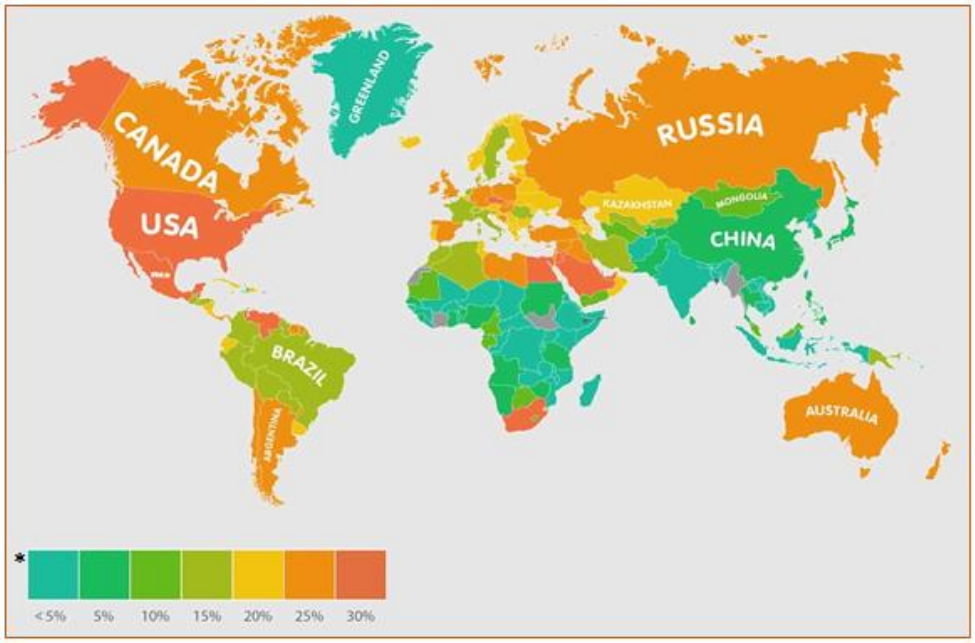

Figura 1. Mapa mundial de la obesidad. *Porcentaje de la población con un IMC ≥ 30 Kg/m2 (OMS, 2017).

La obesidad es un desafío importante para la salud en México afecta a más de un tercio de la población adulta y contribuye al aumento de las tasas de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, ictus, enfermedad metabólica, cáncer endometrial y colorrectal (Ojeda *et al.*, 2016). México se caracteriza por tener notables diferencias epidemiológicas entre las regiones, debido a que todos los servicios de salud están experimentando un proceso de cambio, ya que antes trataban con mayor frecuencia enfermedades agudas y en la actualidad buscan enfocarse en

prevenir enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad, diabetes e hipertensión arterial (Barquera *et al.*, 2010). Actualmente, la diabetes es el mayor problema al que se enfrenta el sistema nacional de salud en México: es la principal causa de muerte en adultos, la primera causa de demanda de atención médica y la enfermedad que consume el mayor porcentaje de gastos en las instituciones públicas (UNICEF, 2015). La epidemia de obesidad que se experimenta en México ha sido ampliamente documentada a través de las últimas encuestas nacionales. En el año 2006, se reportó que en adultos de 20 años o mayores la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 69.7%, lo que ubicó a México como uno de los países con mayor prevalencia en la región de América y a nivel global. Además, esta prevalencia aumentó más de 12% en tan solo seis años (2000-2006), lo cual posicionó a México como uno de los países con mayor tendencia de aumento de sobrepeso y obesidad en el mundo con un porcentaje anualizado de incremento de alrededor de 2% (Barquera, Campos, Hernández, Pedroza y Rivera, 2013). La principal causa a la que se apunta son los malos hábitos en la alimentación, que acaban desembocando en una prevalencia del sobrepeso de un 70% en la edad adulta UNICEF (2015).

Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012), la cual es representativa de las cuatro regiones de México: Norte, Centro, Ciudad de México y Sur, el 74 % de la población mexicana tiene sobrepeso (Figura 2). Los estados con menor prevalencia de sobrepeso son Chiapas (64.3%), Oaxaca (66.4%), Hidalgo (68.1%), San Luis Potosí (69.3%), Quintana Roo y Puebla (70.4%). Entre los estados que presentaron la mayor prevalencia de sobrepeso se encuentran Baja California Sur (80.0%), Tabasco (79.3%), Distrito Federal (78.8%), Campeche (78.7%) y Sonora (78.3%) (Barquera, *et al*, 2013). Dentro del Estado de Puebla, todavia no se han realizado estudios para conocer el porcentaje de sobrepeso y obesidad dentro de los 217 municipios que componen la entidad.

Figura 2. Prevalencia de Sobrepeso en México (ENSANUT, 2012).

3.1.1 Nutrición y Cultura

En la actualidad con el desarrollo tecnológico, la modernización y el ritmo de vida acelerado, la forma de alimentarse se ha visto alterada, sobre todo en las zonas urbanas. La dieta que consume la mayor parte de la población (dieta occidental) en la que se omite una de las tres comidas principales (desayuno, comida y cena) y que contiene grandes cantidades de azúcares y grasas saturadas, así como el consumo reducido de frutas y verduras, ponen en riesgo a niños, adolescentes y adultos de desarrollar sobrepeso u obesidad (Córdova *et al.*, 2010). La abundancia o escasez de alimento determinará la presencia o no de especies bacterianas que se reproducen bien cuando hay disponibilidad ilimitada de alimentos, o de especies más eficientes cuando los nutrientes son escasos. (Icaza, 2013), además, los diferentes tipos de dietas producen numerosos metabolitos específicos que pueden influir en la respuesta inmune o metabólica (McKenzie, Tan, Macia y Mackay).

La energía es obtenida de la dieta, ya sea por el metabolismo directo de los alimentos consumidos o por la absorción de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias intestinales. Los lípidos, proteínas y diversos carbohidratos pueden ser metabolizados directamente. Todas las macromoléculas antes mencionadas están sujetas a digestión enzimática y pH ácido para ayudar a la absorción. Por el contrario, la fibra dietética (carbohidratos no digeribles procedentes de

polisacáridos vegetales y oligosacáridos que son resistentes a la digestión enzimática y química) no es utilizada como fuente de energía y en su lugar es fermentada por bacterias intestinales en metabolitos de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), rápidamente absorbidos. Los alimentos ricos en fibra incluyen granos, verduras, frutas, y nueces. Aunque los SCFA también pueden formarse a partir del metabolismo de las proteínas y glicoproteínas que se encuentran en los alimentos, los carbohidratos son los contribuyentes más significativos (McKenzie *et al.*, 2017).

La obesidad es un proceso de patogenia compleja, aún no claramente establecida, en la que están implicados factores genéticos y ambientales y que se manifiesta por una expansión patológica de los depósitos adiposos corporales. La expansión de la grasa corporal es consecuencia de un desbalance energético crónico relacionado casi siempre con factores ambientales modificables como la actividad física y la dieta, junto a factores hormonales endógenos, en un individuo predispuesto genéticamente. El factor genético justifica un pequeño porcentaje de la obesidad: el 1,8% de los adultos obesos y hasta el 6% de los niños con obesidad severa tienen obesidad monogénica dominante causada por mutaciones en el gen del receptor 4 de la melatonina (MCR4). Entre los factores ambientales y sociales que inducen obesidad se encuentran: el estilo de vida, el comportamiento alimentario, que, con frecuencia, se traduce en ingestas calóricas excesivas e hipergrasas, el tamaño de las raciones, la accesibilidad de los alimentos, el ritmo de vida, la incorporación de la mujer al mundo laboral, con el consecuente aumento de las comidas rápidas y el sedentarismo, entre otras.

3.1.2 Valoración del paciente obeso

La valoración del paciente ha de ser completa y minuciosa para determinar: Diagnóstico y grado de obesidad (medición del índice de masa corporal (IMC)), Tipo de distribución de la grasa corporal (medición del perímetro de cintura), Posibles factores predisponentes: ambientales, genéticos, secundarios a patología subyacente o terapéuticos, patología asociada y las comorbilidades presentes en el sujeto obeso (López *et al.*, 2010).

En la práctica diaria se utilizan métodos antropométricos, considerados indicadores indirectos del exceso de grasa para el diagnóstico de obesidad (López *et al.*, 2010).

El método más común consiste en determinar el índice de masa corporal (IMC), el cual, es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por

el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, puesto que es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades (Tabla 1).

Tabla 1.
Clasificación del peso corporal de acuerdo al IMC según la OMS

IMC (Kg/m^2)	Clasificación
< 18.5	Peso Bajo
18.5 - 24.9	Peso Normal
25 - 29.9	Sobrepeso
30 - 34.9	Obesidad Tipo I
35 - 39.9	Obesidad Tipo II
≥ 40	Obesidad Tipo III o mórbida

En la década de los años 40, el médico francés Jean Vague planteó que la distribución anatómica de la grasa corporal determinaba en forma distinta el riesgo de salud asociado a la obesidad (Moreno, 2012). El patrón de distribución anatómico de la grasa corporal presenta una clara relación con el riesgo metabólico y cardiovascular (López *et al.*, 2010). Por esta razón, se han planteado desde entonces el empleo de una serie de mediciones e índices para determinar la distribución de la grasa corporal. Entre los más utilizados se encuentran la índice cintura cadera y la medición exclusiva de la circunferencia de cintura, que se plantea que estima con la misma exactitud la grasa intraabdominal como lo hace la relación cintura-cadera (Moreno, 2012).

El Índice Cintura Cadera (ICC), se calcula dividiendo el tamaño de la cintura (cm) por el de la cadera (cm). Un valor superior a 0.8 en mujeres y 1.0 en hombres, significa un exceso de grasa en la zona central o abdominal (Tabla 2).

Tabla 2.
Índice Cintura-Cadera (ICC)

Género	Excelente	Bueno	Promedio	En Riesgo
Hombres	< 0.85	0.85-0.89	0.90-0.95	≥ 0.95
Mujeres	< 0.75	0.75-0.79	0.80-0.86	≥ 0.86

Nota. Valores expresados como el cociente cintura/cadera en centímetros.

La circunferencia de cintura es un índice que mide la concentración de grasa en la zona abdominal. Para su medición se debe utilizar una cinta métrica no extensible y se debe medir al final de una expiración suave, en posición de pie y se recomienda realizar al menos 2 mediciones y promediarlas. Numerosos estudios prospectivos han demostrado una asociación entre el aumento de la relación cintura-cadera y el aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular, independientemente del IMC. Según las recomendaciones de las Guías Clínicas para la Obesidad del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. (NIH), se consideran puntos de corte de circunferencia de cintura de 88 cm. para las mujeres y de 102 cm. para los hombres, valores incluidos en la definición del Síndrome Metabólico según las Guías propuestas por el Panel de Expertos en Colesterol en el Tercer Panel de Tratamiento para Adultos (ATP III).

El patrón de distribución anatómico de la grasa corporal presenta una clara relación con el riesgo metabólico y cardiovascular (López *et al*., 2010). Se establecieron los siguientes puntos de corte de circunferencia de cintura, como nivel de alerta y nivel en el cual ya hay que realizar una acción terapéutica (Tabla 3) (Moreno, 2012).

Tabla 3.

Valores de circunferencia abdominal

	Zona de Alerta	Nivel de Acción
Hombres	≥ 94 cm	≥ 102 cm
Mujeres	≥ 80 cm	≥ 88cm

Fuente: (Moreno, 2012, p.127)

3.1.3 Tipos de obesidad según la distribución de grasa

Los tipos de obesidad según la distribución de la grasa en el cuerpo se clasifican en: Obesidad abdominal o androide (Forma de manzana): la localización del exceso de grasa se encuentra en el abdomen, el tórax y la cara. Está muy asociada con la diabetes y enfermedades del corazón; Obesidad periférica o ginoide (Forma de pera): la grasa acumulada se encuentra en muslos y caderas. Se da especialmente en mujeres y está relacionada con problemas como las varices y la artrosis en las rodillas; Obesidad homogénea: no existen una predominancia de exceso de grasa en una zona localizada, sino que la grasa se reparte por el cuerpo en las mismas proporciones.

3.1.4 Alteraciones asociadas a la obesidad

El exceso de acumulación de grasa y la inflamación sistémica de bajo grado son los principales fenotipos característicos de la obesidad (Tai, Wong y Wen, 2015). En los últimos años se ha sugerido que la inflamación crónica de bajo grado parece ser un factor importante en el desarrollo de trastornos metabólicos relacionados con la obesidad (Kobyliak *et al.*, 2016). Este estado probablemente sea secundario a la secreción de adipocitocinas. El aumento de determinadas adipocitocinas: IL-6 (Interleucina-6), TNF- α (Factor de necrosis tumoral-a), PAI-1(inhibidor del activador tisular del plasminógeno), reactantes de fase aguda (PCR) y fibrinógeno se relaciona con resistencia insulínica, disfunción endotelial y arterioesclerosis. (López *et al.*, 2010).

Patológicamente una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo puede dar lugar a numerosos trastornos en el buen funcionamiento de los diferentes sistemas, órganos y tejidos. Particularmente peligrosas complicaciones pueden ocurrir en los sistemas cardiovascular, respiratorio, endocrino y psicosociales. Se estima que el 80% de las enfermedades en el hombre son causados por problemas asociados con el exceso de peso corporal (Barczynska *et al.*, 2015)

Numerosas enfermedades se han asociado a la obesidad, entre las que destacan la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), la dislipidemia, la hipertensión, la enfermedad coronaria y cerebro-vascular, la colelitiasis, la osteoartritis y ciertos tipos de cáncer (Sanz ,Santacruz y Gauffin, 2010)

Las enfermedades crónicas han sido identificadas como uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, causan dolor y sufrimiento a los pacientes y sus familiares y han sido el principal gasto del sistema de salud. De hecho, alrededor del 75% del gasto sanitario se destina a las enfermedades crónicas (Okpala, 2014).

Las alteraciones asociadas a la obesidad se clasifican en: metabólicas (resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico, dislipidemia aterogénica, hiperuricemia), cardiovasculares (hipertension arterial, cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardiaca congestiva, trombosis periférica, hipercoagulabilidad), respiratorias (síndrome hipoventilacion/obesidad, síndrome de apnea obstructiva del sueño, asma), digestivas (coletitiasis, esteatosis hepatica, reflujo gastroesofágico) muscoesqueléticas (osteoartropatias, deformidades oseas) alteraciones de la mujer (disfunción menstrual, sindrome de ovario poliquistuco, infertilidad, incontinencia urinaria, riesgo perinatal), cáncer (Mujer: útero, mama, vesicula y ovario. Hombre: colon, recto y prostata.), otras alteraciones (insuficiencia venosa periferica, enfermedad tromboembolica, hipertensión endocrinal benigna, transtornos del

comportamiento alimentario, depresión, disminución de la autoestima y calidad de vida), (López *et al.*, 2010).

3.1.5 Microbiota intestinal.

El término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado (Ruiz *et al.,* 2010). Es una compleja y dinámica mezcla de microorganismos que excede el número total de células humanas por un factor de 10 (Sankar, Lagier, Pontarotti, Raoult y Fournier, 2015), pero también supera ampliamente el tamaño del genoma humano aproximadamente 150 veces (van Olden, Groen y Nieuwdorp, 2015). La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos residentes en el aparato digestivo (Icaza, 2013). Los organismos que componen la microbiota son determinados por los tipos de fuentes nutrimentales, las características de la dieta, el medio ambiente, la edad y los factores genéticos, que en conjunto influyen en el predominio de unos microorganismos sobre otros. Al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos se le denominan microbioma. (Icaza, 2013).

En cada individuo, la microbiota intestinal difiere cualitativa y cuantitativamente en función de su ubicación anatómica en el tracto digestivo. Por lo tanto, la microbiota intestinal es un ecosistema muy diverso, complejo y único para cada persona (Lastours y Fantin, 2015). Las firmas de la microbiota intestinal parecen ser altamente específicas para cada individuo, resultado de largas variaciones interindividuales que dependen de la genética del hospedero y factores ambientales (Sanz, Olivares, Moya y Agostoni, 2014). Cada individuo alberga un número similar de especies que son raras y que por lo tanto varían mucho entre la población; a esto se le conoce como "microbioma variable", el cual es modificado dependiendo de la dieta y la exposición ambiental (Derrien y van Hylckama, 2015).

La estructura, dinámicas y funciones de la microbiota intestinal son el resultado de las interacciones de factores ambientales y del hospedero, los cuales influyen conjuntamente en la comunicación entre el intestino y tejidos periféricos, contribuyendo así a la programación de salud y al riesgo de enfermedades (Sanz *et al.*, 2014). La ausencia de una microbiota intestinal estable contribuye a una alta susceptibilidad a infecciones intestinales (Derrien *et al.,* 2015) y estudios recientes sugieren papeles complejos de la microbiota intestinal en la obesidad, el síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias del intestino, patologías neurodegenerativas y en el

desarrollo de ciertas enfermedades psiquiátricas como la ansiedad y la depresión (Lastours *et al.*, 2015). A las alteraciones de la microbiota intestinal y la respuesta adversa del hospedero a estos cambios se le ha denominado disbiosis, la cual se ha asociado con afecciones tan disímiles como el asma, las enfermedades inflamatorias crónicas, la obesidad y la esteatohepatitis no alcohólica (Icaza, 2013).

El renacimiento en este campo ha sido en parte impulsado por los avances en la tecnología de secuenciación y también por la aplicación de una variedad de tecnologías ómicas (Marchesi, 2011). Las técnicas modernas de estudio de la microbiota nos han acercado al conocimiento de un número importante de bacterias que no son cultivables, y de la relación entre los microorganismos que nos habitan y nuestra homeostasis (Icaza, 2013).

Con más de 1000 especies microbianas identificadas hasta la fecha, la microbiota intestinal es la biota más compleja en los humanos (Sankar *et al.*, 2015). El ecosistema microbiano del intestino (microbiota intestinal) incluye muchas especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal, y una serie variable de microorganismos que solo lo hacen de manera transitoria (Icaza, 2013). Las bacterias nativas se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, pertenecen al género *Lactobacillus, Staphylococcus, Enterococcus, Escherichia, Enterobacter, Bifidobacterium, Bacteroides, Eubacterium y Clostridium*, mientras que las bacterias en tránsito se adquieren continuamente a través de los alimentos, bebidas u otras fuentes (Alvarez, Puig y Rodriguez, 2010).

Las técnicas modernas de estudio del material genético han revolucionado nuestro conocimiento del microbioma. Por ejemplo, la microbiota del colon tiene aproximadamente de 800 a 1.000 especies por individuo, pero el 62% de ellas no se conocían y el 80% de las bacterias identificadas por la metagenómica se consideran no cultivables. (Icaza, 2013).

En el año 2008 el número total de especies bacterianas del tracto gastrointestinal fue extendido a 40,000, número sujeto a variación y que puede ser mucho mayor según el desarrollo de investigaciones en curso por métodos de biología molecular y estudios de metagenómica (Alvarez *et al*., 2010).

3.1.6 Funciones de la microbiota intestinal

Varios estudios han implicado a la microbiota intestinal en el metabolismo, la digestión, la programación del sistema inmunológico y la influencia sobre el sistema nervioso central a través del eje microbioma-intestino-cerebro (Kanji *et al.,* 2017). La microbiota es capaz de secretar o alterar la producción de moléculas que afectan el equilibrio energético (aumento o pérdida de peso) y las reservas de energía (masa grasa) (Rosenbaum, Knight y Leibel, 2015). La microbiota del intestino humano contribuye con el 36 % de las moléculas pequeñas que se encuentran en la sangre. Como ejemplo se pueden mencionar los ácidos grasos de cadena corta, que proveen energía a las células epiteliales colónicas y participan en la síntesis de colesterol; los ácidos biliares, que colaboran en la absorción de lípidos y vitaminas liposolubles, y los metabolitos de la colina, que modulan la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico (Basain *et al.,* 2015). La microbiota intestinal humana colabora en funciones esenciales de la fisiología humana y se considera esencial para el mantenimiento de la salud humana (Greenhalgh *et al*., 2016). Tiene muchas funciones beneficiosas, algunas de las cuales son: la ayuda en la digestión (degradación de los azúcares complejos como la pectina y celulosa), estimula el desarrollo de las microvellosidades, la fermentación de la fibra dietética y los prebióticos que son beneficiosos para la síntesis de SCFA (ácido butírico, ácido propiónico y ácido acético) y ácido láctico (Barczynska *et al.*, 2015), producción de enzimas ausentes en los seres humanos para la digestión, síntesis de vitaminas como la biotina y la vitamina K, hormonas para dirigir el almacenamiento de grasas en el hospedero, previene la colonización por bacterias patógenas, regula las funciones del epitelio y el sistema inmune (Sankar *et al.,* 2015).

La microbiota intestinal juega un papel importante en la extracción de energía de los alimentos a través de una variedad de actividades enzimáticas. Varios polisacáridos vegetales y los carbohidratos complejos no son digeribles por el huésped; sin embargo, la microbiota del colon convierte con éxito estas sustancias dietéticas en monosacáridos y SCFA (Ojeda *et al.,* 2016). Los *Firmicutes* son los principales degradadores de la fibra alimentaria, la cual es muy importante en una dieta saludable y se puede definir como la parte comestible de las plantas que resiste la digestión y absorción en el intestino delgado humano y que experimenta una fermentación parcial o total en el intestino grueso. Ayuda en la saciedad, reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, promueve la motilidad intestinal y es una importante fuente de nutrientes para la microbiota intestinal (Berry, 2016).

La microbiota intestinal es necesaria para el metabolismo de azúcares, para la extracción de energía a partir de compuestos que el hospedero no puede metabolizar o absorber, y para la síntesis de aminoácidos y vitaminas (Biotina), además regula el almacenamiento de grasa. (López y Palacios, 2015). Puede desempeñar un papel beneficioso en el metabolismo de sustancias potencialmente dañinas tales como el colesterol, nitrosaminas, aminas heterocíclicas y ácidos biliares, también puede ser una fuente de antígenos y compuestos nocivos, e incluso patógenos (Barczynska *et al.*, 2015).

El ecosistema bacteriano (microbiota) que viven en nuestro intestino desempeña un papel fundamental en el funcionamiento normal de los sistemas metabólicos e inmunológicos, más allá de los determinantes genéticos (Narasimhan y Fikrig, 2015). En consecuencia, los desequilibrios en la flora intestinal (disbiosis) son un posible factor causal de enfermedades metabólicas y autoinmunes (Sanz *et al.,* 2014).

El humano ha co-evolucionado con el conjunto de especies de bacterias, denominado microbiota, de una forma compleja que afecta tanto la inmunidad innata como a la adaptativa (Alexander, Targan y Elson, 2014). El tracto gastrointestinal humano es un entorno en el que se produce la transferencia horizontal de genes (transformación, transducción y conjugación) que determinan la resistencia de las bacterias, lo que genera que las infecciones bacterianas sean cada vez más difíciles de tratar, debido a la resistencia a los antibióticos generalizada entre los agentes patógenos (Huddleston, 2014). La obesidad se asocia a menudo con la función inmune alterada, lo que puede conducir a una mayor susceptibilidad a las infecciones provocadas por diferentes patógenos. Por lo tanto, ciertos microorganismos parecen inducir la obesidad, mientras que, la obesidad en sí puede exacerbar otras ciertas infecciones. La conexión entre ambos fenómenos es propiedad inmunológica de los adipocitos y sus progenitores. (Hegde y Dhurandhar, 2013)

El conjunto genético microbiano combinado que se observa en estudios de metagenómica excede considerablemente la complejidad del mismo genoma humano, de forma tal que, en términos metabólicos, la interacción humano - microbiota intestinal se cataloga en la actualidad como supra o superorganismo el cual cumple con funciones biológicas que están revolucionando el enfoque de muchas enfermedades crónicas (Alvarez *et al*., 2010).

La microbiota varía ampliamente entre los individuos y tiene un profundo efecto en cómo uno reacciona a diversos estímulos ambientales, en particular si una persona está predispuestos genéticamente a un trastorno inflamatorio inmune (Alexander *et al.,* 2014). El sistema inmune en

mamíferos dispone de mecanismos innatos y adaptativos que protegen al individuo de patógenos ambientales. Los mecanismos innatos funcionan independientemente de exposiciones previas a agentes infecciosos e incluyen las barreras mecánicas (piel, epitelio de las mucosas) y componentes celulares (principalmente macrófagos y neutrófilos). En contraste con el sistema inmune innato, los elementos celulares (fundamentalmente linfocitos B y T) y moleculares del sistema adaptativo requieren del contacto previo con el agente invasor. Ambos mecanismos, actuando de manera concertada, conducen finalmente a la instauración de la memoria inmunológica; propiedad a través de la cual, después de contactar un antígeno por primera vez, el organismo adquiere la capacidad de responder mejor y más rápidamente ante la re-exposición al mismo antígeno (Alvarez *et al*., 2010).

La activación crónica del sistema inmune innato es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad y trastornos asociados; esta activación podría depender en parte de efectos inmunomoduladores ejercidos por compuestos de la dieta en el intestino y más allá (Sanz, Santacruz y Gauffin, 2010).

Debido a que la microbiota intestinal muestra cierta plasticidad, en particular en respuesta a la dieta, hace que sea posible desarrollar la intervención estrategias que promuevan un ecosistema - intestino sano para reducir el riesgo de enfermedades. En la actualidad pruebas científicas demuestran que la microbiota intestinal funciona como un órgano metabólico y es fundamental para nuestra supervivencia de tal forma que las alteraciones que se producen en este sistema tienen una relación directa con el eje cerebro–intestino y el estado de salud del individuo (Grenham, Clarke, Cryan y Dinan, 2011), estas alteraciones, podrían explicar, por lo menos en parte, algunas epidemias de la humanidad como la obesidad.

En la actualidad pruebas científicas demuestran que la microbiota intestinal funciona como un órgano metabólico y es fundamental para nuestra supervivencia de tal forma que las alteraciones que se producen en este sistema tienen una relación directa con el eje cerebro–intestino y el estado de salud del individuo (Grenham, Clarke, Cryan y Dinan, 2011), estas alteraciones, podrían explicar, por lo menos en parte, algunas epidemias de la humanidad como la obesidad. Los pocos estudios realizados hasta la fecha han mostrado que los tratamientos de pérdida de peso pueden cambiar la microbiota intestinal, ya que hay una disminución en la proporción de *Firmicutes a Bacteroidetes*. El tratar los desbalances de la microbiota intestinal puede ofrecer nuevas posibilidades para el tratamiento de la obesidad (López *et al*., 2015).

3.1.7 Obesidad y composición de la microbiota intestinal

La composición de la microbiota intestinal, afecta la absorción de nutrientes y la regulación de la energía, por lo que influyen directamente en el desarrollo de la obesidad**,** proporciona el 10% de las necesidades calóricas diarias y está involucrada en el metabolismo de nutrientes esenciales como los carbohidratos y los lípidos (McKenzie *et al.*, 2017). El modelo de las bacterias intestinales atribuye la obesidad a la composición variable de la microbiota intestinal y su capacidad para modular la homeostasis de la energía del huésped, la adiposidad y la inflamación (White, 2016). La composición de la microbiota intestinal varía a lo largo de la vida y la geografía humana (Greenhalgh *et al.,* 2016), es una comunidad grande y diversa que contiene varios tipos de vida: bacterias, arqueas, eucariotas, virus y parásitos. El número total de células microbianas en el tracto intestinal es alrededor de 10^{13}-10^{14}. Se ha estimado que más de 1000 especies bacterianas habitan en el tracto intestinal humano. (Li *et al.,* 2016). Las aberraciones en la microbiota intestinal están fuertemente asociados con la obesidad (Tai *et al.,* 2015). Investigaciones recientes muestran que la microbiota intestinal está involucrada en la obesidad y trastornos metabólicos, revelando que los animales y humanos obesos tienen alteraciones en la composición de la microbiota intestinal en comparación con sus homólogos delgados (Sanz *et al*., 2010).

La microbiota intestinal contiene la gran mayoría de la biomasa microbiana y puede analizarse con relativa facilidad por recolección de material fecal (Greenhalgh *et al.,* 2016). El uso de muestras fecales recogidas al inicio de los estudios puede ayudar a identificar las cepas bacterianas intestinales específicas que conducen a un metabolismo aberrante (van Olden *et al.,* 2015).

La microbiota intestinal, como un todo, proporciona funciones metabólicas adicionales y regula la expresión de genes del huésped, mejorando la capacidad de extraer energía de la dieta y almacenar esta energía en los adipocitos, contribuyendo al aumento de peso corporal (Sanz *et al.*, 2010).

La microbiota intestinal puede proporcionar energía al hospedero mediante la hidrólisis de polisacáridos sin digerir de los vegetales (celulosa, xilano y pectina) y del almidón parcialmente digerido que el anfitrión consume diariamente (Tai *et al.,* 2015).

Alrededor del 50% de la masa fecal está constituida por bacterias. Esta población se compone de trillones de microorganismos pertenecientes, fundamentalmente, a 4 filos: *Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria*, con un amplio predomino de los dos primeros (Icaza, 2013). Los filos de *Firmicutes y Bacteroidetes* representan más del 90% de la población total de la microbiota intestinal. Los géneros dominantes son anaerobios obligados como:

Bacteroides, Eubacterium, Clostridium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus, Bifidobacterium y Fusobacterium, así como anaerobios facultativos: *Escherichia, Enterobacter, Enterococcus, Klebsiella, Proteus, Lactobacillus* (Barczynska *et al.,* 2015).

La obesidad se asocia con filos y cambios grupo-específicos en la microbiota, a una reducida diversidad bacteriana y a aumentos en la abundancia relativa de *Firmicutes* y la reducción de *Bacteroidetes* (Sanz *et al.*, 2010). *Bacteroides y Ruminococcus spp.* son abundantes en sujetos con una baja diversidad microbiana y disfunción metabólica, mientras que *Faecalibacterium prausnitzii, Bifidobacterium, Lactobacillus, Alistipes, Akkermansia,* entre otros, fueron dominantes en sujetos con una alta diversidad bacteriana y fenotipos metabólicos saludables (Sanz, *et al*, 2014). Ademas la obesidad también se ha asociado con la reducción de *Akkermansia muciniphila (Filo: Verrucomicrobia)* en el intestino. *Akkermansia. muciniphila* disminuye la inflamación crónica de la barrera intestinal y la secreción de péptidos intestinales (van Olden *et al.,* 2015).

La composición de la microbiota intestinal, y su efecto en la reducción o aumento del desarrollo de la obesidad está estrechamente correlacionada con la dieta consumida (Figura 3) (Barczynska *et al.,* 2015). Las comunidades bacterianas presentan variaciones cuantitativas y cualitativas a lo largo del tracto intestinal debido a factores del hospedero (pH, tiempo de tránsito, ácidos biliares, enzimas digestivas, mucosas, sistema inmunológico), a factores no-hospedero (nutrientes, medicación y los factores ambientales) y factores bacterianos (capacidad de adhesión, enzimas, capacidad metabólica, así como coevolución, interacciones y competencia microbiana) (Sankar *et al.*, 2015). Estudios en humanos mostraron que el pH del jugo gástrico influye en el crecimiento de las bacterias en el estómago e intestino, afectando la calidad y cantidad de la microbiota intestinal (Tai *et al.*, 2015).

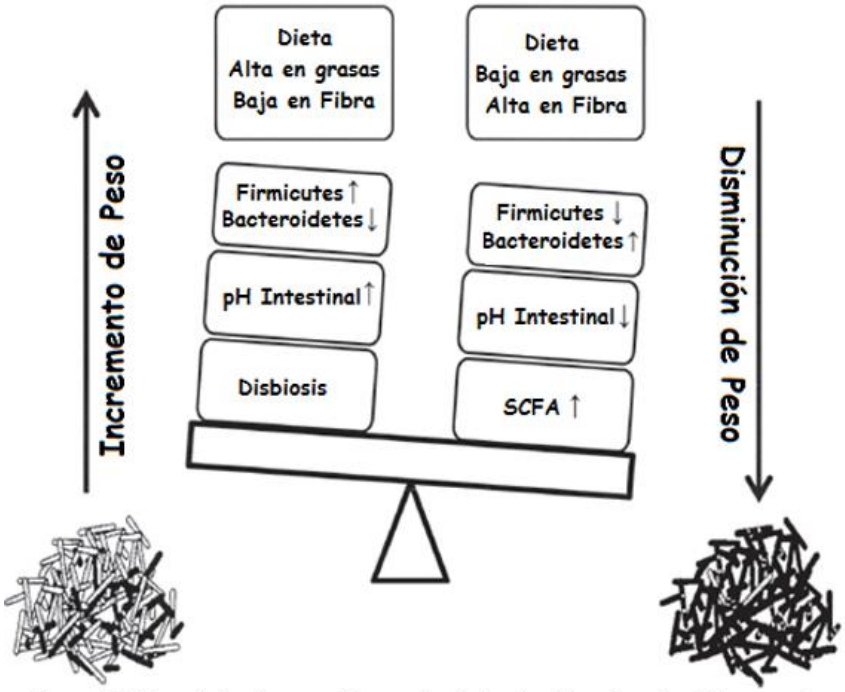

Figura 3. Efecto de la dieta en el desarrollo de la microbiota intestinal (Barczynska *et al.*, 2015, p.96).

3.1.8 Papel de la microbiota intestinal en la función neurohormonal

Las poblaciones bacterianas en el intestino humano impactan funciones fisiológicas del huésped a través de su actividad metabólica. Además de realizar funciones catabólicas y bio-transformativas esenciales, la microbiota intestinal produce moléculas pequeñas bioactivas que median las interacciones con el huésped y contribuyen a los ejes neurohumorales que conectan el intestino con otras partes del cuerpo (Krishnan, Alden y Lee, 2015). La microbiota intestinal también interactua con la producción y la función de las hormonas y neuropéptidos sintetizados por el sistema nervioso y las células enteroendocrinas de la mucosa del tracto gastrointestinal y órganos periféricos (tejido adiposo, páncreas e hígado), los cuales son críticos para la regulación del balance energético. Sujetos obesos suelen presentar un aumento de los niveles séricos de leptina asociados con el incremento del hambre y un gasto energético reducido. El aumento de los niveles de leptina también podría inducir la producción células pro-inflamatorias T-cooperadoras y a su vez de citosinas tipo-1 y así contribuir a la inflamación asociada con la obesidad (Sanz *et al.*, 2010).

La leptina es una hormona secretada principalmente por los adipocitos, que tiene un papel relevante en la regulación del peso corporal a través de sus efectos centrales sobre el apetito, y periféricos sobre el gasto energético. El primer efecto descrito para la leptina fue en relación con la modulación

del apetito y el gasto energético. Sin embargo, en los últimos años también se le han descrito otros efectos atribuibles a esta hormona, como la estimulación de la lipólisis, la inhibición de la secreción de insulina por las células beta pancreáticas, la inhibición de la génesis de esteroides inducida por insulina en el ovario y una acción inmunomoduladora (Basain *et al.*, 2016).

Los SCFA que son producido principalmente por la microbiota intestinal, actúan como ligandos de receptores acoplados a proteínas G, tales como GPR41 y GPR43, expresados en el intestino, colon y adipocitos, que tras su activación estimulan la expresión de hormonas peptídicas (por ejemplo, leptina y péptido tirosina-tirosina) que participan en la regulación del apetito y metabolismo de la energía (regulando el metabolismo de la grasa, aumentando su quema y disminuyendo su almacenamiento) (Sanz *et al.*, 2010). Los SCFA están formados por la fermentación de los polisacáridos no digeribles en el intestino grueso por grupos específicos de bacterias; tienen numerosas funciones positivas y éstas incluyen: al ácido butírico que estimula el tejido epitelial intestinal, nutre las células intestinales e influye en su adecuada maduración y diferenciación; el ácido propiónico tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de hepatocitos; el ácido acético tiene un efecto positivo en el desarrollo de los tejidos periféricos (Barczynska *et al.*, 2015). El propionato y el butirato tienen la capacidad de activar la gluconeogénesis intestinal (IGN). El Butirato puede aumentar la IGN directamente a través de un aumento del Adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El propionato, por el contrario, aumenta la IGN vía cerebro-intestino a través de circuitos neuronales incluyendo señalizaciones GPR41 a través de neuronas ganglionares simpáticas. El incremento de la IGN conduce a un aumento de la concentración glucosa en la vena porta, lo que resulta en disminución de hambre y la ingesta de alimentos (van Olden *et al.*, 2015).

La microbiota intestinal modula la activación del tejido adiposo marrón, estimula la lipólisis e inhibe la lipogénesis. Estos resultados concuerdan con los datos que muestran que el butirato puede prevenir la acumulación de grasa en el hígado y la posterior resistencia a la insulina en ratones. El mecanismo de acción del butirato puede estar relacionado con la promoción del gasto energético y la inducción de desacoplamiento mitocondrial (van Olden *et al.*, 2015).

Los ácidos grasos de cadena corta regulan la glucosa y el metabolismo lipídico, estimulan la proliferación y diferenciación de los enterocitos intestinales, disminuye el efecto del pH sobre el contenido intestinal, y por lo tanto ayudar en la absorción de minerales mediante el aumento de su solubilidad. A pesar del uso SCFA como fuente de energía, contribuye a la reducción de la formación de la obesidad mediante la inhibición de la acumulación de grasa en el tejido adiposo,

generando un mayor gasto de energía y el aumento de la producción de hormonas asociadas con la sensación de saciedad (Barczynska *et al.*, 2015).

3.1.9 Papel de la microbiota intestinal en la función inmune

Es probable que el principal papel de las bacterias intestinales se base en la regulación y la formación de nuestro sistema inmune (innato y adaptativo) y, vía esta ruta, afecten nuestro metabolismo (van Olden *et al.*, 2015). La microbiota intestinal puede modular las respuestas inmunes en la superficie de la mucosa intestinal durante la infección, la inflamación y la autoinmunidad (Kanji *et al.*, 2017). La obesidad inducida por dietas ricas en grasas y los trastornos metabólicos asociados se caracterizan por un estado de inflamación de bajo grado que se ha relacionado con alteraciones en la composición de la microbiota intestinal y el aumento plasmático de los niveles de lipopolisacárido (LPS), el cual es el componente antigénico más potente de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Las grasas de la dieta conducen a un aumento en la absorción y excreción de los LPS de las células intestinales / epiteliales a través del aumento en la inducción de quilomicrones y a la ruptura de la integridad de la barrera intestinal que conduce a una permeabilidad intestinal anormal (Radilla *et al.*, 2016). Los LPS tienen una afinidad por los quilomicrones y parecen ser co-transportados junto con otras grasas de la dieta (van Olden *et al.*, 2015). Una vez que los LPS llegan a la circulación sanguínea, causan endotoxemia metabólica, lo que activa los macrófagos en los diferentes tejidos, lo que lleva a una inflamación de bajo nivel que es parte de las alteraciones metabólicas que ocurren en la obesidad (Radilla *et al.*, 2016). Un estudio prospectivo mostró recientemente que la endotoxemia es un predictor del desarrollo del síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 en personas obesas (van Olden *et al.*, 2015). En humanos, el aumento de los niveles plasmáticos de LPS se ha asociado con un elevado índice de masa corporal. Este aumento en las concentraciones de LPS es suficiente para activar la síntesis de citosinas inflamatorias (por ejemplo, TNFa) (Sanz *et al.*, 2010).

Dietas obesogénicas pueden promover el crecimiento potencial de patógenos, lo que podría desencadenar una respuesta inflamatoria a través de la activación local de los receptores de inmunidad innata (por ejemplo, TLR4, TLR2) con la producción de citocinas proinflamatorias o por medio de la producción de compuestos tóxicos (por ejemplo, sulfuro de hidrógeno). Ambos mecanismos también podrían conducir a un intestino permeable, la translocación de moléculas microbianas, y en general, promover la inflamación sistémica. Además, los ácidos grasos saturados

de dietas obesogénicas podrían favorecer un intestino permeable mediante la inducción de la expresión y la activación de los receptores de inmunidad innata (Receptores tipo Toll (TLR)) y el aumento de flujo y proliferación de linfocitos; por completo esto puede conducir a la producción de citocinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral-alfa, interferón-gamma) que aumentan la permeabilidad intestinal, facilitando la translocación de los productos bacterianos, independientemente de posibles alteraciones en la composición de la microbiota intestinal (Sanz *et al.*, 2014).

El factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) es una molécula adaptadora central para la mayoría de TLR´s, los cuales son los receptores de reconocimiento a patógenos más estudiados. La evidencia indica que el MyD88 juega un papel importante en la composición del microbioma, la homeostasis de energía y las interacciones con bacterias intestinales Gram negativas. Además, puede funcionar como un sensor que regula el metabolismo del hospedero a través del gasto de energía y los SCFA (van Olden *et al.*, 2015).

Muchas enfermedades autoinmunes demuestran un sesgo de género, las mujeres son más susceptibles a la autoinmunidad que los hombres. Las hormonas sexuales se consideran un factor crítico en la autoinmunidad del sesgo de género, así como la actividad protectora de los andrógenos. Sin embargo, este sesgo de género también es sensible a las influencias ambientales. (Tai *et al.*, 2015)

La fosfatasa alcalina intestinal (IAP), la cual puede ser controlada por la microbiota intestinal, representa un papel importante en el desarrollo de la obesidad, ya que está implicada en la degradación de los lípidos derivados de los alimentos, y también juega un papel importante en la detoxificación del LPS (desfosforilación de la parte lipídica del LPS). Además, el aumento de actividad de la IAP está asociada con la reducción de la endotoxemia causada por disfunciones metabólicas (Barczynska *et al.*, 2015).

Otro factor potencial que relaciona a la microbiota intestinal con la obesidad es el bloqueo de la expresión del factor adiposo inducido por ayuno (FIAF) por la microbiota. El FIAF inhibe la actividad de la lipoproteinlipasa (LPL), una enzima responsable del almacenamiento de energía en forma de grasa. La disminución de la expresión de FIAF determina el aumento de la actividad LPL y mejora el proceso de almacenamiento de energía en forma de grasa (Barczynska *et al.*, 2015).

Un bajo nivel de la inflamación crónica es una de las principales características de la obesidad. Factores como el excedente de energía, dieta rica en grasas y los factores ambientales también

pueden desempeñar un importante papel en la regulación de la obesidad, además de un desequilibrio entre las influencias pro y anti-inflamatorias (Tai *et al.,* 2015).

3.1.10 Microbiota y factores ambientales

Estudios recientes muestran que la microbiota intestinal humana es dinámica durante toda la vida y que las diferencias específicas por edad pueden ser la clave para la comprensión de los efectos de la microbiota sobre la salud. Los cambios de la microbiota durante la vida se deben a influencias de la biogeografía, la dieta, genética del hospedero y a factores ambientales (Greenhalgh *et al.,* 2016). Se entiende como factores ambientales al conjunto de factores externos al individuo que lo afectan durante su vida. La colonización del intestino por microorganismos está influenciada, en la infancia, por la forma del parto (los bebés nacidos por vía vaginal adquieren comunidades bacterianas similares a la microbiota vaginal de su madre, mientras que los lactantes nacidos por cesárea albergan comunidades bacterianas más parecidas a la microbiota cutánea de su madre (Li *et al.,* 2016)) y la dieta (lactancia materna o no); estabilizándose a la edad de tres años (Sankar *et al.,* 2015). Después de los tres primeros años de vida, la estructura general de la microbiota es relativamente consistente a lo largo de la vida adulta sana (Xu, Galley, Bailey, Thomas y Olivo, 2016), hasta llegar a la vejez donde el microbioma intestinal se enriquece en rasgos asociados con la inflamación y la disfunción metabólica (Greenhalgh *et al.,* 2016). Aparte de los cambios asociados con la edad, la microbiota intestinal dependerá de otros factores incluyendo la ubicación geográfica, por ejemplo, entre las zonas rurales y urbanas, puede ser atribuible a las variaciones de hábitos dietéticos u otras influencias ambientales (aunque la globalización de los productos alimenticios tiende a reducir el impacto de este factor), la dieta (composición de la dieta, la densidad energética de los alimentos, la tasa de consumo de comida, las preferencias de sabor, el estilo de vida, la disponibilidad y accesibilidad a los alimentos (Basain *et al.,* 2015)), el sexo, la actividad física, la genética del hospedero y el consumo de prebióticos, probióticos y/o antibióticos. La composición de la microbiota intestinal ha demostrado tener un impacto directo en la salud humana, lo que resulta en efectos beneficiosos o adversos (Sankar *et al.,* 2015).

Las intervenciones dietéticas pueden influir en la composición de la microbiota intestinal, el consumo de una dieta rica en proteínas con alto aumenta los niveles de *Bacteroides* frente a *Prevotella*, que es más abundante después de dietas altas en carbohidratos. Además, el consumo de dietas altas en frutas, hortalizas y fibra está vinculado al aumento de la riqueza microbiana, ya

sea a nivel taxonómico o de genes. El microbioma intestinal puede incluso responder a las modificaciones a corto plazo del contenido de macronutrientes en la dieta, aunque rápidamente regresa a la composición basal después de la intervención cesa (Haro *et al.,* 2016)

3.1.11 Prebioticos y Probioticos

Los métodos principales utilizados para modular la microbiota intestinal incluyen el uso de prebióticos y probióticos (Ojeda *et al.,* 2016), los cuales contrarrestan los efectos negativos de la microbiota intestinal alterada en la energía homeostasis, la adiposidad y la inflamación (White, 2016). Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del hospedero (Simeoni *et al.,* 2016). Las bacterias frecuentemente utilizadas como probióticos son las familias Gram positivas *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Las *Bifidobacterias* y los *Lactobacilos* son dos de los mayores generos de bacterias saprofitas de la flora intestinal (Ishibashi, Yaeshima y Hayasawa, 1997) y no poseen cadenas lipopolisacáridas proinflamatorias, por lo que su propagación en el intestino no desencadena reacciones inmunológicas completas. Con la presencia de tales bacterias, el sistema inmunológico aprende a distinguir entre las entidades anti-inflamatorias y desarrolla respuestas inmunógenas apropiadas identificando elementos proinflamatorios como antigénicos (Sarkar *et al.,* 2016) , son utilizados contra inflamaciones gastrointestinales, infecciones y afecciones alérgicas (Simeoni *et al.,* 2016). Varios estudios informaron que la intervención dietética con yogures que contienen probióticos reduce significativamente el colesterol sérico total y el colesterol LDL, mejorando la relación colesterol LDL: HDL. (Kobyliak *et al.,* 2016).

Además de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*., recientemente se ha prestado atención a *Akkermansia muciniphila,* la cual es una bacteria degradadora de mucina que reside en las capas mucosas del intestino y es capaz de producir acetato y propionato (Cani, Everard y Duparc, 2013). Se ha observado que la abundancia de *A. muciniphila* disminuye en la obesidad y la DM2 (Everard *et al.,* 2013). La administracion de *A. muciniphila* mejora la función de la barrera intestinal, incrementa los niveles de serotonina, contrarresta el desarrollo de obesidad producido por dietas altas en grasa reduciendo la resistencia a la insulina, la endotoxemia y la dislipidemia (Everard *et al.,* 2013).

Los prebióticos se definen como componentes alimentarios que cuando se fermentan en el intestino confieren un beneficio de a la salud del hospedero asociado con la modulación de la microbiota (Sarkar *et al.,* 2016 y Simeoni *et al.,* 2016). La mayoría de investigaciones de prebióticos se han

hecho con fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS) en el contexto de trastornos gastrointestinales y las enfermedades alérgicas (Simeoni *et al.,* 2016). Los prebióticos son compuestos que producen cambios específicos en la composición o actividad bacteriana (Sarkar *et al.,* 2016). Los mecanismos encontrados para apoyar la acción beneficiosa de los prebióticos incluyen (1) el aumento de la expresión de péptidos antimicrobianos; (2) la producción de SCFA, la estimulación de la gluconeogénesis intestinal (IGN) y el aumento de la integridad epitelial; (3) liberación aumentada de hormonas peptídicas intestinales incluyendo PYY y GLP-1 para promover la saciedad y la sensibilidad a la insulina, respectivamente; y (4) comunidades microbianas reestructuradas incluyendo disminución de la abundancia relativa de bacterias patógenas y aumento de la abundancia de bacterias comensales beneficiosas (Ojeda *et al.,* 2016).

3.1.12 Psicobióticos

Los Psicobióticos se definen como probióticos (bacterias vivas) y prebióticos (mejoran el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas) que, cuando se ingieren, confieren beneficios a la salud mental a través de interacciones con bacterias intestinales comensales. (Sarkar *et al.,* 2016). Los efectos psicofisiológicos de los psicobióticos se dividen en las tres categorías: (1) Efectos psicológicos en los procesos cognitivos y emocionales, (2) Efectos sistémicos sobre el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y la respuesta al estrés glucocorticoide e inflamación, que a menudo se caracteriza por concentraciones aberrantes de citocinas. (3) Efectos neurológicos sobre neurotransmisores y proteínas. Los neurotransmisores relevantes incluyen el ácido g-aminobutírico (GABA) (principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso) y el glutamato (principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central), que controlan el equilibrio de inhibición de la excitación neuronal (Sarkar *et al.,* 2016). Varias especies de bacterias encontradas dentro del microbioma del intestino son capaces de sintetizar y liberar una serie de neurotransmisores y neuromoduladores que pueden actuar sobre las células entéricas endocrinas. Las especies de *Lactobacillus y Bifidobacterium* pueden producir ácido gamma-aminobutírico (GABA); *Escherichia, Bacillus y Saccharomyces* pueden producir norepinefrina; *Candida, Streptococcus y Escherichia* puede producir serotonina. Tales neurotransmisores pueden estimular las células entéricas y modular la comunicación entérico-neural (Kanji *et al.,* 2017). En general, los psicobióticos pueden ejercer efectos beneficiosos en el estado de ánimo mediante la modulación de las redes neuronales asociadas con la atención emocional. A nivel sistémico, las reducciones en

el cortisol y las citoquinas proinflamatorias apoyarían estos procesos, dada su relación con el estado de ánimo negativo (Sarkar *et al.*, 2016).

3.1.13 Salud Ambiental

De acuerdo con la OMS (2017), la salud se define como "un estado de completo bienestar físico, mental y social y no sólo ausencia de enfermedad o incapacidad. Se ha difundido ampliamente pero poco comprendido que la salud no sólo es, no estar enfermo; el aspecto médico es sólo una dimensión de la salud, hay factores como la geografía, clima, trabajo, ingreso, alimentación, educación, vivienda, valores éticos junto con el desarrollo pleno de las capacidades y potencialidades de cada individuo, en sus aspectos físicos, fisiológicos, psicológicos, sociales entre otros que en conjunto dan la condición de bienestar (o felicidad) que al fin de cuentas es lo que debemos llamar salud. La salud no puede separarse de una serie de elementos ambientales, como el aire, agua, hacinamiento urbano, productos químicos, vectores de enfermedades, exceso de consumo, etc. (Cuéllar, 2008).

Victoriano Garza define a la salud ambiental como: "La parte de las ciencias ambientales que se ocupa de los riesgos y efectos que para la salud humana representan el medio que habita y donde trabaja, los cambios naturales o artificiales que ese lugar manifiesta y la contaminación producida por el mismo hombre a ese medio". La salud ambiental es holística y totalizante, engloba tanto los aspectos de salubridad pública, ocupacional, comunitaria, asistencial en un conjunto armónico en beneficio de todos los seres vivos y su entorno, teniendo en cuenta especialmente las vulnerabilidades sociales como la pobreza, la violencia, la nutrición adecuada, el empleo adecuado, las diferencias interculturales y el pensamiento tradicional y un sinnúmero de causas sociales, que influyen de manera determinante sobre el estado de salud individual y social (Cuéllar, 2008).

IV. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

4.1 Pregunta de Investigación

¿Cuál es la influencia de los factores ambientales sobre el papel de los microorganismos: *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en la microbiota intestinal y el desarrollo de la obesidad?

V. HIPÓTESIS

Factores ambientales como dieta y actividad física alteran la composición de los microorganismos: *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en la microbiota intestinal de las personas e influyen en la capacidad de absorción de los alimentos en el intestino y el consecuente incremento de peso.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

- Determinar qué factores ambientales modifican la composición de los microorganismos *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en la microbiota intestinal y como esto contribuye a la obesidad de las personas.

6.2 Objetivos Específicos

1. Determinar cuáles son los principales factores ambientales: dieta, actividad física, sedentarismo, hábitos y nivel socioeconómico que modifican la microbiota intestinal en poblaciones humanas obesas y no obesas.
2. Determinar las diferencias entre la microbiota intestinal de personas obesas, personas con peso normal y atletas.
3. Identificar la influencia de los microorganismos: *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp, Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en el desarrollo de la obesidad.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Generalidades

El presente trabajo de investigación se llevó acabo en las instalaciones del laboratorio de Micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en el periodo comprendido entre el mes de junio de 2016 al mes de junio de 2017.

7.2 Muestra

En la investigación participaron treinta personas; diecinueve personas viven en la ciudad de Puebla, cinco personas viven en el municipio de San Gregorio Atzompa, tres personas viven en el municipio de San Andrés Cholula, dos personas viven en el municipio de San Pedro Cholula y una persona vive en el municipio de Cuautlancingo. De las treinta personas que participaron en el estudio, se formaron tres grupos con diez personas cada uno; el primer grupo constó de diez personas que padecen obesidad (O), el segundo grupo de diez personas que son atletas y practicantes de triatlón (Atletas) y el tercer grupo de diez personas con peso normal (P.N) y que fueron el grupo control.

Este estudio se dividió en las siguientes fases: fase de campo, fase de laboratorio y fase de gabinete (Figura 4).

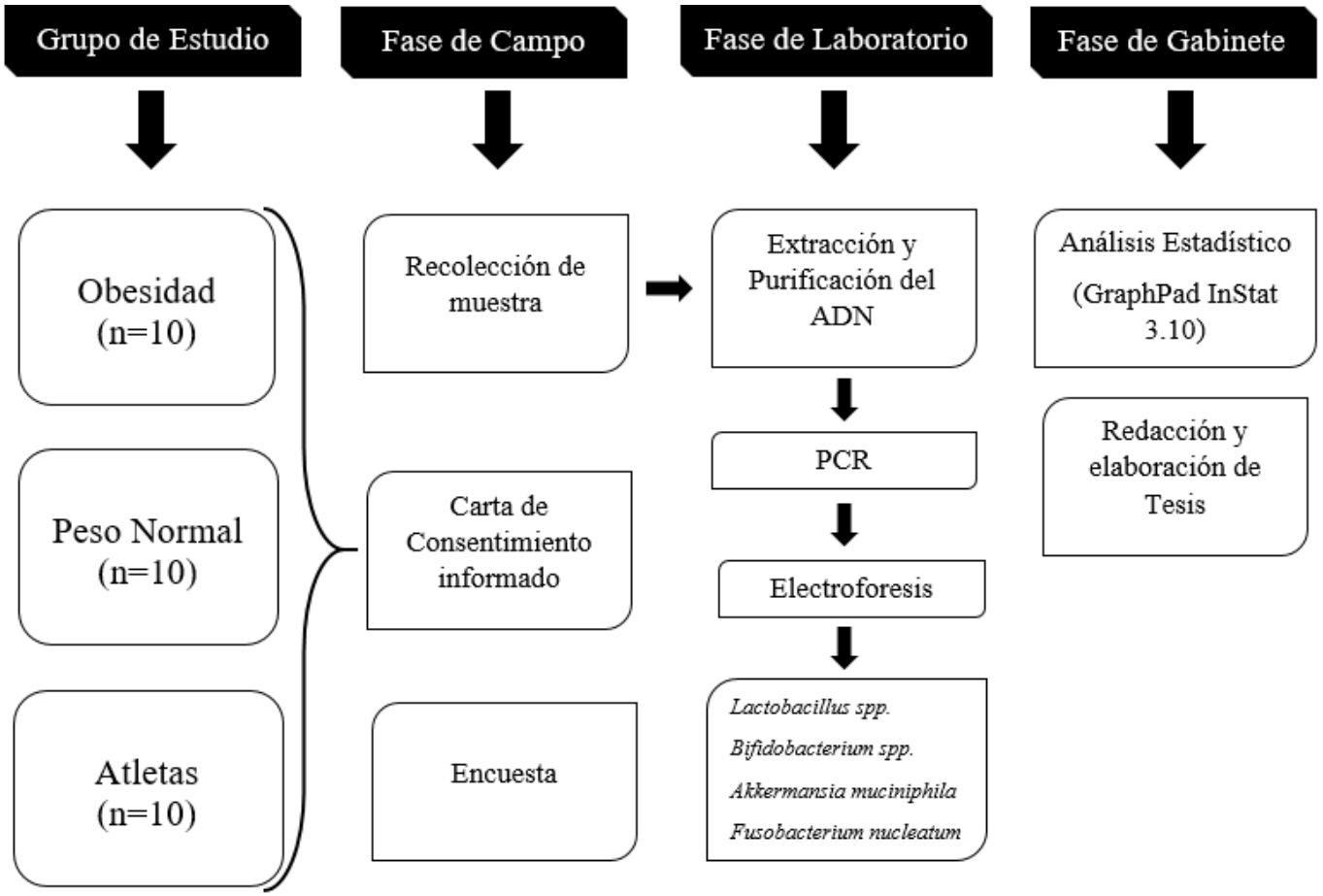

Figura 4. Esquema de actividades

7.3 Fase de campo

La fase de campo inició con una entrevista en el domicilio de las personas que participaron en el estudio, donde se les invito a formar parte de este y se les dio toda la información necesaria, además de explicarles cómo se llevaría a cabo la investigación y con qué finalidad. A cada persona que aceptó participar en el estudio, se le entregó una carta de consentimiento informado (Ver anexo 12.2), el cual fue un requisito indispensable para solicitar su autorización al proyecto de investigación.

Durante la entrevista se les aplicó una encuesta a todas las personas que participaron en la investigación, para obtener datos referentes a su dieta, actividad física, sedentarismo, hábitos y nivel socioeconómico. Para su elaboración fue tomada como base una encuesta de la OMS sobre hábitos, salud y obesidad. Se construyó a los fines de la presente investigación con el objetivo de investigar los factores ambientales que puedan predisponer a la obesidad de las personas. La encuesta consta de un cuestionario con cinco apartados (Datos de interés, Antecedentes familiares, Dieta, Actividad Física y Hábitos) (Ver anexo 12.1) que indagan sobre los factores ambientales que pueden favorecer al desarrollo de la obesidad.

Además de firmar la carta de consentimiento informado y responder a la encuesta, todos los participantes proporcionaron una muestra de materia fecal, para su posterior análisis en el laboratorio. Para que los resultados fueran confiables, las muestras de materia fecal fueron tomadas con las siguientes precauciones:

1. Se le proporciono a cada participante del estudio un recipiente para la recolección de muestras de laboratorio; estéril, con boca ancha y cierre hermético.
2. Se le brindó la información necesaria a cada paciente, para la correcta recolección de las heces y evitar su contaminación con orina.
3. Se recogieron las heces con una paleta de madera del recipiente donde fueron emitidas (evitando recoger las que están en contacto directo con el recipiente) y fueron transferidas en la cantidad necesaria (no mayor a 5 gramos) al recipiente de recolección.
4. Al recolectar las muestras se rotularon perfectamente todos los recipientes con: el nombre del paciente, edad, fecha y hora en que se tomó la muestra.

5. Los frascos fueron transportados de la casa de los pacientes a el laboratorio en condiciones de refrigeración (Hielera) para evitar la proliferación o muerte de los microorganismos y la conservación del material genético.

7.4 Fase de laboratorio

La materia fecal se almacenó a -70°C, para la posterior extracción y purificación del material genético. La aplicación de técnicas moleculares comenzó con la extracción de DNA, la cual consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de DNA, se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante Zymo-Research en el kit de extracción Quick-DNA con el fin de garantizar la obtención de DNA íntegro y puro. Los kits de extracción contienen dos ingredientes fundamentales: un detergente especialmente diseñado para lisar la membrana celular y nuclear de la muestra y la proteinasa K la cual degrada una proteína llamada histona, que envuelve al DNA.

7.4.1 Extracción y Purificación del DNA

Se llevó a cabo la extracción del DNA de las 30 muestras con el kit Quick-DNA Universal Kit de la marca Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante para el protocolo de extracción en tejidos solidos (Materia fecal):

I. Colocar 25mg de la muestra fecal en un tubo para microcentrífuga y añadir 95 µl de agua 95 µl de Buffer para tejido sólido y 10 µl de Proteinasa K.
II. Agitar en Vórtex y después incubar a 55°C de 1-3 Horas hasta que el tejido solubilice. Se agita nuevamente y se centrifuga a 12,000 rpm por 1 minuto. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
III. Añadir 400 µl del Buffer de unión genómica al sobrenadante y mezclar.
IV. Transferir la mezcla a una columna de extracción Zymo-Spin y se coloca en un tubo colector y centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto. Descartar el tubo colector.
V. Añadir 400 µl del Buffer de pre-lavado a la columna en un nuevo tubo colector y centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto. Vaciar el tubo colector.
VI. Añadir 700 µl del Buffer de lavado a la columna y centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto. Vaciar el tubo colector.

VII. Añadir 200 µl del Buffer de lavado a la columna y centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto. Descartar el tubo colector.

VIII. Para eluir el DNA, se transfiere la columna de extracción a un tubo para microcentrífuga limpio y se añade 50 µl del Buffer de elución, se incuba por 5 minutos a 60°C y después se centrifuga a 12,000 rpm por 1 minuto. La solución recogida será el DNA purificado.

IX. Se almacena la muestra a -70°C, para su conservación. y la posterior realización de la PCR.

7.4.2 Iniciadores para PCR y Secuenciación

Se utilizaron las extracciones de DNA de las treinta personas participantes del estudio para amplificar por PCR un fragmento del rRNA 16S, mediante oligonucleótidos específicos para cada género y especie de bacteria (Tabla 4), descritos en trabajos previos (Castellarin, *et al*, 2012; Collado, *et al*, 2007; Dingemanse, *et al*, 2015 Hyuk-Sang, *et al*, 2004; Penders, *et al*, 2005).

Tabla 4.
Iniciadores utilizados en el estudio

Bacteria Objetivo	Iniciador	Secuencia (5´- 3´)	Producto (bp)
Lactobacillus spp . (a)	Sentido	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCA	-
	Antisentido	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC	
Lactobacillus rhamnosus (a)	IDL73R	GCCAACAAGCTATGTGTTCGCTTGC	448
Lactobacillus plantaru (a)	IDL62R	CTAGTGGTAACAGTTGATTAAAACTGC	428
Bifidobacterium spp. (b)	Sentido	GCGTGCTTAACACATGCAAGTC	-
	Antisentido	CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	
Akkermansia muciniphila (c)	Sentido	CAGCACGTGAGGTGGGGAC	327
	Antisentido	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	
Fusobacterium nucleatum (d)	Sentido	CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA	-
	Antisentido	GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC	

Fuente: a) (Hyuk-Sang et al., 2004), b) (Penders et al., 2005), c) (Collado et al., 2007; Dingemanse et al., 2015), d) (Castellarin et al., 2012)

La amplificación se realizó en un termociclador TECHNE TC-412 de punto final, utilizando el kit DreamTaq PCR Master Mix (2X) de la marca thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante descritas a continuación.

I. Por cada muestra de DNA, colocar en un tubo para PCR: 25µl de DreamTaq PCR Master Mix (2X), 0.2 µl del Forward Primer, 0.2 µl del Reward Primer, 4 µl de DNA y 20.6 µl de agua libre de nucleasas. (Volumen Total 50µl).

II. Agitar el tubo de PCR con la mezcla en Vortex.

III. Realizar la PCR utilizando el ciclo térmico recomendado para cada microorganismo, según lo descrito en otros estudios (Tabla 5).

Tabla 5.
Condiciones de PCR utilizadas en el estudio

Condiciones	***Lactobacillus spp.*** [(a)]	***Lactobacillus rhamnosus*** [(a)]	***Lactobacillus plantarum*** [(a)]
Desnaturalización Inicial	95°C/5min	95°C/5min	95°C/5min
Ciclos	35	35	35
Desnaturalización	95°C/30s	95°C/30s	95°C/20s
Alineación	62°C/45s	62°C/45s	60°C/2min
Extensión	72°C/1min	72°C/1min	-
Extensión Final	72°C/10min	72°C/10min	72°C/10min
Condiciones	***Bifidobacterium spp.*** [(b)]	***Akkermansia muciniphila*** [(c)]	***Fusobacterium nucleatum*** [(d)]
Desnaturalización Inicial	96°C/2min	95°C/5min	94°C/2min
Ciclos	35	40	30
Desnaturalización	94°C/30s	95°C/15s	94°C/30s
Alineación	63°C/40s	60°C/40s	67°C/30s
Extensión	72°C/30s	72°C/30s	72°C/30s
Extensión Final	72°C/5min	72°C/5min	72°C/5min

Fuente: a) (Hyuk-Sang et al., 2004), b) (Penders et al., 2005), c) (Collado et al., 2007; Dingemanse et al., 2015), d) (Castellarin et al., 2012)

7.4.3 Preparación de Gel para Electroforesis

La visualización de los fragmentos de DNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 2%, cuya preparación se describe a continuación:

- Verter en un matraz de 50 ml de buffer de electroforesis TBE y 1 g de agarosa (2%) y se mezcla.
- Fundir la solución de agarosa y dejar enfriar (50°C – 60°C).
- Añadir la solución de agarosa en el contenedor de geles y colocar los peines para formar los pocillos.
- Dejar enfriar y solidificar.
- Colocar el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis, teniendo cuidado de que los pocillos queden cerca del cátodo (polo negativo).
- Se añade el buffer de electroforesis TBE, de forma que cubra bien el gel de agarosa.

- Depositar 10 µl de muestra de PCR en uno de los pocillos.
- Aplicar 5 µl del marcador de peso molecular (GeneRuler 100Pb DNA Ladder, Thermo Scientific) en uno de los pocillos.
- Tapar la cubeta de electroforesis y conectar los electrodos a la fuente de poder.
- Se programó la fuente a 40 Voltios durante 10min y 80 Volts durante 60 min.
- Una vez terminada la electroforesis se visualizaron los fragmentos de DNA con luz UV.

7.5 Fase de Gabinete

En esta fase se llevó a cabo la redacción y elaboración de la tesis. Se analizaron los resultados obtenidos de los geles de agarosa para determinar la presencia o ausencia de los microorganismos *Lactobacillus spp, Bifidobacterium spp, Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en la microbiota intestinal de las personas que participaron en la investigación.

Los datos obtenidos durante la elaboración de la encuesta se analizaron con el programa estadístico GraphPad InStat 3.10, para determinar qué factores ambientales presentaban diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Al final se relacionaron los factores ambientales que presentaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio con la presencia de los microorganismos de interés en la investigación.

7.5.1 Análisis estadísticos

Se realizó un estudio descriptivo y observacional a las treinta personas que participan en la investigación, donde se contrasto la hipótesis a través de los resultados obtenidos en el cuestionario y el estudio de laboratorio. Los datos recolectados se analizaron con el programa estadístico GraphPad InStat 3.10, utilizando pruebas paramétricas como ANOVA y no paramétricas como Kruskal-Wallis y χ^2.

En el estudio se utilizó la estadística paramétrica (ANOVA), para contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones (K >2) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés, permite determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren.

También se hizo uso de la estadística no paramétrica (χ^2), empleada como prueba de bondad de ajuste que nos permite conocer a qué tipo de distribución se ajustará nuestro trabajo, sirve para someter a prueba hipótesis referidas a distribuciones de frecuencias. En términos generales, esta prueba contrasta frecuencias observadas con las frecuencias esperadas de acuerdo con la hipótesis nula. También se utiliza para probar la independencia de dos variables entre sí.

7.5.1.1 Análisis Paramétricos

Las pruebas paramétricas son un tipo de pruebas de significación estadística que cuantifican la asociación o independencia entre una variable cuantitativa y una categórica. Exigen ciertos requisitos previos para su aplicación: la distribución Normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan, la homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos y un tamaño de muestra(n) no inferior a 30 (Sampieri, 2010).

7.5.1.2 Análisis No Paramétricos.

Para realizar los análisis no paramétricos debe partirse de las siguientes consideraciones:

1. La mayoría de estos análisis no requieren de presupuestos acerca de la forma de la distribución poblacional. Aceptan distribuciones no normales.
2. Las variables no necesariamente tienen que estar medidas en un nivel por intervalos o de razón; pueden analizar datos nominales u ordinales. De hecho, si se quieren aplicar análisis no paramétricos a datos por intervalos o razón, éstos necesitan resumirse a categorías discretas (a unas cuantas). Las variables deben ser categóricas (Sampieri, 2010).

VIII. RESULTADOS

8.1 Resultados de la encuesta realizada

Se aplicó una encuesta que consta de cuatro apartados: datos de interés, dieta, actividad física y hábitos (Ver anexo 12.1), a las treinta personas que participaron en la investigación. (diez con obesidad (O), diez atletas y practicantes de triatlón (Atletas) y diez con peso normal (P.N)). Los resultados se analizaron con el programa estadístico GraphPad InStat 3.10.

8.1.1 Características de la población de estudio

Se recabaron datos de interés como el nivel socioeconómico, donde todos los sujetos de estudio refirieron pertenecer a un nivel medio, la edad (O: 48 años, P.N: 41.8 años y Atletas: 23.7 años), el género (O y P.N: 40% Hombres, 60% Mujeres; Atletas: 50% Hombres, 50% Mujeres) , el tipo de nacimiento (O y P.N: 30% Cesárea y 60% Parto Natural; Atletas: 10% Cesárea y 90% Parto Natural),el peso al nacer (p=0.4349) y el índice de masa corporal (IMC) (O:31.61 Kg/m^2; P.N:23.11 Kg/m^2; Atletas: 22.86 Kg/m^2). Dentro de esta sección existen diferencias significativas entre los tres grupos y el IMC (ANOVA; O vs. P.N ($P<0.001$) y O vs. Atletas ($P<0.001$)) y la edad (Kruskal-Wallis; O vs. Atletas ($P<0.01$) y Control vs. Atletas ($P<0.05$)). (Tabla 6.)

Tabla 6.

Características de los tres grupos de estudio

Características		Grupo		
		Obesidad (O)	Peso Normal (P.N)	Atletas
Edad* (Años)		48	41.8	23.7
IMC* (Kg/m^2)		31.68	23.11	22.87
Género**	Masculino	40	40	50
	Femenino	60	60	50
Peso al Nacer* (Kg)		3.01	3.11	3.22
Nivel Socioeconómico		Medio	Medio	Medio
Tipo de Nacimiento**	Natural	70	70	90
	Cesárea	30	30	10

Nota. *Los datos se expresan como valor medio, ** Los datos se expresan en porcentaje.

8.1.2 Dieta

Se analizaron datos referentes a los hábitos alimentarios, como: la hora de mayor ingesta de alimentos (p=0.5169), el consumir alimentos entre comidas(p=0.2713), el tamaño de las raciones que consumen (p=0.5578), el tiempo (p=0.6592) y la velocidad(p=0.3670) que tardan en comer las personas, cuantas comidas realizan al día (p=0.8433), el lugar donde habitualmente comen las personas (Casa o Calle; p=0.0575) (Tabla 7).

Tabla 7.
Hábitos alimentarios de los tres grupos de estudio

		Grupo			
Característica*		**Obesidad (O)**	**Peso Normal (P.N)**	**Atletas**	***Prueba X^2 Valor p***
Consume alimentos entre comidas	**Si**	20	40	10	0.2713
	No	80	60	90	
Cuantas Comidas hace al día	**01:03**	80	70	70	0.8433
	04:06	20	30	30	
Lugar donde habitualmente come	**Casa**	82	77	64	0.0575
	Calle	18	23	36	
Tiempo que tarda en comer	**< 1/2 Hora.**	40	50	30	0.6592
	> 1-2 Hora	60	50	70	
Velocidad a la que come	**Lento/Moderado**	60	60	70	0.367
	Rápido	40	40	30	
Horario de mayor ingesta de alimentos	**Mañana**	20	20	0	0.5169
	Tarde	70	80	90	
	Noche	10	0	10	
Tamaño de las raciones que consume	**Pequeñas**	0	10	10	0.5578
	Medianas	90	90	90	
	Grandes	10	0	0	

Nota. *Los datos se expresan en porcentaje; El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$

Con respecto a la dieta, también se recabaron datos sobre el tipo de alimentos que consumían las personas de los tres grupos, durante una semana. Podemos observar que existen diferencias significativas entre los tres grupos y la preferencia por determinado tipo de alimentos, siendo estos pescados, mariscos y cereales (Proteínas y Carbohidratos Complejos) por parte de los atletas con respecto a los grupos de O y P.N, y el consumo de pan y productos lácteos (Carbohidratos Simples) en el caso del grupo de O con respecto a los otros dos (Tabla 8).

Tabla 8.

Tipo de alimentos consumidos por los tres grupos de estudio

Tipo de Alimentos*	Frecuencia en el consumo de Alimentos												
	Nunca/Ocasionalmente			2-3 Veces por Semana			4-5 Veces por Semana			Todos los días			*Prueba* X^2
	O	P.N	Atletas	O	P.N	Atletas	O	P.N	Atletas	O	P.N	Atletas	Valor *p*
Fruta	0	10	0	40	30	10	10	20	40	50	40	50	0.4353
Verdura	0	0	0	40	20	60	20	40	20	40	40	20	0.4337
Huevo	20	40	50	40	30	10	20	10	30	20	20	10	0.6197
Leche y Derivados	20	40	10	0	30	20	0	10	30	80	20	40	0.0358
Carne de Res	70	20	40	20	40	40	10	20	20	0	20	0	0.3804
Carne de Pollo	0	30	0	80	50	70	20	20	30	0	0	0	0.1366
Pescados y Mariscos	80	100	70	20	0	30	0	0	0	0	0	0	0.0126
Pan	20	40	20	0	20	30	20	40	40	60	0	10	0.0358
Cereales	80	90	20	10	10	10	0	0	60	10	0	10	0.001
Tortillas	10	60	10	10	0	20	20	10	40	60	30	30	0.1085
Comida Chatarra	80	80	80	0	10	0	10	0	0	10	10	20	0.3868
Comida Rápida/Preprocesad	100	90	70	0	10	20	0	0	10	0	0	0	0.0934
Suplementos	60	70	90	10	0	10	10	0	0	20	30	0	0.0784
Agua	10	10	0	0	10	0	0	0	0	90	80	100	0.5213
Bebidas Azucaradas	70	70	80	20	20	10	0	10	10	10	0	0	0.8988

Nota .*Los datos se expresan en porcentaje; El nivel de significancia se establecio en $p<0.05$

8.1.3 Actividad Física y Sedentarismo

En el apartado de actividad física y sedentarismo se analizaron datos como: el practicar ejercicio (p=0.0067), ver la televisión más de dos horas al día (p=0.0180), Situación Laboral (p=0.0017) (Empleados, Estudiantes, Trabaja por cuenta propia y ama de Casa), el tiempo que pasan sentados o reclinados (p=0.4746). Como era de esperarse, existen diferencias significativas también en esta sección, en el apartado de la actividad física podemos observar que el practicar ejercicio es una actividad habitual en el grupo de los atletas, mientras que el grupo de las personas con obesidad ven la televisión más de dos horas al día y no practican ejercicio, lo cual denota un estilo de vida sedentario. También hubo diferencias significativas en cuanto a la situación laboral de los tres grupos (Tabla 9).

Tabla 9.

Actividad Física y Sedentarismo de los tres grupos de estudio

Característica*		Grupo			
		Obesidad (O)	**Peso Normal (P.N)**	**Atletas**	***Prueba X^2 Valor p***
Practica Ejercicio	**Si**	40	40	100	0.0067
	No	60	60	0	
Ver la T.V mas de dos horas al día	**Si**	70	30	10	0.018
	No	30	70	90	
Cuanto tiempo pasa sentado	**1-3 h.**	30	30	10	0.8747
	3-6 h.	70	70	90	
Situación Laboral	**Empleado**	10	40	10	0.0017
	Estudiante	20	20	90	
	Trabaja por Cuenta Propia	50	0	0	
	Ama de Casa	20	40	0	

Nota. *Los datos se expresan en porcentaje; El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$

8.1.4 Hábitos

Se sondearon hábitos como el fumar (p=0.7494), el consumir bebidas alcohólicas (p=0.3607), el comer en condiciones de aburrimiento (p=0.8747), comer en condiciones de estrés y/o estados de ánimo bajo (p=0.0357). Dentro del apartado de los hábitos, la variable que represento una diferencia significativa fue la de del comer en condiciones de estrés o estado de ánimo bajo, siendo mayor la alimentación bajo estas condiciones en las personas con obesidad (Tabla 10).

Tabla 10.

Hábitos de los tres grupos de estudio

Característica*		Grupo			*Prueba X^2* *Valor p*
		Obesidad (O)	Peso Normal (P.N)	Atletas	
Fuma	**Si**	10	20	10	0.7494
	No	90	80	90	
Consume Alcohol	**Si**	70	90	90	0.3607
	No	30	10	10	
Comer por aburrimiento	**Si**	40	50	50	0.8747
	No	60	50	50	
Comer por estrés o bajo animo	**Si**	60	10	20	0.0357
	No	40	90	80	

Nota. *Los datos se expresan en porcentaje; El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$

8.2 Análisis de la Microbiota intestinal

A partir de las muestras de materia fecal obtenidas de los treinta pacientes que conformaron los tres grupos de estudio de la presente investigación, se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 2 % a partir de los productos obtenidos por PCR de punto final.

En la tabla número 11 se indican los resultados obtenidos de la electroforesis en gel de agarosa, sobre la presencia o ausencia de los microorganismos de interés para la presente investigación.

Tabla 11.

Composición de la microbiota intestinal de los tres grupos de estudio.

	Paciente	*Lactobacillus spp.*	*Lactobacillus plantarum*	*Lactobacillus rhamnosus*	*Bifidobacterium spp.*	*Akkermansia muciniphila*	*Fusobacterium nucleatum*
Obesidad	1	+	+	+	+	-	-
	2	+	+	-	+	+	-
	3	+	-	-	-	+	-
	4	+	-	-	-	+	-
	5	+	-	-	+	-	-
	6	+	-	-	+	-	-
	7	+	+	-	+	+	-
	8	+	+	+	-	-	-
	9	+	-	-	-	-	-
	10	+	-	+	+	-	-
Peso Normal	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	+	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	+	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	-	-
	7	+	+	+	+	-	-
	8	+	-	-	+	-	-
	9	+	+	-	+	-	-
	10	+	-	+	-	-	-
Atletas	1	+	-	-	+	-	-
	2	+	+	-	+	-	-
	3	+	-	-	+	-	-
	4	+	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-
	6	+	+	-	+	-	-
	7	+	+	+	+	-	-
	8	+	-	-	+	-	-
	9	+	+	+	-	-	-
	10	+	-	-	-	-	-

Nota: + Presencia del microorganismo, - Ausencia del microorganismo

En la figura número 5 se muestran los resultados representativos de los microorganismos: *Lactobacillus spp., Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus plantarum, Bifidobacterium spp, Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum*, obtenidos por PCR en gel de agarosa, mediante la amplificación del gen 16S rRNA.

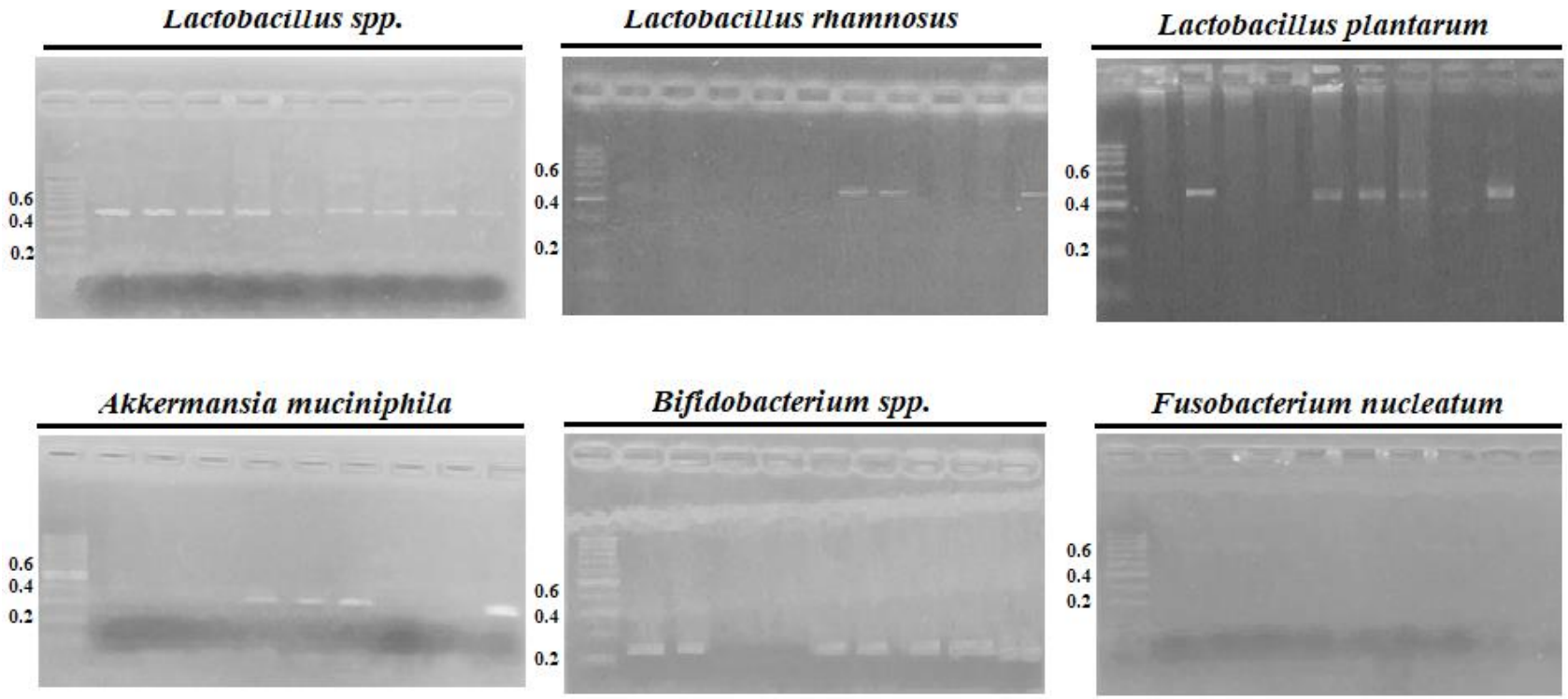

Figura 5. Resultados representativos de la electroforesis en gel de agarosa, productos obtenidos por PCR de punto final.

En la tabla número 12 se muestran los porcentajes de la presencia de los distintos microorganismos buscados en los tres grupos de estudio. El análisis estadístico de la composición de la microbiota intestinal, de los distintos grupos, nos muestra que no existen diferencias significativas entre estos ($p = 0.2998$).

Tabla 12.

Presencia de microorganismos en los tres grupos de estudio

Microorganismo	Grupo		
	Obesidad (O)	Peso Normal (P.N)	Atletas
Lactobacillus spp.	**100**	**50**	**100**
Lactobacillus plantarum	**40**	**30**	**50**
Lactobacillus rhamnosus	**30**	**30**	**30**
Bifidobacterium spp.	**60**	**60**	**60**
Akkermansia muciniphila	**40**	**10**	**0**
Fusobacterium nucleatum	**0**	**0**	**0**

Nota.*Los datos se expresan en porcentaje.

IX. DISCUSIÓN

De acuerdo a datos de la COFEMER (2012), la obesidad es un problema de salud pública, que afecta de manera creciente a México. En las dos últimas décadas, la obesidad en niños y adultos mexicanos se ha duplicado, por lo que ha sido reconocida como el problema de salud pública más importante del país (Barquera *et al.*, 2013), aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, etc (Bibiloni *et al.,* 2009). Sin embargo, la atención brindada a los problemas de salud pública en nuestro país no es suficiente, hoy en día el 75% de la población tiene sobrepeso y obesidad y el porcentaje sigue en aumento (Barquera *et al.*, 2010).

Debido a este importante incremento de personas obesas, Barquera *et al.*, (2010), propone que el problema no puede ser atribuido solamente a factores genéticos sino también a factores ambientales como se sugiere en el presente trabajo. Se deben generar estrategias preventivas que fomenten hábitos alimentarios y de actividad física adecuados, que promuevan cambios en los hábitos de las personas, con el fin de generar un estilo de vida más saludables y hacer frente a la epidemia de obesidad en nuestro país

Aunque el objetivo fundamental de la presente tesis ha sido determinar qué factores ambientales modifican la composición de los microorganismos: *Lactobacillus spp, Bifidobacterium spp, Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en la microbiota intestinal y como esto contribuye a la obesidad, se sugiere analizar la presencia de otros grupos bacterianos de interés en futuras investigaciones.

En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de la microbiota intestinal, debido a su influencia sobre muchas características bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas en el hospedero en el que residen (Cani *et al.,* 2013), existiendo una relación cada vez más clara entre la microbiota intestinal, los factores ambientales y la salud. Hoy en día no se conocen con precisión todos los microorganismos que componen a la microbiota intestinal, ni la importancia y el papel biológico con el que cada uno contribuye a la salud del hospedero. En Puebla los estudios sobre la microbiota intestinal y su relación con los factores ambientales y la obesidad son escasos.

Según la OMS (2017), México se encuentra dentro de los primeros lugares a nivel mundial en obesidad, esto puede deberse al régimen alimentico y al sedentarismo; la dieta de la población mexicana está compuesta principalmente por alimentos ricos en carbohidratos: Pan, Tamales, Tacos, Refrescos, Leche etc. (Barquera *et al.,* 2010), los cuales son una rápida fuente de energía para el organismo, debido al aporte de glucosa generada por estos. Según datos del Módulo de Práctica y Ejercicio Físico (MOPRADEF, 2016), el 56% de la población mexicana de 18 años o más es inactiva físicamente, lo cual aunado a una alimentación rica en carbohidratos (Principalmente Simples) puede ser la causa principal de la obesidad en nuestro país. La obesidad, definida por la OMS (2017) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que pone en riesgo la salud de las personas es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares las cuales representan la segunda y primera causa de muerte en nuestro país respectivamente (Barquera *et al.,* 2013).

Consideraciones de este tipo nos han motivado a llevar a cabo el estudio que se detalla en este texto. El objetivo fundamental del trabajo fue determinar qué factores ambientales modifican la composición de la microbiota intestinal y como esto contribuye a la obesidad de las personas. Desafortunadamente, el número de individuos y muestras analizadas es pequeño y, por lo tanto, podrían reducir el grado de significación de las asociaciones detectadas entre los factores ambientales, la microbiota intestinal y el peso corporal, por lo que los resultados han de considerarse puntuales. No obstante, las asociaciones identificadas y algunas de ellas concordantes

con otros autores han aportado información sobre la relación de determinadas bacterias, los factores ambientales y la obesidad.

El análisis de los datos recolectados en las encuestas nos muestra que factores ambientales como la dieta, los hábitos alimenticios (frecuencia y tipo de ingestas diarias), la situación laboral, la actividad física, el ver la televisión más de dos horas al día (Sedentarismo), el lugar donde comen las personas (casa o calle), el estrés e incluso el estado de ánimo, pueden generar cambios en el almacenamiento de energía en las personas y por ende en el aumento o disminución de peso. Estos datos coinciden en con los de autores como Basain *et al.* (2015), Xu *et al.* (2016), entre otros que mensionan a la dieta y la falta de ejercicio, como los principales factores de riesgo para el desarrollo de la obesidad, ya que un desequilibrio energetico entre la cantidad de calorías consumidas y gastadas conducen al desarrollo de la obesidad, como lo menciona la OMS (2017).

En esta encuesta se observó que las personas que presentan obesidad tienden a consumir una mayor cantidad de alimentos, cuya fuente de energía es la glucosa proveniente de carbohidratos simples como son el pan, la leche, productos lácteos y la comida chatarra, con respecto al grupo de peso normal (control) y los atletas; los atletas presentaron preferencia por alimentos con aporte proteico, como lo son los pescados y mariscos, y con alto contenido de fibra como son los cereales, los cuales también son una buena fuente de carbohidratos complejos. En cuanto a la actividad física, como era de esperarse, fue mucho mayor en el grupo de los atletas con respecto al grupo de personas con obesidad y el grupo de control, aunque entre estos dos grupos no hubo variación. El 70% del grupo de personas con obesidad ven la televisión más de dos horas al día y el 60 % no realiza ejercicio lo que denota un estilo de vida sedentario, el cual es magnificado por el estilo de vida moderno donde todo está pensado para evitar cualquier esfuerzo físico, asimismo el estilo de vida actual influye en las actividades laborales, el lugar donde comemos (Casa o Calle), el tiempo que disponemos para comer y el tipo de alimento que podemos consumir.

En la encuesta también se pudo observar que el grupo de personas que padecen obesidad tienden a consumir una mayor cantidad de alimentos cuando están sometidos a condiciones de estrés o presentan un estado de ánimo bajo, lo cual tiene relación con lo reportado en trabajos previos por Kanji *et al.* (2017) y Sarkar *et al.* (2016) que sugieren que las bacterias de la microbiota intestinal, denominadas Psicobióticos, influyen en el estado de ánimo, en los pensamientos y la conducta en general. Esto puede deberse a efectos neurológicos sobre neurotransmisores como GABA, el cual

es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central y el glutamato, que es el neurotransmisor excitatorio por excelencia del sistema nervioso central (Sarkar *et al.,* 2016).

El análisis de la materia fecal, se realizó por medio de la técnica de PCR, desarrollada por Kary Mullís en 1983, para determinar la presencia de microorganismos como: *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp, Akkermansia muciniphila y Fusobacterium nucleatum* en la microbiota intestinal de los tres grupos de estudio.

Con respecto al grupo de *Lactobacillus spp.*, se detectó su presencia en el 100% las muestras de los grupos de personas con obesidad y los atletas, mientras que en el grupo control solamente se detectaron en el 60% de las muestras. El género *Lactobacillus*, pertenecen al filo de los *Firmicutes* los cuales se ha observado que aumentan su población en individuos obesos, son los principales degradadores de los carbohidratos y la fibra dietética, por lo que aumenta la eficiencia en la extracción de energía de la dieta, y sus metabolitos son una importante fuente de nutrientes para la microbiota intestinal (Barczynska *et al.,* 2015; Berry, 2016; Sanz *et al.,* 2014). Esta eficiente capacidad de extracción energética de la dieta, puede influir en el aumento de peso en las personas, como se pudo apreciar en el presente estudio, donde el porcentaje de *Lactobacillus* en el grupo de las personas de peso normal (60%) , fue menor con respecto a los otros dos grupos (100%) además que las bandas que se presenciaron al realizar la electroforesis eran más tenues en el grupo de peso normal, lo que podría sugerir una concentración de DNA menor y por lo tanto una menor cantidad de bacterias de este género. En contraste el 100% de las muestras analizadas de los grupos de personas que padecen obesidad y los atletas presento la presencia de *Lactobacillus* y las bandas visualizadas en la electroforesis eran perfectamente visibles. Probablemente la diferencia en el IMC entre los dos grupos, aunque la presencia de *Lactobacillus* sea la misma en ambos, se deba al estilo de vida sedentario por parte del grupo de las personas con obesidad ya que al tener poca o nula actividad física, la cantidad de calorías consumidas es mayor al gasto energético, por lo que el exceso de energía, es almacenado en forma de grasa en los adipocitos ocasionando la obesidad (Rosenbaum *et al.,* 2015), mientras que en el grupo de los atletas este exceso de energía es aprovechado a través de la actividad física. Sin embargo, la función de cepas del género *Lactobacillus* en la obesidad sigue estando en debate hoy en día.

Trabajos previos realizados por indican la capacidad probiótica del género *Lactobacillus*, es decir se consideran como microorganismos vivos, que en las cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedero (Simeoni *et al.,* 2016) y al no poseer cadenas lipopolisacaridas

inflamatorias, su propagación en el intestino no desencadena reacciones inmunológicas, lo cual es de ayuda para el sistema inmunológico para aprender a distinguir entre las entidades antiinflamatorias y desarrollar respuestas inmunógenas apropiadas al identificar elementos inmunógenos como antigénicos (Alexander *et al.*, 2014; Hegde *et al.*, 2013 y Simeoni *et al.*, 2016), por lo que son utilizados para desplazar o inhibir el desarrollo de flora patógena y contra infecciones e inflamaciones gastrointestinales (Sarkar *et al.*, 2016 y Simeoni *et al.*, 2016). Dentro del estudio se buscó la presencia de dos especies con capacidades probióticas dentro del género de *Lactobacillus*; *Lactobacillus plantarum* se encontró en el 40 % de los pacientes del grupo con obesidad, se encontró en el 30% de los pacientes del grupo de peso normal y en el 50 % de los atletas y *Lactobacillus rhamnosus* encontrado en el 30% de los pacientes de los tres grupos.

Lactobacillus plantarum, y *Lactobacillus rhamnosus* son consideradas bacterias probióticas debido a que contribuyen de manera benéfica al balance de la microbiota intestinal previniendo y controlando desordenes gastrointestinales (Sanz *et al.*, 2010). Estas especies probióticas pueden estar generando beneficios como la inhibición de bacterias patógenas, ya que regulan la microbiota intestinal (White, 2016) y crean un ambiente acido por la descomposición de la lactosa en ácido láctico. Según la opinión de Kobyliak *et al.* (2016), las bacterias con capacidad probiotica pueden ayudar a prevenir y controlar la obesidad, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio donde la proporcion de las especies probioticas del genero *Lactobacillus* analizadas en el estudio con respecto al total de bacterias del genero fue ligeramente mayor en las personas con peso normal y los atletas con respecto a sus homologos del grupo con obesidad.

En cuanto al género *Bifidobacterium spp.*, su presencia fue del 60% en las muestras de los tres grupos, por lo que no hubo asociación entre la presencia de *Bifidobacterium spp.* en la materia fecal y el IMC de los diferentes grupos; junto con los *Lactobacillus spp.* representa uno de los géneros de probióticos más estudiadas en la actualidad. Las Bifidobacterias son uno de los mayores géneros de bacterias saprófitas de la flora intestinal (Ishibashi *et al., 1997)*, estudios fisiológicos y genómicos (Simeoni *et al.*, 2016). indican que este grupo de bacterias participa activamente en la utilización de carbohidratos complejos, por lo que ayudan en la digestión y que sus metabolitos pueden reducir los parámetros bioquímicos de colesterol y triglicéridos (Kobyliak *et al.*, 2016*).*

Curiosamente, en el presente estudio no se detectó la presencia de la bacteria *Akkermansia muciniphila* en el grupo de los atletas y solamente en una persona del grupo de peso normal, mientras que en el grupo de las personas con obesidad hubo cuatro personas con esta bacteria en

su microbiota intestinal. Estos resultados contrastan con los estudios de Cani *et al. (*2014); Derrien *et al.* (2015) y van Olden *et al.* (2015), en los cuales, se ha asociado a la obesidad con la reducción de *Akkermansia muciniphila* y su aumento con la disminución de la obesidad y la diabetes mellitus tipo II (DMII) (Everard, *et al,* 2013). Esta bacteria se ha asociado a una alta diversidad bacteriana y a fenotipos metabólicos saludables (Sanz *et al.,* 2014), debido a su capacidad de degradar mucina que reside en las capas mucosas del intestino y a su capacidad de producir SCFA como acetato y butirato (Cani *et al.,* 2014).

En lo que respecta a la bacteria *Fusobacterium nucleatum* no se detectó su presencia en ninguno de los tres grupos de estudio. Es una bacteria anaerobia Gram negativa, perteneciente al filo Fusobacteria, aunque asociada frecuentemente a la cavidad oral y al desarrollo de periodontitis, también se ha descrito en el intestino humano, su presencia en las heces fecales ha sido relacionada con el desarrollo de cáncer colorrectal y contribuye a la inflamación crónica de bajo grado característica de la obesidad (Castellarin *et al.,* 2013).

El papel de los factores ambientales y la microbiota intestinal es un camino prometedor para cambiar la forma en la que se previene, controla y trata la obesidad. Se requieren más estudios humanos sobre los metabolitos producidos por la microbiota intestinal y su función, ya sea individualmente o combinados, para establecer sus efectos sobre el incremento o la disminución de peso.

X. CONCLUSIONES

1.- La dieta, la actividad física, el sedentarismo, los hábitos, el nivel socioeconómico, el estado de ánimo y el estrés, son factores ambientales cruciales que modifican la composición de la microbiota intestinal, haciéndola propensa a la disbiosis, lo que genera cambios en el almacenamiento de energía en las personas y la producción de metabolitos, que pueden derivar en el aumento o disminución de peso.

2.- La dieta y la actividad física son los principales factores ambientales que modifica la composición de la microbiota intestinal de las personas obesas y no obesas. Los nuevos estilos de vida en una sociedad cada vez más tecnificada que requiere menos esfuerzo para la elaboración de distintas actividades, la inclusión de las mujeres a la vida laboral y la consecuente disminución de la comida casera, la ubicuidad de la comida rápida, el incremento de la publicidad de alimentos, el aumento de las bebidas azucaradas, el uso indiscriminado de antibióticos, y la elevada disponibilidad y bajo costo de los alimentos poco saludables, son factores que han detonado el incremento de la obesidad en el estado de Puebla y en general en México.

3.- La variabilidad de las bacterias analizadas en este estudio fue escasa entre los tres grupos de estudio; personas con obesidad, personas con peso normal y atletas. Solamente el género de *Lactobacillus spp., y Akkermansia muciniphila* presentaron diferencias. Estas diferencias pueden deberse, en parte, al papel metabólico de los diferentes grupos de microorganismos presentes en la microbiota de los sujetos analizados y la dieta consumida por estos.

4.- La presencia de *Lactobacillus spp.*, en la microbiota intestinal de personas con un estilo de vida sedentario, influye en el desarrollo de la obesidad, debido a que este género de bacterias presenta una eficiente extracción energética de los alimentos de dietas altas en carbohidratos. Algunas de las especies de *Lactobacillus spp.*, tienen capacidad probiótica e inmunomoduladora, como el caso de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*, por lo que aportan beneficios al estado de salud de las personas. La presencia de *Akkermansia muciniphila* en las personas con obesidad en este estudio, podría explicarse por sus efectos antiinflamatorios.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Alexander Katie L., Targan Stephan R y Elson III Charles O. (2014). Microbiota activation and regulation of innate and adaptative inmunity. *Inmunological Reviews, 260*, 206-220.

Barczynska R, Bandurska K, Slizewska K, Litwin M, Szalecki M, Libudzisz Z y Kapusniak J. (2015). Intestinal Microbiota, Obesity and Prebiotics. *Polish Journal of Microbiology, 64*(2), 93-100.

Barquera Simon, Campos Nonato Ismael , Hernández Becerra Lucía, Pedroza Tobías Andrea y Rivera Dommarco Juan A. (2013). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Pública Mexicana, 55*(2), 151-160.

Barquera Simon, Campos Nonato Ismael, Rojas Rosalba y Rivera Juan. (2010). Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud. *Gaceta Medica De México*, 397-407.

Basain Valdés Jose Maria, Valdés Alonso Maria del Carmen, Miyar Pieiga Emilia, Linares Valdés Hortensia y Martínez Izquierdo Alicia. (2015). Alteraciones en la microbiota intestinal por la dieta y su repercusión en la génesis de la obesidad. *MEDISAN*, 1536 - 1546.

Basain Valdés Jose Maria, Valdés Alonso Maria del Carmen, Perez Martinez Margarita, Linares Valdés Hortensia y Jorge Díaz Maria de los Àngeles. (2016). Papel de la leptina como señal aferente en la regulación. *Revista Cubana de Pediatría*, 74-80.

Berry D. (2016). The emerging view of Firmicutes as key fibre degraders in the human gut. *Environmental Microbiology*, 2081-2083.

Bibiloni Rodrigo, Membrez Mathieu y Chou Chieh Jason . (2009). Microbiota intestinal, obesidad y diabetes. *Annales Nestle*, 39-48.

Cani Patrice D., Everard Amandine y Duparc Thibaut. (2013). Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current Opinion in Pharmacology* , 935-940.

Castellarin Mauro, Warren Rene´ L., Freeman J. Douglas, Dreolini Lisa, Krzywinski Martin, Strauss Jaclyn, Barnes Rebecca, Watson Peter, Allen-Vercoe Emma, Moore Richard A. y Holt Robert A. (2012). Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, 299-306.

Collado M. Carmen ,Derrien Muriel , Isolauri Erika, de Vos Willem M. y Salminen Seppo . (2007). Intestinal Integrity and Akkermansia muciniphila, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly. *Applied and environmental microbiology*, 7767 - 7770.

Comisión Federal de Mejora Regulatoria (COFEMER). (2012). El problema de la obesidad en México. *Documentos de Investigación en Regulación No. 2012-02*, 51.

Córdova Villalobos José Ángel, Barriguete Meléndez Jorge Armando , Rivera Montiel María Elena, Lee Gabriel Manuel y Mancha Moctezuma Cuauhtémoc . (2010). Sobrepeso y obesidad. Situación actual y perspectivas. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 202-207.

Cuéllar H. R. (2008). Conceptualización de la salud ambiental: teoría y práctica (parte 1). *Rev Peru Med Exp Salud Publica.*, 403-409.

Derrien Muriel y van Hylckama Vlieg Johan E.T. (Junio de 2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology, 23*(6), 354-366.

Dingemanse Celia, Belzer Clara, Hijum Sacha A.F.T.van, Günthel Marie, Salvatori Daniela, den Dunnen Johan T. , Kuijper Ed J., Devilee Peter, de Vos Willem M., van Ommen GertJan B. y Robanus-Maandag Els C. (2015). Akkermansia muciniphila and Helicobacter typhlonius modulate intestinal tumor development in mice. *Carcinogenesis*, 1388 –1396.

Everard Amandine, Belzer Clara, Geurts Lucie, Ouwerkerk Janneke P., Druart Celine, Bindels Laure B., Guiot Yves, Derrien Muriel, Muccioli Giulio G., Delzenne Nathalie M., Vos Willem M. y Cani Patrice D. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 9066-9071.

Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). (2015). *Salud y Nutrición*. Recuperado de: http://www.unicef.org/mexico/spanish/17047.htm

González-Parra Gilberto, Villanueva Rafael J y Arenas Abraham J. (2010). An age structured model for obesity prevalence dynamics in populations. *Revista MVZ Córdoba*, 2051-2059.

Greenhalgh Kacy, Meyer Kristen M.,Aagaard Kjersti M. y Wilmes Paul. (2016). The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environmental Microbiology*, 2103-2116.

Grenham Sue, Clarke Gerard, Cryan John F. y Dinan Timothy G. (2011). Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Frontiers in Phisioly*.

Gutiérrez Juan Pablo, Dommarco Juan Rivera, Shamah Teresa, Oropeza Carlos y Hernández Ávila Mauricio. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012.* Cuernavaca, México.

Haro Carmen, García-Carpintero Sonia, Alcala-Diaz Juan, Gomez-Delgado Francisco, Delgado-Lista Javier, Perez-Martinez Pablo, Rangel-Zuñiga Oriol, Quintana-Navarro Gracia, Landa Blanca, Clemente Jose, Lopez-Miranda Jose, Camargo Antonio y Perez-Jimenez F. (2016). The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 27-31.

Hegde V. y Dhurandhar N. V. (2013). Microbes and obesity—interrelationship between infection, adipose tissue and the immune system. *Clinical Microbiology and Infection*, 314-320.

Huddleston J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*, 167-176.

Hyuk-Sang Kwon, Eun-Hee Yang, Seung-Hun Lee, Seung-Woo Yeon, Byung-Hwa Kang y Tae-Yong Kim. (2004). Rapid identification of probiotic Lactobacillus species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 267-275.

Icaza M. E. (2013). Microbiota Intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de gastroenterologia mexicana, 78*, 240-248.

Ishibashi N, Yaeshima T y Hayasawa H. (1997). Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malaysian Journal of Nutrition*, 3, 149-159.

Kanji S., Fonseka T.M., Marshe V.S, Sriretnakumar V., Hahn M.K. y Müller D.J. (2017). The microbiome-gut-brain axis: implications for schizophrenia and antipsychotic induced weight gain. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* , 1-13.

Kobyliak Nazarii,Conte Caterina, Cammarota Giovanni, Haley Andreana P., Styriak Igor, Gaspar Ludovit, Fusek Jozef, Rodrigo Luis y Kruzliak Peter. (2016). Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutrition & Metabolism*, 1-13.

Krishnan Smitha, Alden Nicholas y Lee Kyongbum. (2015). Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 137-145.

Lastours V. y Fantin B. (2015). Microbiote intestinal:que lles implications thérapeutiques? *La Revue de médecine interne*, 22-27.

Li Daotong, Wang Pan, Wang Pengpu, Hu Xiaosong y Chen Fang. (2016). The gut microbiota: A treasure for human health. *Biotechnology Advances*, 1210-1224.

López Cepero Andrea A. y Palacios Cristina. (2015). Association of the Intestinal Microbiota and Obesity. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 60-64.

López Villalta Lozano María José y Soto González Alfonso. (2010). Actualización en Obesidad. *Cad Aten Primaria, 17*(2), 101-107.

Marchat Laurence A. y Zamorano Absalom. (2007). De la obesidad y su origen : Genes y ambiente. *Casa del tiempo*, 62-67.

Marchesi J. R. (2011). Human distal gut microbiome. *Environmental Microbiology*, 3088–3102.

McKenzie Craig, Tan Jian, Macia Laurence y Mackay Charles. (2017). The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunological Reviews*, 277-295.

Módulo de Práctica y Ejercicio Físico (MOPRADEF). (2016). *Boletín de prensa núm. 27/16.* Recuperado de: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/boletines/2016/especiales/especiales2016_01_08.pdf

Moreno M. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Medica Clinica Condes*, 124 - 128.

Narasimhan Sukanya y Fikrig Erol. (2015). Tick microbiome: the force within. *Trends in Parasitology, 31*(7), 315-323.

Ojeda Patricia, Bobe Alexandria, Dolan Kyle, Leone Vanessa y Martinez Kristina. (2016). Nutritional modulation of gut microbiota — the impact on metabolic disease pathophysiology. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 191-200.

Okpala P. (2014). Obesity: Risk Factor for Public Chronic Health Problems. *Journal of Applied Medical Sciences*, 21-26.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *Centro de Prensa: Obesidad y Sobrepeso*. Recuperado de: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/

Penders Jhon, Vink Cornelis, Driessen Christel, London Nancy, Thijs Carel y Stobberingh Ellen E. . (2005). Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 141-147.

Radilla-Vázquez Romina Belen, Parra-Rojas Isela, Martínez-Hernández Norma Edith, Márquez-Sandoval Yolanda Fabiola, Illades-Aguiar Berenice y Castro-Alarcón Natividad. (2016). Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia in Young Obese Mexican Subjects. *Obesity Facts*, 1-11.

Rosenbaum Michael, Knight Rob y Leibel Rudolph L. (2015).The gut microbiota in human energy. *Cell Press*, 493-501.

Ruiz Alvarez Vladimir, Puig Peña Yamila y Rodriguez Acosta Mireida. (2010). Microbiota Intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 364-397.

Sampieri R. H. (2010). *Metodología de la investigacion.* México: Mc Graw Hill.

Sankar Senthil Alias, Lagier Jean-Christophe, Pontarotti Pierre, Raoult Didier y Fournier Pierre-Edouard. (2015). The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Systematic and applied microbiology, 38*(4), 276-286.

Sanz Yolanda, Olivares Marta, Moya-Pérez Ángela y Agostoni Carlo. (2014). Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk. *Pediatric RESEARCH, 77*(1-2), 236-244.

Sanz Yolanda, Santacruz Arlette y Gauffin Paola. (2010). Probiotics in the defence and metabolic balance of the organism. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *Proceedings of the Nutrition Society, 69*(3), 434-441.

Sarkar Amar, Lehto Soili M., Harty Siobhán , Dinan Timothy G., Cryan John F. y Burnet Philip W.J. (2016). Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria Gut Brain Signals. *Cell Press, 39*(11), 763-781.

Simeoni Umberto, Berger Bernard, Junick Jana, Blaut Michael, Pecquet Sophie, Rezzonico Enea, Grathwohl Dominik, Sprenger Norbert y Brussow Harald. (2016). Gut microbiota analysis reveals a marked shift to bifidobacteria by a starter infant formula containing a synbiotic of bovine milk-derived oligosaccharides and Bifidobacterium animalis subsp. lactis CNCM I-3446. *Environmental microbiology*, 2185-2195.

Tai Ningwen , Wong F. Susan y Wen Li. (2015). The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 16*(1), 55-65.

Tavares da Silva Sandra, Araújo dos Santos Carolina y Bressnan Josefina. (2013). Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics. *Nutricion Hospitalaria, 28*(4), 1039-1048.

van Olden Casper, Groen Albert K. y Nieuwdorp Max. (2015). Role of Intestinal Microbiome in Lipid and Glucose Metabolism in Diabetes Mellitus. *Clinical Therapeutics, 37*(6), 1172-1177.

White Nicole D. . (2016). Gut Microbiota and Obesity: Potential Therapeutic Targets and Probiotic Treatment. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 1-3.

Xu Jinyu, Galley Jeffrey D., Bailey Michael T., Thomas-Ahner Jennifer M.,Clinton Steven K. y Olivo-Marston Susan E. (2016). The Impact of Dietary Energy Intake Early in Life on the Colonic Microbiota of Adult Mice. *Nature Scientific Reports*, 1-12.

XII. Anexos

12.1 Encuesta

Datos de Interés

		Fecha			
Nombre					
Edad					
Sexo	**Masculino**	**Femenino**			
Estado Civil	**Soltero**	**Casado**	**Otros**		
Teléfono					
Correo Electrónico					
Domicilio					
Estado		**Municipio**		**Colonia**	
Escolaridad					
Ocupación					
Peso (Kg)					
Estatura (m)					
IMC (Kg/m²)					
Circunferencia Abdominal (cm)					
Nivel Socioeconómico					

Sobrepeso	Obesidad	I	
		II	
		III	

Tipo de Nacimiento	Parto Natural	Cesárea	
Sabe cuál fue su peso al nacer			
Sabe durante cuánto tiempo recibió lactancia materna			
¿Recuerda desde qué edad ha tenido peso elevado?	Niñez	Adolescencia	Edad Adulta
¿Cuál cree que sea la causa de su obesidad?			
¿Ha realizado algún tratamiento contra la obesidad?	Si	No	
¿Cuántos tratamientos ha realizado y en que han consistido?			
¿Padece alguna enfermedad? ¿Cuál/es?			

Antecedentes

Antecedentes Familiares	Sobrepeso/Obesidad	Diabetes	Hipertensión Arterial	Enfermedades Cardiovasculares	Colesterol / Triglicéridos Elevados
Padece alguna enfermedad diagnosticada	Si	No			
Ha padecido alguna enfermedad importante	Si	No			
Toma algún medicamento	Si	No			

Dieta

Cuáles son sus horarios y hábitos de alimentación	a. Consume alimentos entre comidas					Si	No	Que:
	b. Horario de mayor ingesta de alimentos					Mañana	Tarde	Noche
	c. Preferencias por determinado tipo de alimentos							
	d. Lugares donde habitualmente come					Casa	Fuera	
Cuantas comidas hace al día					Porcentaje	%	%	
Tamaño de las raciones que consume	Pequeñas	Medianas	Grandes					
A que velocidad come usted	Lento	Moderado	Rápido					
Tiempo que tardo en comer	< 1/2 Hora	1/2 Hora	1 Hora	> 1 Hora				
¿Qué tipo de aceite o grasa utiliza para preparar sus alimentos?								
Frecuencia en el consumo de alimentos	Nunca	Ocasionalmente	2-3 veces por semana	4-5 veces por semana	Todos los días			
Fruta								
Verdura								
Huevo								
Leche/Productos Lácteos								
Carne de Res								
Carne de Pollo								
Pescados y Mariscos								
Pan								
Cereales								
Tortillas								
Comida Chatarra								
Comida Rápida								
Comida Preproceseda								
Suplementos								
Agua								
Refresco								
Leche								
Jugo								

Actividad Física

¿Cuál de las siguientes frases describe mejor su situación laboral en los últimos 12 meses?	Funcionario Publico	Empleado	Trabaja por cuenta propia	Estudia	Ama de Casa	Jubilado	Desempleado
¿Qué tipo de actividad supone su trabajo?	Vigorosa	Moderada					
¿Cuántos días a la semana despliega este tipo de actividad?	1-2 días	3-5 días	Diario				
¿Cuánto tiempo al día despliega este tipo de actividad?							

Practica usted algún deporte, ejercicio o actividad física	Si	No			
¿Qué deporte o actividad física realiza?					
Con qué frecuencia realiza deporte o actividad física	Diariamente	2-3 veces por semana	Semanalmente	Quincenalmente	Mensualmente
¿Cuánto tiempo al día dedica a este tipo de actividad?					
Camino diariamente al menos 30 minutos ininterrumpidos	Si	No			
Veo la televisión más de 2 horas al día	Si	No			
En un día característico ¿Cuánto tiempo pasa usted sentado o reclinado?					

Hábitos

¿Usted Fuma?	Si	No		
¿Fuma todos los días?	Si	No		
¿Qué edad tenía usted cuando empezó a fumar?				
¿Alguna vez ha consumido bebidas alcohólicas, como cerveza, vino, licor, etc.?	Si	No		
¿Con que frecuencia consume bebidas alcohólicas?	Diariamente	Semanalmente	Mensualmente	Ocasionalmente
¿Qué edad tenia usted cuando empezó a consumir bebidas alcohólicas?				

Como si estoy bajo de ánimos	Si	No
Como si estoy estresado o con ansiedad	Si	No
Cuando estoy aburrido me da hambre	Si	No

Notas:

12.2 Carta de Consentimiento Informado

Puebla, Pue., a _____ de _____ de 2017

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE

Yo _____ he entendido y comprendido la información que se me proporcionó con respecto a mi participación en el proyecto de investigación denominado "Relación entre factores ambientales, microbiota y obesidad". Mis dudas con respecto a dicha participación han sido respondidas de manera satisfactoria. Se me ha informado que los datos obtenidos en el estudio, serán publicados con fines científicos. Acepto participar en este estudio de investigación, donde proporcionare de manera voluntaria diversas muestras biológicas.

_____

FIRMA DEL PACIENTE
(Padre o Tutor)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL INVESTIGADOR

Yo **Marco Angel Simoni Berra** he explicado al paciente _____ el objetivo del proyecto de investigación, así como los procedimientos que se emplearan en la toma de muestra, también he constatado las dudas y preguntas del paciente involucrado en la investigación. Por último, esta investigación se llevará a cabo bajo criterios éticos del estudio, aplicando el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; Titulo Segundo; De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos; Capítulo I; Articulo 17; Categoría II Investigación con riesgo mínimo.

_____

Firma del Investigador