

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

PROTOCOLO DE TESIS

Evaluación de la interacción entre el consumo de macronutrientes y el perfil de la microbiota del colon distal y su asociación con obesidad infantil.

Doctorado en Ciencias en Salud Pública concentración
en Enfermedades infecciosas.

MC. Barbara Ixchel Estrada Velasco

Comité de Tesis:

Director: Dra. Ana Isabel Burguete García

Asesores:

Dr. Miguel Cruz López

Dra. M. Remedios Guna Serrano

Dr. Jaime García Mena

Cuernavaca, Morelos. noviembre de 2012

Contenido	
1 INTRODUCCIÓN	3
2 ANTECEDENTES	6
3 JUSTIFICACIÓN	9
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
5. HIPÓTESIS	9
6 OBJETIVOS	10
6.1 Objetivo general.....	10
6.2 Objetivos particulares	10
7 METODOLOGÍA.....	10
7.1 Diseño y Población	10
7.2 Estudios bioquímicos y antropométricos.....	11
7.3 Caracterización de la microbiota.....	12
7.3.1 Extracción de DNA genómico a partir de heces.....	12
7.3.2. Caracterización de microbiota por PCR tiempo real	13
7.4 Análisis de dieta.....	15
7.5 Análisis estadístico	16
7.6 Operacionalización de variables	17
8 INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE.....	17
9 RESULTADOS ESPERADOS.....	18
10 CRONOGRAMA.....	20
BIBLIOGRAFÍA	21

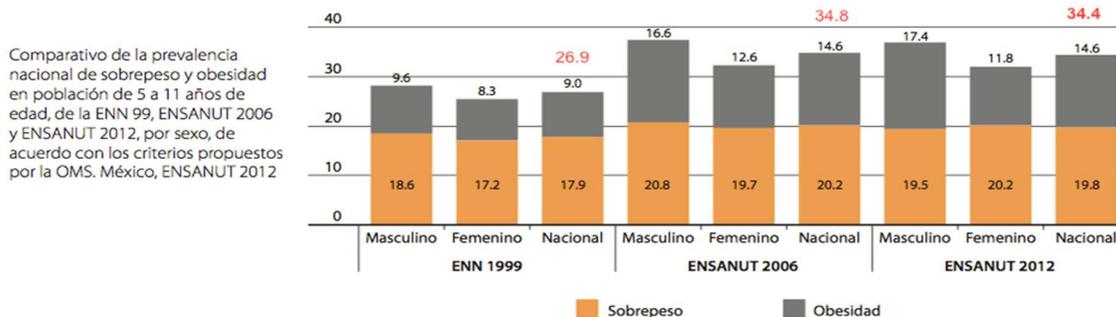
EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL CONSUMO DE MACRONUTRIMENTOS Y EL PERFIL DE LA MICROBIOTA DEL COLON DISTAL Y SU ASOCIACIÓN CON OBESIDAD INFANTIL.

1 INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial, caracterizada por un grupo de desordenes metabólicos, inflamación de bajo grado y aumento de la grasa corporal, cuya magnitud y distribución condicionan la salud del individuo. Es el principal factor de riesgo para diferentes enfermedades crónicas, incluyendo diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer.¹

El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. Cada año fallecen por lo menos 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad. Además, el 44% de la carga de diabetes, el 23% de la carga de cardiopatías isquémicas y entre el 7% y el 41% de la carga de algunos cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad. En 2010, alrededor de 43 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso. En los países en desarrollo hay cerca de 35 millones de niños con sobrepeso, mientras que en los países desarrollados son 8 millones.¹

Las tasas de prevalencia varían considerablemente entre las diferentes regiones y países, de menos de un 5% en África y partes de Asia a más de un 20% en Europa y más del 30% en América y algunos países de Medio Oriente. En México, se observa un acelerado crecimiento en la prevalencia de obesidad y sobrepeso. De acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999 (ENN-99),² casi el 27% de los niños en edad escolar con edades comprendidas entre los 5 y 11 años eran obesos o con sobrepeso. En 2006, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reveló que este porcentaje había aumentado al 34.8%, lo que representa un aumento del 29% en 7 años.³ Para el año 2012 la ENSANUT⁴ reporta una prevalencia de 34.4%, prácticamente sin movimiento, y con lo cual, México es el país con mayor prevalencia de obesidad infantil a nivel mundial.



Su etiología es multifactorial, se desarrolla a partir de la interacción de factores modificables o ambientales (sociales, conductuales, psicológicos) y no modificables (genéticos). Entre los factores ambientales encontramos los relacionados con los estilos de vida, como los cambios de hábitos alimentarios, la disminución de la actividad física propiciada por el sedentarismo y la composición de la microbiota intestinal. Igualmente encontramos una mayor disponibilidad de alimentos, especialmente de más alta densidad de energía, y una forma más eficiente de producirlos y adquirirlos. El proceso de modernización y reestructuración socioeconómica en los países desarrollados y en vías de desarrollo, ha modificado los modelos nutricionales y de actividad física.¹

El papel de la dieta en la etiología de la mayoría de las enfermedades no transmisibles está bien establecido. Los cambios hacia alimentos muy refinados, bebidas azucaradas, carne y productos lácteos que contienen altos niveles de grasas saturadas, es decir, la transición nutricional, es ahora cada vez más evidente en países en vías de desarrollo y junto con la disminución del gasto energético, están contribuyendo al incremento en la prevalencia de la obesidad.⁵

Un ambiente obesigénico aumenta el riesgo de obesidad, en particular en aquellos que ya son genéticamente susceptibles.⁶ Los cambios en la alimentación y en el estilo de vida que acompañan a la urbanización y el desarrollo de las sociedades han favorecido la expresión de los genes que predisponen a la obesidad y, a su vez, han modificado los patrones de salud y enfermedad.

Se han identificado genes que intervienen en el mantenimiento estable del peso y de la grasa corporal, a través de su participación en el control de mecanismos eferentes (ej. leptina, nutrientes, señales nerviosas), de mecanismos centrales (neurotransmisores hipotalámicos) y de mecanismos aferentes (ej. insulina, catecolaminas, SNV).⁷ El tejido adiposo en individuos obesos se caracteriza por presentar un fenómeno inflamatorio que incluye el aumento en el infiltrado de macrófagos y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-6).^{8,9}

Los seres humanos son organismos altamente complejos cuyo metabolismo representa una amalgama de propiedades microbianas y humanas.¹⁰ La microbiota humana consiste en alrededor de 10 a 100 billones de microorganismos, representando al menos 10 veces más el número de células humanas. Su microbioma codifica a un conjunto de genes que representan en promedio 100 veces más el genoma humano. La microbiota y su microbioma nos proveen de importantes funciones biológicas y metabólicas que no pueden ser realizadas por el metabolismo humano.¹¹

La mayoría de estos microorganismos habitan las vías gastrointestinales. La microbiota intestinal incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de especies que se encuentran transitoriamente en el tubo digestivo, siendo el mayor número de residentes los que se encuentran en el colon distal, donde se sintetizan aminoácidos esenciales, vitaminas y se digieren componentes de nuestra dieta como polisacáridos de plantas.¹²

En el interior del intestino se han descrito alrededor de 70 divisiones de bacterias y 13 divisiones de arqueas diferentes, siendo los más frecuentes dos *filum* bacterianos específicos: *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, que incluyen cientos de filotipos.¹⁰

Los *Bacteroidetes* son un filo con alrededor de 20 géneros. Se encuentran en el tracto intestinal y membranas mucosas de muchos animales de sangre caliente, pero también son abundantes en el suelo y el agua de mar. El género *Bacteroides* probablemente el más abundante en el intestino humano. Sus especies son anaerobios obligados, habitantes benignos del intestino. *Bacteroides thetaiotaomicrones* una de las especies más abundantes.¹³

Los *Firmicutes* son el mayor filo de bacterias grampositivas. Contiene más de 250 géneros, incluyendo *Lactobacillus*, *Micoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium*. Se encuentran en diversos hábitats e incluyen algunos patógenos notables, como el *Streptococcus pyogenes*.¹³

Existe un gran interés en esta área de investigación dado que la manipulación de los grupos de bacterias intestinales podría ofrecer un nuevo enfoque en el tratamiento de la obesidad, debido a que ésta muestra un componente microbiano: es decir, no solamente la dieta y la baja actividad física sino también el conjunto de microorganismos presentes en el tracto intestinal y sus genes podrían modificar el comportamiento de los genes humanos alterando el metabolismo, detonando

así la obesidad, cuestión que podría tener potenciales implicaciones terapéuticas a nivel de salud pública.

2 ANTECEDENTES

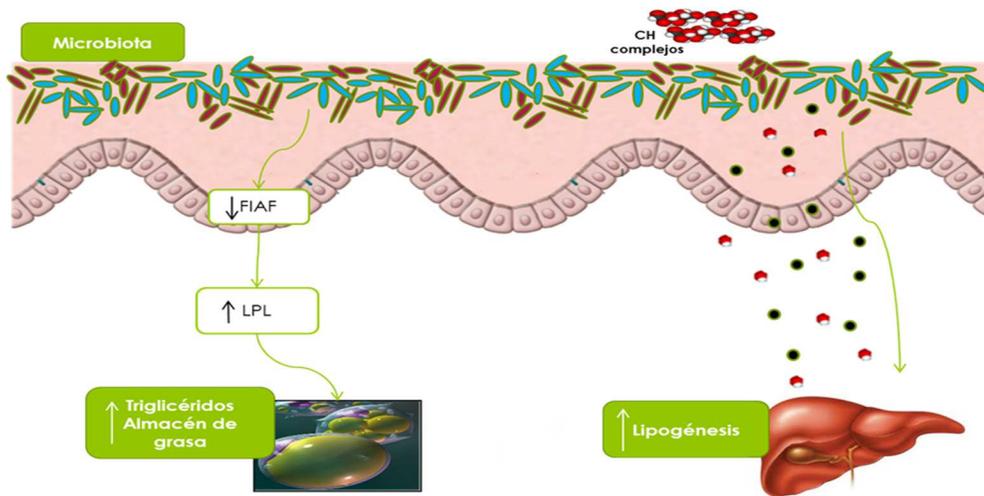
Se estima que de 2 a 4 millones de genes integran el genoma total (microbioma) de una comunidad de 500 a 1000 especies de bacterias intestinales.^{14,15} Los productos de estos genes proporcionan capacidades metabólicas que no codifica nuestro propio genoma.¹⁶ La microbiota del tracto digestivo y sus genes, contribuyen funcionalmente al desarrollo temprano del sistema inmune¹⁷, síntesis de nutrientes por aprovechamiento de fuentes de otra manera no disponibles¹⁸, procesamiento de xenobióticos, síntesis de vitaminas y renovación de células epiteliales del colon.¹⁰ Por lo tanto pueden tener un impacto en nuestro equilibrio energético.

Este cambio afecta a varios mecanismos: la fermentación microbiana de los polisacáridos de la dieta que no pueden ser digeridos por el huésped, posterior absorción intestinal de monosacáridos y de ácidos grasos de cadena corta, su conversión a lípidos más complejos en el hígado y la regulación microbiana de genes del huésped que promueven la deposición de los lípidos en los adipocitos.¹⁹ La microbiota actúa como un órgano de intensa actividad metabólica, expresa enzimas glicósido hidrolasas que los humanos no codifican en su genoma. Estas enzimas transforman polisacáridos complejos (almidón y celulosa) de la dieta a monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato. El propionato y el acetato son ligandos de los receptores acoplados a la proteína G (Gpr41 y Gpr43), expresados fundamentalmente por las células enteroendocrinas del epitelio intestinal. Los GPCRs inhiben la expresión del péptido YY (anoréxico, acelera el tránsito intestinal y reduce la extracción de energía de la dieta). Los monosacáridos absorbidos estimulan factores de transcripción claves como la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), factor que estimula la lipogénesis hepática.¹¹

La microbiota intestinal suprime la actividad del FIAF (fasting-induced adipocyte factor), lo que produce un incremento de la lipoprotein lipasa (LPL) que conduce a un aumento de los triglicéridos en el tejido adiposo. A la vez la microbiota intestinal aumenta la absorción de polisacáridos lo cual aumenta la lipogénesis a nivel hepático.¹¹

Con base a lo anterior se ha propuesto que la microbiota de individuos obesos puede ser más eficiente en la extracción de energía a partir de una dieta determinada en comparación a la microbiota de los individuos delgados.¹⁵ Es decir una descompensación de los conjuntos bacterianos residentes en el intestino puede ser responsable de la obesidad.

Microbiota y obesidad.



Modificado de Cani P and Delzenne N. 2009.

Las variables que determinan el tipo de microbiota en el hospedero están determinadas por el estilo de vida (consumo y gasto de energía), el genotipo, patobiología, ambiente, fisiología, sistema inmune y comunidad.²⁰ Por lo tanto, una vista global de nuestro panorama genético debe incluir los genes ubicados en nuestro genoma humano y los genes en nuestra microbiota residente, mientras que una visión global de nuestro metaboloma abarcaría las redes metabólicas basadas en nuestras comunidades microbianas.¹⁰

La sociedad hospedero-microbioma genera interacciones nuevas dependientes de la dieta, el genoma del hospedero y la composición de la flora bacteriana, produciendo metabolitos que se absorben y en algunos casos pueden disminuir el estado inflamatorio debido a la obesidad.²¹

La alteración en la microbiota, microbioma y/o su expresión acarrearán problemas a la homeostasis humana. Se han observado diferencias análogas en la microbiota intestinal distal de humanos obesos en comparación con humanos delgados; la abundancia relativa de *Bacteroidetes* aumenta cuando individuos obesos pierden peso ya sea con dieta restringida en grasa o una dieta con carbohidratos bajos en

calorías. Por otra parte, el aumento de *Bacteroidetes* está significativamente correlacionado con la pérdida de peso pero no con la ingesta total de calorías.¹³

Las bifidobacterias reducen niveles de endotoxinas intestinales y mejoran la funcionalidad de la mucosa intestinal.²² Los polisacáridos de las plantas que se consumen comúnmente son ricos en carbohidratos que contienen xilano, pectina, y arabinosa. El genoma humano carece de la mayoría de las enzimas necesarias para degradar estos glicanos. Sin embargo, el microbioma del colon distal nos ofrece esta capacidad.¹⁰

Estudios en adultos sanos han encontrado que las bacterias probióticas tienen efectos antiinflamatorios que pueden reducir los niveles séricos de proteína C-reactiva.²³

Estudios en ratones, han mostrado que la eficiencia de obtención de nutrientes a partir de una misma fuente alimenticia, depende de la microbiota y microbioma del colon, ya que la microbiota proveniente de un ratón obeso es capaz de incrementar significativamente la adiposidad en un ratón magro luego de colonizar su colon.²¹ Otro estudio realizado en hamsters proporciona evidencia de que la modulación de la interrelación metabólica microbiota-hospedero a través de la intervención dietética tiene el potencial de mejorar la homeostasis del colesterol, lo cual es relevante para la salud cardiovascular.²⁴ Se cree que un desbalance en el microbioma contribuye al desarrollo de obesidad incrementando el metabolismo de los ácidos grasos y el almacenamiento de grasa por aumento de las citocinas inflamatorias y de lipogénesis hepática.²⁵

Actualmente el microbioma de la microbiota de cualquier nicho puede caracterizarse rápidamente usando tecnología de pirosecuenciación de DNA, que permite tener lecturas de aproximadamente 100 Mbps en segmentos de 400 bases rápidamente.²⁶ Estas secuencias son analizadas por varios algoritmos computacionales, caracterizando el conjunto de genes presentes o expresados en un ambiente microbiano; definiendo las posibles vías metabólicas y/o caracterizando la diversidad microbiana con base a las secuencias 16S rDNA.²⁷

La microbiota residente del colon, caracterizada por un perfil de genes que permiten una mejor eficiencia de obtención de nutrientes a partir de una fuente alimenticia, promueve el ingreso abundante de glucosa y otras fuentes de carbono como los ácidos grasos, de tal forma que hay un incremento de células adiposas y peso corporal, dando origen a la obesidad y alterando la respuesta inmune, lo que constituye el proceso proinflamatorio de baja intensidad permanente.²⁸

3 JUSTIFICACIÓN

En México la obesidad infantil es un problema prioritario de salud pública, con impacto negativo en la edad adulta debido a sus comorbilidades.

Las evidencias de asociación de la microbiota del colon distal con padecimientos prioritarios para nuestro país como la obesidad, suman valor a su estudio y caracterización. Estudios recientes han demostrado que algunas bacterias intestinales participan como mediadores de obesidad.

Se necesita una mejor comprensión de los mecanismos mediante los cuales la microbiota interactúa con el hospedero y su asociación con obesidad. Por lo tanto, se requiere caracterizar este tipo de factores para comprender como participan en el desarrollo de la obesidad e integrar el conocimiento a los programas de prevención en la población mexicana.

En México no se han reportado estudios que estén encaminados a definir la microbiota de la población infantil, tampoco de su asociación con la obesidad. Los resultados de este estudio podrían producir evidencia relevante para el desarrollo de estrategias de prevención y manejo de la obesidad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre el perfil de la microbiota del colon distal y obesidad infantil?

¿El efecto de la microbiota del colon distal sobre la obesidad infantil se modifica dependiendo del consumo de macronutrientes?

5. HIPÓTESIS

En población infantil, el consumo de ciertos macronutrientes produce una disbiosis de la microbiota del colon distal que se relaciona con incremento en el grado de adiposidad.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Evaluar la interacción entre el consumo de macronutrientes y el perfil de la microbiota del colon distal y su asociación con el desarrollo de obesidad infantil.

6.2 Objetivos particulares

1. Determinar el grado de adiposidad en la población de estudio.
2. Caracterizar los perfiles de la microbiota del colon distal en la población de estudio.
3. Determinar el consumo de macronutrientes por grado de adiposidad e identificar patrones de alimentación.
4. Correlacionar el perfil de microbiota con el grado de adiposidad en la población de estudio.
5. Evaluar la modificación del efecto del perfil de microbiota sobre el grado de adiposidad dependiendo del consumo de macronutrientes.

7 METODOLOGÍA

7.1 Diseño y Población

El diseño epidemiológico del estudio es transversal y parte del proyecto titulado "PROYECTO: GENÉTICA DE LA OBESIDAD EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA" llevado a cabo en conjunto con la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, y el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) con registro por la Comisión Nacional de Investigación del IMSS 2006-785-072.

Se seleccionaron 318 muestras del banco de biológicos que incluye niños entre 6 a 14 años de edad, no relacionados que se presentaron en la Unidad Deportiva Cuauhtémoc, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se excluyeron a los niños con diagnóstico de enfermedad infecciosa y los que presentaran desórdenes gastrointestinales al momento de la entrevista, y los que hayan tomado antibióticos durante dos meses previos al estudio. A los niños y padres de familia seleccionados se les explicó el proyecto, y se les pidió la firma del consentimiento y asentimiento informado para participar en el mismo. Posteriormente se aplicó un cuestionario a través del cual se obtuvieron datos socioeconómicos, demográficos,

patológicos personales y heredofamiliares, de consumo de alimentos y actividad física, así como la toma de muestra de sangre venosa y recolección de muestra de heces.

Con un tamaño de muestra de 318 niños que cumplen con los criterios de inclusión, el poder del estudio es del 93% con un alfa de 0.05, considerando que la prevalencia nacional de obesidad es del 26% y la prevalencia encontrada nuestra muestra es del 35%.

7.2 Estudios bioquímicos y antropométricos

Las muestras de sangre se tomaron en ayuno de 12h, para medir glucosa, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y niveles de insulina. Se determinaron los perfiles bioquímicos de acuerdo a los criterios de la American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute Scientific Statement (AHA/NHLBI).²⁹

Las medidas antropométricas incluyen peso (kg), talla (cm), circunferencia de cintura (cm), circunferencia de cadera (cm) y el índice de masa corporal (IMC, kg/m²). La toma de las medidas se realizó por personal previamente capacitado y estandarizado, utilizando técnicas e instrumentos calibrados y estandarizados, con los niños sin zapatos y con la mínima cantidad de ropa. La clasificación de sano, sobrepeso y obesidad se realizó de acuerdo al puntaje z de IMC por edad y sexo, conforme a las referencias de la OMS/CDC;³⁰ con los siguientes puntos de corte:

Clasificación	Puntaje z
Normal	-2 a +1 DE*
Sobrepeso	>+1 DE
Obesidad	>+2 DE

DE: desviación estándar

Las presiones sistólica y diastólica se midieron con esfigmomanómetros calibrados después de permanecer sentados en reposo por lo menos 5 minutos. Se realizaron dos mediciones para obtener un promedio. Todas las mediciones se realizaron por personal capacitado.

7.3 Caracterización de la microbiota

A partir de muestras de heces de los participantes se llevará a cabo la extracción de ácidos nucleicos y se caracterizará la diversidad de los microorganismos presentes en el colon distal, con base a secuencias 16S rDNA.

7.3.1 Extracción de DNA genómico a partir de heces.

La extracción de los ácidos nucleicos se llevara a cabo con el kit de QIAamp® DNA Stool Mini Kit for human. La muestras tendrán un peso de 180 a 220 mg. Se añadirá 1.6 de buffer ASL, mezclar continuamente por 1 min. Se centrifugará por 1 min a 14,000rpm (para sedimentar las partículas de heces). Agregar 1.4 ml del sobrenadante a un tubo de 2ml. Se agregara una pastilla de Inhibitex (inhibidor de RNAsas) y mezclara inmediatamente, hasta disolver por completo la pastilla. Se incubara por 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugara por 3 minutos para sedimentar las partículas de heces y lograr que los inhibidores se unan a la matriz. Se extraerá el sobrenadante del tubo eppendorf. Se centrifugara por 3 minutos a 13,000 rpm. Se agregara 25µL de proteinasa K. Se añadirá 600 µL de buffer AL y mezclar por 15 minutos. Incubar a a 70°C por 10 min . Se añadirá 600 µL de etanol (96 al 100%) para lisar las células y mezclara. Se tomará 600 µL del producto lisado y se colocara en la columna QIAamp spin (hacerlo por triplicado). Se agregará 500 µL de buffer AW1, centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm. Se cambiara la columna a un tubo nuevo y añadirá 500 µL de buffer AW2 y centrifugara por 3 minutos. Por último se añadirá 200 µL de buffer AE directamente a la membrana, se incubara por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto. Se tomara 1µL de DNA el cual se cuantificará a 260 nm en el equipo Nanodrop (Thermo scientific). Se almacenara a -20°C para su posterior uso.

7.3.2. Caracterización de microbiota por PCR tiempo real

Para el análisis de la microbiota vamos a utilizar un método de qPCR utilizando cebadores universales y específicos:

Especificidad	Nombre	Secuencia
Universal	926F	AAACTCAAAGGAATTGACGG
	1062R	CTCACRRCACGAGCTGAC
Bacteroidetes	798cfbF	CRAACAGGATTAGATACCCT
	cfb967R	GGTAAGGTTCTCGCGTAT
Firmicutes	928F-Firm	TGAAACTYAAAGGAATTGACG
	1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC
α -Protobacteria	α 682F	CIAGTGTAGAGGTGAAATT
	908 α R	CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT
γ -Protobacteria	1080 γ F	TCGTCAGCTCGTGTGTGA
	γ 1202R	CGTAAGGGCCATGATG
Actinobacteria	Act920F	TACGGCCGCAAGGCTA
	Act1200R	TCRTCCCCACCTTCCTCCG

Cada reacción de PCR tendrá 12.5 μ L de 2x Faststart SYBR green (applied biosystem®), 10 μ L de cada primer (concentración de 0.25 mM), 2.5 μ L del templado de DNA y se llevaran a un volumen final de 25 μ L. Se establecieron las condiciones de amplificación las cuales constan de 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 95°C y 61.5°C por 15 segundos y 72°C por 20 segundos, 1 ciclo a 72°C por 5 minutos.

El análisis de las amplificaciones de PCR en tiempo real se llevara a cabo en el equipo ABI PRISM- 7900HTsequence detection system de Applied Biosystems,

las muestras se procesaran en una placa de 384 pozos; dicho análisis está basado en la amplificación exponencial de un fragmento específico del DNA de nuestro interés. Las sondas Sybeer green se intercalaran en el surco menor del DNA y el resultado de la cuantificación se observara en una gráfica de amplificación donde se expresara la cantidad de la fluorescencia obtenida en el eje de las ordenadas y el número de ciclos del PCR en el eje de las abscisas; también se observara la línea base, que indica los ciclos iniciales en la que los cambios no son detectables, el umbral en el que se detectara un cambio significativo de la fluorescencia y el Ct. (que indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanzo el valor del umbral).³¹

La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

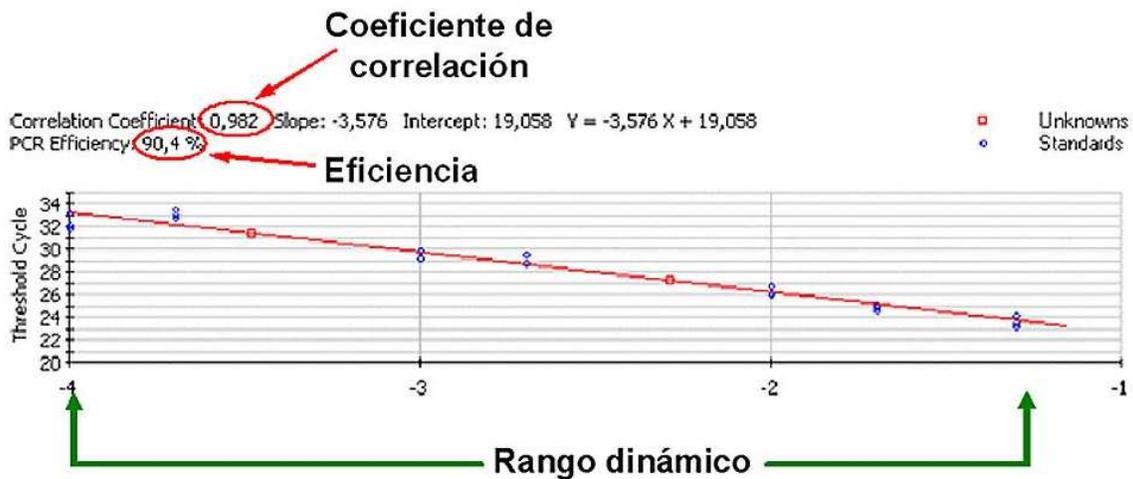


Figura 2

Para validar un protocolo de PCR con el objetivo de realizar cuantificaciones, se debe elaborar una recta de regresión a partir de concentraciones conocidas y decrecientes de DNA diana, estimando a partir de esta recta tres parámetros principales: eficiencia, coeficiente de correlación y rango dinámico. El protocolo de PCR cuantitativa se aceptará como válido cuando los parámetros obtenidos sean del orden de $E \geq 80\%$ y $r \geq 0,95$ dentro del rango dinámico establecido (Ver figura 2).

La especificidad de los primers se infiere a partir del desplazamiento del ciclo umbral (Ct), obtenido por amplificación de secuencias diana en comparación con secuencias universales.³²

$$X = \frac{(\text{Eff. Univ})^{\text{Ct univ.}}}{(\text{Eff. Spec})^{\text{Ct spec}}} * 100$$

Donde: Eff Univ.= eficiencia calculada de los primers universales

Eff Spec.= eficiencia de los primers específicos de cada taxón.

Cts (univ y específicos)= los ciclos umbral registrados en el t termociclador.

X= representa el **porcentaje** de número copias de 16S cada taxón existente en una muestra.

Se realizará la cuantificación de la abundancia relativa Firmicutes/Bacteroidetes con base a sus porcentajes. Y finalmente se clasificará de acuerdo al porcentaje Firmicutes/Bacteroidetes en cada grupo por Z-Score IMC para la edad.

7.4 Análisis de dieta.

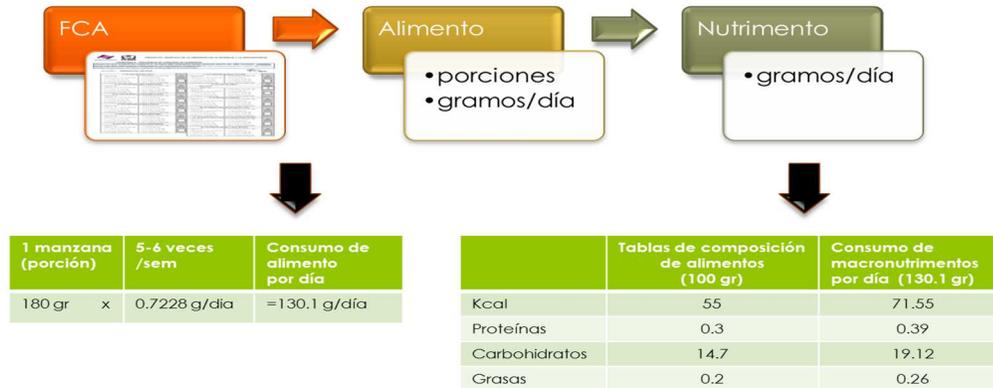
Para determinar el consumo de macronutrientes e identificar patrones de alimentación, se realizará un análisis a partir de la información obtenida del Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FCA).

Dicho cuestionario es un instrumento semicuantitativo e incluye preguntas sobre la frecuencia de consumo y porciones de 107 alimentos, divididos en 11 secciones: Productos lácteos, Frutas, Verduras, Leguminosas, Huevos, carnes y embutidos, Platos típicos, Cereales, Bebidas, Golosinas y postres, Grasas, y Suplementos.

Los gramos por porción de cada alimento de la FCA están basados en las utilizadas para la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENSANUT). De acuerdo a la frecuencia que se reporta (veces al mes, veces a la semana, veces al día), se calcula un promedio de consumo al día, el factor obtenido se multiplica por los gramos de alimento que equivale a la porción y se obtiene así la cantidad en gramos por día que el niño consume cada uno de los alimentos.

La cantidad de gramos al día de alimento se analiza con el programa FoodProcessor, que contiene la información de las Tablas de Composición de Alimentos, (cantidad de gramos de proteínas, carbohidratos y grasas contenidos en 100g de alimento). Obteniendo finalmente el consumo en gramos al día de cada macronutriente por cada individuo.

3. Determinar el consumo de macronutrientos e identificar patrones de alimentación.



*por individuo

7.5 Análisis estadístico

Los resultados se clasificarán para construir bases de datos. En el primer análisis se realizará un estudio descriptivo de los datos cuantitativos, obteniendo para las variables cualitativas tablas de frecuencias y porcentajes y realizando los gráficos más adecuados. Adicionalmente se aplicará el test de normalidad de Shapiro-Wilk a cada una de las muestras en cada parámetro estudiado. Las variables no normales serán transformadas adecuadamente. En caso necesario se aplicarán tests no paramétricos.

Posteriormente se realizarán modelos de regresión logística multinomial para evaluar la asociación de los perfiles de microbiota con cada categoría de IMC. Así como evaluar si la interacción entre de los perfiles de microbiota el consumo de macronutrientos, modifica la asociación con cada categoría de IMC.

Todos los modelos serán ajustados por edad, sexo, nivel de educación y antecedente heredofamiliar de obesidad.

7.6 Operacionalización de variables

Variable	Definición teórica	Operacionalización	Tipo de variable	Unidad de medición o codificación
Dependiente Índice de masa corporal (IMC)	Indicador del peso corporal para clasificar obesidad	Peso (kg) entre Talla al cuadrado (m ²). Clasificación OMS/CDC	Cualitativa Ordinal Politómica	0= Normal 1= Sobrepeso 2= Obesidad
Independientes Perfil de microbiota	Abundancia relativa de Bacteroidetes y Firmicutes	Relación Bacteroidetes/ Firmicutes	Cuantitativa continua	Porcentaje
Dieta	Conjunto de alimentos consumidos	Gramos de macronutrientes consumidos en un día	Cuantitativa continua	gr/día
Covariables Edad	Periodo entre la fecha de nacimiento y la fecha actual	Años cumplidos al momento que se realizó la entrevista	Cuantitativa Discreta	Años
Sexo	Distinción de genero entre hombre y mujer	Autoreporte al momento de la entrevista	Cualitativa Dicotómica Nominal	0= hombre 1= mujer
Nivel educación	Nivel máximo de estudios aprobado por un individuo.	Autoreporte al momento de la entrevista	Cualitativa Ordinal	0=Primaria o > 1=Secundaria 2=Media superior 3=Universidad o <
Antecedentes heredofamiliar de obesidad	Presencia de obesidad en padres o abuelos.	Autoreporte al momento de la entrevista	Cualitativa Dicotómica Nominal	0=no 1=si

8 INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE

Se cuenta con la infraestructura del laboratorio de la Sección de Genómica y Epidemiología genética del INSP, la cual cuenta con equipo de alto rendimiento como un PCR de Tiempo Real, y una unidad de pirosecuenciación con el equipo GS FLX System 454.

Además se cuenta con centrifugas refrigeradas, microcentrífugas, micropipetas de distintos volúmenes y pipetas multicanal. Área para extracción de DNA, centrífuga para disección “speed-vac”, Área estéril y campana de flujo laminar. Área para pre-PCR, Área para post-PCR, un espectrofotómetro, termocicladores convencionales y el termociclador 7900HT (Applied Biosystems). Cámaras de electroforesis verticales y horizontales y lector de geles y refrigeradores, congeladores, y otros equipos diversos.

9 RESULTADOS ESPERADOS

Análisis de la base de datos con características sociodemográficas, antropométricas y perfil bioquímico.

Identificar si el consumo de macronutrientes específicos favorece la acumulación de grasa corporal para el valor esperado según el sexo, talla y edad.

Identificar si los diferentes perfiles de microbiota del colon distal modifican el efecto sobre el grado de adiposidad dependiendo de la dieta.

Desarrollo y escritura de documentos científicos para la difusión de resultados, desarrollo de tesis de Doctorado y obtención del grado.

Los resultados ofrecerán una nueva visión de los mecanismos biológicos de la obesidad y permitirá diseñar nuevas estrategias para optimizar nuestra nutrición personal. Se espera publicar los resultados de este proyecto en al menos tres artículos en revistas de impacto a nivel internacional. La presentación de trabajos arbitrados en congresos científicos de reconocido prestigio.

Derivados de los productos anteriormente citados se obtendrán los siguientes impactos:

- 1) Científico: el conocimiento integrado de factores o elementos que involucran al paciente como entidad biológica, la microbiota, la dieta y a los posibles co-factores es fundamental para la implementación de programas de prevención y para el manejo óptimo de los recursos disponibles en el tratamiento y seguimiento de la obesidad. Mediante el estudio de la interacción entre la microbiota y el consumo de macronutrientes, se pretende determinar el perfil bacteroidete/firmicute en cada grupo de Z-score IMC para la edad, y comparar la magnitud del efecto dependiente del consumo de macronutrientes, estableciendo potenciales redes de regulación metabólica. La obtención de información de la microbiota del microbioma residente en el colon de población Mexicana sana y la asociada con manifestaciones fenotípicas de una enfermedad crónica como la obesidad servirán de base para desarrollar pruebas cuantitativas de abundancia de fila bacterianos para predecir e identificar población en riesgo de obesidad y prevenir sus complicaciones.
- 2) Tecnológico: para abordar la génesis de esta enfermedad, es necesario investigar de qué forma los factores de riesgo presentes en el medio ambiente interactúan entre si. De tal manera que se pueda desarrollar un sistema de detección de la población susceptible, a la cual se debe

intervenir para disminuir los índices de morbilidad y mortalidad por esta enfermedad. Con este conocimiento se podrán establecer programas sobre el tipo de alimentación saludable que modifique la microbiota para el restablecimiento de la flora intestinal normal. La presente propuesta y el desarrollo de su plan general permitirá conjuntar tres áreas del conocimiento: médica, genómica y biotecnológica para abordar un aspecto fundamental de un problema de salud prioritario en México para el cual se pretende desarrollar tecnología propia y útil para su análisis, prevención y tratamiento por medio de métodos de diagnóstico y manejo del paciente más baratos.

- 3) Social: El crecimiento de la obesidad infantil en México es un problema social alarmante, ya que es la principal causa enfermedades crónicas y por otro lado condiciona a una calidad de vida deficiente. Sabemos que la alteración del equilibrio entre los filos bacterianos de la microbiota condicionan a alteraciones metabólicas producen diversos padecimientos entre ellos la obesidad, por lo que es urgente determinar como la dieta en nuestra población infantil modifica la flora normal a la flora metabólicamente patógena. Demostrar como los malos hábitos de alimentación modifican la flora intestinal y tiene efectos deletreos en la salud ofrecerá estrategias de prevención de obesidad y otras enfermedades crónico-degenerativas con el fin de mejorar la calidad de vida, con base al cuidado de su alimentación.
- 4) Económico: La obesidad ha rebasado a los sistemas de salud, tanto en atención como en gastos debido a sus comorbilidades, por esto es necesario establecer y promover programas de fomento de dieta sana a nivel nacional, para disminuir la presencia de micro-organismos no deseables en el colon de la población Mexicana y establecer estrategias de intervención en los grupos de pacientes con obesidad para que con un cambio planeado y vigilado en la dieta, reduzcan el costo de tratamiento y sufrimiento de enfermedades futuras.
- 5) Ambiental: Hasta el momento actual se tiene poco conocimiento sobre la flora intestinal metabólicamente patógena y sus consecuencias en los trastornos metabólicos como la obesidad. Este trabajo permitirá entender de una mejor manera, otro aspecto de cómo se modifica la condición de salud, por la influencia que el ambiente tiene sobre la diversidad de su microbiota residente en el colon distal.

10 CRONOGRAMA

Metas	Etapa I	Etapa II
Extracción de DNA de heces del 100% de los niños incluidos en el estudio.		
Diseño de la estrategia para la determinación del perfil de la microbiota y generación de las librerías genómicas.		
Clasificación del 100 % de los niños por grado de adiposidad (Z score para la edad).		
Construcción de la base de datos de dieta, cálculo del consumo de macronutrientes.		
Determinación de la diversidad de la microbiota a partir del DNA extraído del 100% de las muestras de heces.		
Generación y construcción de los perfiles por abundancia relativa de Bacteroidetes y Firmicutes.		
Evaluar las asociaciones entre la microbiota y el grado de adiposidad.		
Redacción de documento de Tesis y artículos científicos publicables.		

BIBLIOGRAFÍA

1. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N°311. Organización Mundial de la Salud. Marzo de 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>
2. Rivera-Dommarco J S-LT, Villalpando-Hernández S, González-Cossío T, Hernández-Prado B, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2001.
3. Olaiz-Fernández G R-DJ, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2006.
4. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
5. Heitmann B, Koplan J, Lissner L. Childhood obesity: success and failures of preventive interventions. *Nutrition Reviews* 2009; 67 suppl. 1: S89-S93.
6. R.J. F. Loos. Recent progress in the genetics of common obesity. *Br J Clin Pharmacol.* 2009; 68: (6)811–829.
7. Martínez JA, Frühbeck G. Regulation of energy balance and adiposity: a model with new approaches. *J Physiol Biochem* 1996; 52: 255-258.
8. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic Influences of Adiponectin on Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Diabetes* 2007; 56: 1198–1209.
9. Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 1: 84-91.
10. Gill S, Pop M, DeBoy R, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 2006; 312: 1355.
11. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15: 1546-1558.
12. Bäckhed F, Ley R, Sonnenburg J. et al. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 2005; 307: 1915-20.
13. Ley E, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444: 21-23.
14. Hooper L, Gordon J. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* 2001; 292(5519): 1115.
15. Turnbaugh P, Ley R, Hamady M, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon J. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449(7164): 804-810.
16. Hooper L, Midtvedt T, Gordon J. How Host-Microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* 2002; 22: 283.

-
17. Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 2002; 347(12):869-77.
18. Flint H, Duncan S, Scott K, Louis P. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environmental Microbiology* 2007; 9(5):1101-1111.
19. Backhed, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2004; 101:15718–23.
20. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science* 2008; 320:1647-51.
21. Turnbaugh P, Ley R, Mahowald M. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:21-28.
22. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia.* 2007; 50:2374-2383.
23. Kekkonen RA, Lummela N, Karjalainen H, et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:2029-2036.
24. Martínez I, Wallace G, Zhang C. Diet-Induced Metabolic Improvements in a Hamster Model of Hypercholesterolemia Are Strongly Linked to Alterations of the Gut Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(12):4175–4184.
25. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(4):460-469.
26. Blow N. Metagenomics: exploring unseen communities. *Nature.* 2008; 453:687-690.
27. Schloss PD, Handelsman J. A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9:34.
28. Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, et al. Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. *ClinDevImmunol.* 2008; 1-19.
29. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112:2735–52.
- 30 http://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/print.html, visitado por última vez el 28 de agosto de 2012.
- 31 Vandesampel J; De Peter K; Pattyn F; Poppe B. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR. *Genome Biology* (2002).
- 32 De Gregoris T, Aldred N, Clare A, Burgess J. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods* 2011; 86:351–356.