



Instituto Nacional
de Salud Pública

Título:

“ASOCIACIÓN DEL PERFIL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PATRONES DE ALIMENTACIÓN SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE INSULINA EN NIÑOS MEXICANOS”.

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en Nutrición
Generación 2012-2014**

Presenta:

LN. Claudia Etziria López Islas

Directora:

Dra. Ana Isabel Burguete García

Institución: Instituto Nacional de Salud Pública

Área: Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas.

Asesores:

Dr. Mario Efraín Flores Aldana

Institución: Instituto Nacional de Salud Pública

Área: Centro de Investigación en Nutrición y Salud

M. C. Barbara Ixchel Estrada Velasco

Institución: Instituto Nacional de Salud Pública

Área: Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas.

Cuernavaca, Morelos a 18 de agosto de 2014

TÍTULO DE REGISTRO:

“ASOCIACIÓN DEL PERFIL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PATRONES DE ALIMENTACIÓN SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE INSULINA EN NIÑOS MEXICANOS”.

TÍTULO DEL ARTÍCULO:

“ASOCIACIÓN DEL PERFIL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y PATRONES DE ALIMENTACIÓN EN NIÑOS MEXICANOS CON RESISTENCIA A LA INSULINA”.

López-Islas C.¹, Cruz M.², Estrada-Velasco B.¹, Flores-Aldana M.³, Orbe-Orihuela JC¹, Peralta-Romero J.², Valladares-Salgado A.², Méndez-Padrón A.², Burguete-García AI.¹

1 Centro de investigación sobre enfermedades infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

2 Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, IMSS, CMN Siglo XXI, Ciudad de México, México.

3 Centro de investigación en nutrición y salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

López-Islas, C. Cruz M., Igual contribución, primer autor.

Autor correspondiente: AI. Burguete-García

Instituto Nacional de Salud Pública

Av. Universidad 655, Santa María Ahuacatitlán Cuernavaca, México. C.P.62508,

Tel.: +52 01 777 329 3000 ext.:2886

aburguete@correo.insp.mx

Resumen

Objetivo: Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la asociación independiente y sinérgica de la abundancia relativa de bacteroidetes, firmicutes y patrones de alimentación con resistencia a la insulina en población infantil mexicana.

Métodos: Se evaluaron 952 niños de la Ciudad de México, entre 6-14 años de edad, se obtuvieron los datos antropométricos, bioquímicos y clínicos. Los datos de la dieta se obtuvieron por medio de un cuestionario de frecuencia de consumo y se evaluó por análisis de componentes principales. El DNA de la microbiota se obtuvo de las muestras de heces y se analizó por qPCR. Los datos se analizaron mediante modelos de regresión logística para el análisis de asociación.

Resultados: Se encontró asociación estadísticamente significativa entre los participantes con obesidad, una abundancia relativa (AR) de bacteroidetes > al promedio de la población y la presencia de resistencia a la insulina (RI) comparando con los participantes que tienen una $AR \leq$ al promedio (OR: 1.65, IC95%: 1.06-2.56, $p < 0.02$), mientras que la AR de firmicutes se asoció con obesidad (OR: 2.21, IC95%: 1.64, 2.98, $p < 0.0001$). Ninguno de los 2 patrones de alimentación encontrados (1: Alimentos altos en grasas y 2: Alimentos bajos en grasa) mostró asociaciones con RI. El efecto conjunto de la abundancia relativa de bacteroidetes y el patrón de alimentos altos en grasas con RI fue estadísticamente significativa en los participantes con obesidad (OR 2.6, IC 1.26-5.51, $p < 0.01$).

Conclusiones: Los datos encontrados en nuestro estudio indican el potencial papel de la microbiota intestinal y su contribución al metabolismo energético, así como el papel de los bacteroidetes en la presencia de RI en el niño obeso. Ante las evidencias de gran relevancia es importante continuar con estudios que confirmen el impacto de la microbiota intestinal en alteraciones metabólicas, como RI, más allá de la sola manipulación de la dieta.

Palabras clave:

Resistencia a la insulina, microbiota intestinal y patrones de alimentación.

Introducción

La resistencia a la insulina (RI) ha sido reconocida como un importante componente en padecimientos como obesidad, diabetes tipo 2 (DT2), síndrome metabólico, hipertensión y otras enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).^{1, 2} En México, 71.3% de adultos padecen sobrepeso u obesidad, 9.2% diabetes y 31.5% hipertensión.³ En niños (5-11 años), 34.4% tiene sobrepeso y obesidad.⁴ La prevalencia de síndrome metabólico en niños y adolescentes, es difícil de definir ya que los criterios para su diagnóstico no han sido claros. En México se observó que 20% de los niños y adolescentes padecen síndrome metabólico, utilizando los lineamientos del Adult Treatment Panel (ATP III) considerando al menos 3 criterios para su diagnóstico.⁵

Los cambios en la transición nutricional están ligados a la creciente prevalencia de obesidad, síndrome metabólico y diabetes. El principal patrón de alimentación asociado, se caracteriza por una alimentación de tipo “occidental”, en el cual existe un incremento en el consumo de grasas, hidratos de carbono (HC) refinados y un consumo relativamente bajo de fibra.^{6, 7, 8} Por un lado, este tipo de alimentación se asocia a un aumento en el tejido adiposo, provocando que las células β del páncreas mantengan una secreción incrementada de insulina para compensar los excesos de glucosa y lípidos. Condición que con el paso del tiempo produce una disminución en la sensibilidad de los receptores de insulina y por consecuencia RI.²

El aumento del tejido adiposo en los individuos con sobrepeso y obesidad provoca que dicho tejido segregue cantidades más elevadas de citocinas proinflamatorias como: factor de necrosis tumoral (TNF- α), resistina e interleucina 6 (IL-6) y la disminución de otras citocinas antiinflamatorias como adiponectina, que producen un defecto en la señalización de insulina a nivel del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), ya que se ve interrumpida la fosforilación de los residuos de tirosina del sustrato.^{9,10}

Por otro lado, este tipo de alimentación condiciona a cambios en la microbiota intestinal,¹¹ la cual está constituida por una amplia variedad de microorganismos que participan en el metabolismo humano de forma interrelacionada. La microbiota intestinal se caracteriza por

dos filos predominantes: firmicutes y bacteroidetes.¹² Se han propuesto varios mecanismos ligados de lo que ocurre en el intestino y el metabolismo energético a partir de dietas ricas en HC y grasas.¹³ Existe evidencia de que dietas altas en grasa y/o HC condicionan a una disbiosis de la microbiota intestinal, con un predominio en el filo firmicutes en individuos con obesidad.¹¹ Así mismo, se ha reportado que el consumo de dietas altas en grasas se asocia con mayor presencia de endotoxemia, la cual se debe a un aumento en la permeabilidad intestinal y, por lo tanto un mayor flujo de lipopolisacárido (LPS) desde el intestino al torrente sanguíneo. Este aumento de la permeabilidad intestinal se atribuye al filo firmicutes y dietas bajas en fibra, lo que facilita el paso de LPS, presente en bacterias gram negativas (bacteroidetes). Esta molécula dentro del organismo es reconocida por receptores tipo Toll (TLR) presentes en diferentes células del sistema inmune, favoreciendo un aumento de cinasas como c-Jun N-terminal (JNK) y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) que fosforilan serina en el sustrato del receptor de insulina (IRS), lo que produce un deterioro en la señalización de insulina, y en consecuencia RI.¹⁴⁻¹⁷ Por el contrario, las dietas ricas en fibra (xilano, pectina y arabinosa) promueven el crecimiento de bifidobacterias spp, bacterias que se relacionan con una mayor tolerancia a la glucosa y mejora en la sensibilidad de la insulina.¹⁸

Ante esta evidencia el objetivo de nuestro estudio fue evaluar la asociación independiente de la abundancia relativa de bacteroidetes, firmicutes y patrones de alimentación con resistencia a la insulina en población infantil mexicana. Además, se evaluó el efecto conjunto de estas variables en la población de estudio.

Metodología

Diseño y población

Se realizó un estudio transversal de 952 niños no relacionados, de 6 a 14 años de edad sin diagnóstico previo de diabetes, que radican en la Ciudad de México. Se excluyeron a los niños que presentaron enfermedades infecciosas y consumieron antibióticos dos meses previos al estudio. La recolección de los datos se realizó de mayo 2011 a octubre 2012. A todos los

niños se les aplicó un cuestionario por personal capacitado, se preguntaron características generales, antecedentes heredofamiliares (AHF) de padres y/o abuelos, actividad física (AF) y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos. Los AHF se consideraron cuando al menos un integrante de los padres o abuelos padecían alguna enfermedad (DT2 y sobrepeso u obesidad). La AF se midió como actividad física en tiempo libre, en la cual se preguntó frecuencia (días por semana) y duración (nunca, minutos por día u horas por día). Las respuestas se convirtieron en equivalentes metabólicos (Mets/hora/sem).

Los padres y niños firmaron un consentimiento y asentimiento, respectivamente, donde fueron informados de los riesgos, beneficios y confidencialidad de los datos. El estudio fue aprobado por las comisiones de ética e investigación del Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP).

Estudios antropométricos y bioquímicos

Todas las medidas se realizaron por personal estandarizado. A todos los niños se les pidió que se quitaran zapatos, con la mínima cantidad de ropa y cualquier otro objeto pesado que llevaran. Para la toma de peso se utilizó una báscula SECA (m. 803) con una precisión de 0.1kg, previamente calibrada. Para la toma de talla se utilizó un estadímetro portátil SECA (m. 213), el participante se mantuvo de pie, con los hombros relajados, el rostro formando el plano de Frankfort, talones juntos y puntas de los pies semiabiertas, y se registró al décimo centímetro más cercano.¹⁹ El Índice de Masa Corporal (IMC) se calculó con peso y talla (kg/m^2) utilizando los puntos de corte del puntaje Z, según edad y sexo, por medio del software Antro Plus de la OMS.²⁰ A todos los niños y adolescentes se les evaluó la presencia de Acantosis nigricans en cuello o antebrazo.

A continuación, se tomaron 3 muestras de sangre venosa con 8 a 12 horas de ayuno, las cuales fueron procesadas para la separación de suero y plasma, posteriormente se almacenaron a -70°C . Se evaluaron los niveles de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL), triglicéridos (Equipo Clinical Chemistry System ILAB 300 plus®, con controles y curvas de calibración), niveles de insulina (quimioluminiscencia,

INMULITE®) y adiponectina (por ELISA, Peprotech®). Para medir la resistencia a la insulina se calculó HOMA (Homoeostasis model assessment) con la fórmula de Matthews: $HOMA = [(Glucemia \text{ (mmol/L)} \times Insulinemia \text{ (}\mu\text{UI/mL)})/22,5]$. Las unidades de glucemia se convirtieron a milimoles por litro con la siguiente formula: $\text{mmol/L} = [(\text{mg/dL})/18]$.²¹

Extracción del DNA bacteriano a partir de muestras fecales

En el estudio se incluyó una muestra de heces para conocer la diversidad de la microbiota. El DNA bacteriano se extrajo de las muestras fecales por método de columnas utilizando el kit de QIAamp® stool for human (QIAGEN, GmbH, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.²² La concentración de DNA y su pureza se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 Thermo Scientific (Saveen Werner ApS, Dinamarca).

Cuantificación de la microbiota por PCR tiempo real

Los grupos bacterianos fueron cuantificados por qPCR utilizando el sistema Step one plus realtime PCR system (Applied Biosystems, EE.UU.) y los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 1.²³

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: 10 μL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas®), 4 μL de agua libre de ácidos nucleicos (Fermentas®), 2 μL de cada cebador: Reverse (5pmol) y forward (10pmol), 2 μL del templado de DNA (5 ng/ μL). La mezcla se llevó a un volumen final de 20 μL , este volumen se dividió en dos reacciones. La técnica fue previamente calibrada y estandarizada. Se establecieron las condiciones de amplificación, un ciclado térmico de 5 minutos a 95°C, desnaturalización a 95°C por 15 segundos, 30 ciclos a 59°C por 15 segundos (alineamiento) y elongación a 72°C por 20 segundos, para los 3 oligos utilizados: universal, bacteroidetes y firmicutes. La abundancia relativa (AR) se determinó a partir de los CT (número de ciclo en cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) de cada muestra, esto se realizó con la siguiente fórmula: $2^{-\Delta CT} [2^{-(CT \text{ del gen de interés} - CT \text{ del gen universal})}]$.²⁴ A partir de estos datos se estimaron los promedios de firmicutes y bacteroidetes de cada uno de los niños. La AR de la microbiota

expresa un aproximado de unidades bacterianas de un filo con respecto a otro filo, y permite conocer la diferencia de distribución de la población bacteriana en determinada área. Para este estudio y de acuerdo al manual de extracción de DNA bacteriano se expresa la AR en cada 200 mg de heces.

Para explorar la distribución de firmicutes y bacteroidetes en la población, éstos se clasificaron en 2 categorías de AR: $AR \leq$ al promedio y $AR >$ al promedio, para crear la clasificación se consideró el promedio de la abundancia relativa de bacteroidetes y de firmicutes en los participantes sin resistencia a la insulina y sin obesidad.

Datos de dieta

La información sobre dieta se obtuvo por medio de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFC) que hacía referencia al año anterior a la encuesta, previamente validado por nuestro equipo de trabajo en escuelas primarias del Distrito Federal.

El cuestionario incluyó 107 preguntas, de las cuales 85 eran de alimentos como: verduras, frutas, carnes, lácteos, leguminosas y cereales; 8 de bebidas, 10 de postres, 3 de grasas añadidas y una de algún suplemento vitamínico o alimenticio. Cada pregunta tenía 10 opciones de respuesta, desde “nunca” hasta “6 o más veces al día”. Los gramos por porción de cada alimento están basados en los utilizados en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.¹⁷

Análisis de patrones

Cada una de las repuestas se transformó a gramos al día (gr/día) del alimento para cada individuo. Posteriormente, se realizaron 22 grupos de alimentos de acuerdo a la similitud del contenido de macronutrientes, en especial por lípidos e HC (Anexo 1). A partir de los grupos se creó la variable de porcentaje de contribución del consumo total de la dieta de cada uno de los grupos de alimentos. Posteriormente, se normalizó a puntuación z dicha variable. El estudio de la dieta se realizó por análisis de componentes principales (ACP), utilizando la

rotación varimax. Para definir cada patrón de consumo se eligieron los factores que tuvieran un eigenvalor ≥ 1.50 .

Se formaron 2 categorías para los patrones de alimentación: consumo $\leq$ al promedio y consumo por $>$ al promedio. Para crear las categorías se tomó como referencia el promedio de consumo de cada patrón en los participantes sin resistencia a la insulina y sin obesidad.

Análisis estadístico

Se compararon todas las variables relevantes en los grupos categorizados por la presencia de resistencia a la insulina considerando como punto de corte para HOMA >2.5 .^{25,26} La asociación de la abundancia relativa de firmicutes, bacteroidetes y patrones de alimentación con RI se evaluó mediante modelos de regresión logística múltiple, ajustando por edad, género, antecedente heredofamiliar de obesidad, actividad física, dieta y filo bacteriano, estratificando por adiposidad.

Finalmente mediante regresión logística múltiple estratificada por adiposidad se evaluó la modificación del efecto de la dieta por la abundancia relativa de firmicutes y/o bacteroidetes sobre RI. Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas si el valor de p era ≤ 0.05 . El análisis de la información se llevó a cabo mediante el software Stata versión 12.

Resultados

En la población de niños analizados, el 19.22% fueron clasificados con RI a partir del punto de corte >2.5 y 80.78% sin RI. La media de edad fue de 9.03 ± 1.97 años para los niños sin RI y de 10.26 ± 2.05 en los niños con RI ($p=0.0001$); la distribución de las características generales, clínicas, bioquímicas y estilos de vida de acuerdo a la clasificación de RI se presentan en la tabla 2 y 3. Los participantes con RI se caracterizaron por presentar un promedio mayor en IMC, circunferencia cintura, presión sistólica y presión diastólica comparando con los participantes sin RI ($p<0.001$). Así mismo, los participantes con RI se caracterizaron por presentar niveles promedios más elevados de glucosa, insulina y triglicéridos, y niveles más bajos de HDL y adiponectina ($p<0.0001$). Por el contrario, para la

dieta y actividad física (evaluada por consumo de energía y Mets, respectivamente) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 2).

Se observó una mayor prevalencia de RI en el género femenino en comparación al masculino (58.47 vs 41.53, $p=0.001$). De igual manera la prevalencia de antecedentes heredofamiliar de obesidad y presencia de signo de acantosis fue mayor en el grupo con resistencia a la insulina ($p<0.01$). Para la variable AHF de DT2, el mayor porcentaje de los participantes reportó no tener antecedente, sin embargo en aquellos con AHF de DT2 se observó una prevalencia de 8.85% de participantes sin RI y un 16.4% con RI ($p=0.003$) (Tabla 3).

En la tabla 4, se describe la carga con la que contribuye cada grupo de alimento para cada factor, mediante el ACP. Para esta investigación se consideró una carga de cada grupo ≥ 0.30 en cada factor. De tal manera que se identificaron 2 patrones, que en conjunto representan el 21% de la varianza total de la variable estandarizada de porcentaje de consumo de cada grupo de alimento. El patrón 1 se etiquetó con el nombre de “Alimentos altos en grasas” y el patrón 2 como “Alimentos bajos en grasa”.

La descripción de los patrones de alimentación y la abundancia relativa de firmicutes y bacteroidetes se muestran en la tabla 5. Se observó que no existe diferencias significativas entre el consumo de cada patrón de alimentación y los participantes con o sin RI ($p> 0.05$). En la distribución de la abundancia relativa de firmicutes y bacteroidetes, de igual manera, no se encontraron diferencias entre la AR de cada filo bacteriano y los participantes con o sin RI ($p> 0.05$).

Mediante el modelo de regresión logística múltiple, se evaluó la asociación de la obesidad sobre la RI y la asociación de la microbiota con obesidad. Se observó una asociación estadísticamente significativa de obesidad y RI (OR: 7, IC95%: 4.42-10.64, $p<0.0001$), de igual forma se observó que el filo firmicutes tiene una asociación positiva con obesidad (OR: 2.21, IC95%: 1.64, 2.98, $p< 0.0001$) (resultados no mostrados).

Para evaluar la asociación entre la abundancia relativa de firmicutes y bacteroidetes, patrones de alimentación y la presencia de RI, se estratificó por grado de adiposidad, ajustando por sexo, edad, actividad física y AHF de sobrepeso y obesidad. Para ninguno de los dos patrones estudiados se encontró asociación estadísticamente significativa con RI (Tabla 6).

Los participantes con sobrepeso u obesidad y una AR > al promedio de bacteroidetes tienen 65% más posibilidades de tener RI comparando con los participantes que tienen una AR ≤ al promedio (IC95%: 1.06-2.56, $p < 0.02$) (Tabla 6).

Se procedió a evaluar el efecto conjunto de la abundancia relativa y los patrones de alimentación y su asociación con RI, mediante un modelo de regresión logística múltiple estratificando por IMC, observando una asociación estadísticamente significativa para el grupo con sobrepeso u obesidad, abundancia relativa alta de bacteroidetes y consumo elevado de grasas (OR 2.6, IC 1.26-5.51, $p < 0.01$) (Tabla 6).

Discusión

Nuestros datos muestran que un consumo alto de grasas y una abundancia relativa alta de bacteroidetes están relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina. En un análisis complementario observamos una asociación de obesidad y RI, de igual manera el filo firmicutes se asoció con obesidad. Estos datos concuerdan con estudios previamente reportados en otras poblaciones, que confirman que la obesidad está altamente relacionada con RI o el desarrollo de diabetes y síndrome metabólico.^{1, 2, 27}. Así como, una mayor proporción de firmicutes se asocia con la presencia de obesidad y por lo tanto con un aumento en la adiposidad, generalmente asociados a dietas altas en grasa y/o HC.^{28, 29}

Estos resultados coinciden con otros ensayos clínicos y estudios de seguimiento, los cuales indican que hay una fuerte asociación entre el filo bacteroidetes o especies específicas de dicho filo y un aumento en la concentración de glucosa y/o insulina, el desarrollo de RI y la presencia de diabetes o síndrome metabólico. Larsen *et al.*, realizaron un ensayo clínico que incluyó a 36 hombres de diferentes edades e IMC: 18 con diabetes tipo 2 y 18 sin DT2. En el

cual, encontraron que los pacientes con DT2 tenían una disminución de la abundancia relativa de firmicutes y una mayor proporción de bacteroidetes en comparación con las personas sin diabetes ($p=0.03$). Además, bacteroidetes se correlacionó positivamente con un aumento en la concentración de glucosa ($p=0.04$) pero no con IMC.³⁰ Los resultados son similares a los encontrados en nuestro estudio, ya que nuestra asociación con bacteroidetes se mostró positiva para RI (OR: 1.65, IC95%: 1.06-2.58, $p=0.02$) y tampoco se encontró una asociación con IMC. Ambos hallazgos nos muestran la relación que existe entre los diferentes tipos de la microbiota y desordenes metabólicos.

Pussinen, *et al.*, realizaron una cohorte de 537 casos prevalentes y 462 casos incidentes con diabetes seguidos por 10 años. Encontraron que tanto los sujetos con diabetes prevalentes como los sujetos incidentes de diabetes tenían una mayor actividad de LPS, en comparación con los sujetos no diabéticos ($p<0,001$). La actividad de la endotoxina se asoció significativamente con un mayor riesgo de diabetes de nueva aparición con una razón de riesgo 1.004 (IC95%: 1.001 a 1.007; $p=0.019$) por unidad de aumento que resulta en un 52% más de riesgo ($p=0.013$) en el cuartil más alto en comparación con el más bajo.³¹ En nuestro estudio no se mide la presencia o abundancia de LPS, pero al comparar con este estudio, asumimos que la presencia aumentada de bacteroidetes en el intestino produce una actividad aumentada de la endotoxina y esto pueda modificar la actividad de insulina y glucosa en el organismo, cambios que son señalados por ambos estudios.

Nuestros resultados muestran una asociación entre los patrones de alimentación y la presencia de RI en el grupo con sobrepeso u obesidad, sin embargo, la asociación no fue estadísticamente significativa. En controversia, los datos reportados por Karatzi, *et al.* en un estudio transversal de 1912 niños entre 9-13 años de Grecia, observaron que el consumo alto de margarina, dulces y botanas saladas aumenta 2.5 veces el riesgo (IC 95%: 1,30-4,90, $p<0.05$) de RI comparando con el tercil más bajo de consumo, utilizando cuestionario de frecuencia de consumo y mediante ACP.³² Las diferencias encontradas pueden deberse a la potencial falta de poder estadístico en nuestro estudio, sin embargo la dirección del estimador es la misma donde un alto consumo de grasas se asocia a RI.

Existen pocos estudios que consideren la alimentación y la microbiota sobre el desarrollo de RI o comorbilidades asociadas, como nosotros lo hemos mostrado en este estudio. Cani, *et al.*, reportaron cambios en la microbiota intestinal inducida por un tratamiento con antibióticos, los cuales mostraron una reducción en la endotoxemia metabólica y el contenido fecal de LPS en ambos grupos estudiados (ratones alimentados con una dieta alta en grasa y ratones ob/ob). Este efecto se correlacionó con la reducción de intolerancia a la glucosa, aumento de peso corporal, el desarrollo de la masa grasa, el estrés oxidativo y la infiltración de macrófagos. Es importante destacar que la alimentación alta en grasa aumentó fuertemente la permeabilidad intestinal y la reducción de la expresión de genes que codifican para proteínas de las uniones estrechas.³³ Este estudio muestra asociación biológica entre los cambios en la microbiota, las dietas altas en grasa, el aumento de la permeabilidad intestinal y el desarrollo de ECNT.

En otro escenario el butirato, un ácido graso de cadena corta producido en el intestino por el filo firmicutes a partir de la ingesta de los hidratos de carbono no digeribles, se ha relacionado mucho con la RI. El estudio de Gao, *et al.*, evaluó la suplementación de butirato en ratones alimentados con dieta alta en grasas. Se observó, que en los ratones suplementados con butirato se inhibió el desarrollo de RI y de obesidad en comparación a los no suplementados. Ya que el grupo control después de 16 semanas aumento su peso corporal (23 a 40g), aumentó su porcentaje de grasa (10 a 35%) y por lo tanto redujo su masa magra (80 a 65%), todos los parámetros mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Los resultados para la sensibilidad a la insulina mostraron en el grupo control que la glucosa aumento significativamente y por el contrario, en el grupo suplementado con butirato la insulina fue menor a las 16 semanas ($p < 0.001$).³⁴ Este estudio refuerza la asociación de la dieta alta en grasas y el papel de la microbiota en el metabolismo de la insulina, lo que podría reforzar desde un punto de vista biológico los hallazgos en nuestro estudio.

En un ensayo clínico aleatorizado, se evaluó la composición de la microbiota y la producción ácidos grasos de cadena corta sobre la RI. Este estudio se llevó acabo en dos grupos de individuos con síndrome metabólico y un lavado intestinal previo. El grupo autólogo, consistía en 9 sujetos a los cuales se les transfirió una muestra fecal propia, recolectada previamente al

lavado, y el grupo alogénico consistía en 9 sujetos a los cuales se les transfirió una muestra de heces de sujetos sanos. Se midió y tomaron muestras a los sujetos antes de la transferencia y seis semanas después. En el consumo de la dieta no se encontraron diferencias entre los grupos. Se observó que en el grupo alogénico la sensibilidad de la insulina mejoró (tasa media de desaparición de glucosa de 26.2 a 45.3mol/kg/min; $p < 0.05$). Quince grupos de bacterias del filo firmicutes aumentaron significativamente en el grupo de tratamiento alogénico ($p < 0.05$), incluidos los relacionados con la producción de butirato, como *Roseburia intestinalis*, que aumentó 2.5 veces ($p < 0.05$). Además, los ácidos grasos de cadena corta fecales disminuyeron después de las 6 semanas en el grupo alogénico (media de acetato: 49.5 a 37.6, $p < 0.05$; y butirato: 14.1 a 8.9, $p < 0.05$) en comparación con los cambios no significativos en el grupo autólogo.³⁵ Un estudio de estas características, en el cual se controlan los factores más importantes, aclara la asociación que existe entre la microbiota y la RI, la cual está dada por el tipo de bacteria y la regulación de butirato. Estos datos coinciden con nuestros resultados, en el cual, la abundancia relativa de bacteroidetes se relaciona directamente con los niveles séricos de insulina pero no necesariamente se debe a un efecto individual de la dieta.

Nuestros resultados y los de otros estudios indican que una disbiosis bacteriana se relaciona RI y con factores que condicionan este padecimiento. Es decir una alimentación alta en grasas y baja en fibra, condiciona a cambios en la microbiota, provocando un cambio en la AR de firmicutes y bacteroidetes. Estos cambios, dada la evidencia biológica, potencialmente podrían estar produciendo una disminución en la producción de AGCC, como butirato; condicionando cambios en el metabolismo humano, asociados a la endotoxemia metabólica presente en las ECNT.

Conclusión

La evidencia que muestra este estudio establece una asociación de la microbiota y la dieta relacionada a RI, padecimiento relacionado con muchas ECNT, esto podría sugerir que la modificación de la microbiota intestinal y cambios dietéticos pueden ser útiles para el desarrollo de estrategias para combatir comorbilidades asociadas a la resistencia a la insulina.

Sin embargo es importante realizar futuras investigaciones que incluya la determinación de especies de la microbiota, además de replicar estos resultados en otras poblaciones

Agradecimientos

Los autores agradecen a los integrantes de la Unidad de Bioquímica-IMSS por la asistencia técnica en los ensayos Bioquímicos y ELISA; al grupo de Epidemiología genética del INSP quienes se encargaron de la recolección de la información y mediciones antropométricas. Este trabajo fue financiado por SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 2012-180808 y CONACYT SALUD-2005-C02-14412; Proyectos Estratégicos IMSS 2004-3601-0020; Fundación IMSS, A.C.

Referencias

1. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Investig.* 2003; (112): 1821–1830.
2. Pérez R, Medina G. Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinal Nutr.* 2011; 58 (07):360-369
3. Barquera S, Campos I, Hernández -Barrera L, Rivera- Dommarco J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2012
4. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, *et al.* Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2012.
5. Halley E, Borges G, Talavera J, Orozco R, Vargas-Alemán C, Huitrón-Bravo G, *et al.* Body mass index and the prevalence of metabolic syndrome among children and adolescents in two Mexican populations. *J Adolesc Health* 2007; 40(6):521-526.
6. Rivera JA, Barquera S, González-Cossío T, Olaiz G, Sepúlveda J. Nutrition Transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr Rev.* 2004; 62(7):149-157.
7. Rivera JA, Barquera S, Campirano F, Campos I, Safdie M, Tovar V. Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr.* 2002; 5:1–11.
8. Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obesity reviews.* 2004; 5:4-85.
9. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews.* 2000; 21:697-738.
10. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic Influences of Adiponectin on Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Diabetes.* 2007; 56:1198–1209.
11. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized genotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 2009; 1 (6): 6-14.
12. Cani PD, Delzenne NM. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease

13. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, *et al. et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334 (6052): 105–108.
14. Esteve E, Ricart W, Fernández JM. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011; 14(5):483-490.
15. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, *et al.* A central role for jnk in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002; 420 (6913): 333–336.
16. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 2896–2902.
17. Zick Y. Insulin resistance: A phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol*. 2001; 11: 437–441.
18. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxemia. *Diabet*. 2007; 50 (11): 2374-2383.
19. Shamah- Levy T, Villalpando- Hernández S, Rivera-Dommarco J. Manual de procedimientos para proyectos de nutrición. México. Instituto Nacional de Salud Pública. 2006:13-16, 39-81.
20. Organización Mundial de la Salud. AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. [En línea]: 2013. Disponible en: www.who.int/growthref/tools/en/.
21. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28 (7): 412-419.
22. Qiagen. QIAamp DNA Stool Handbook. 2a edición. 2010 [En línea]: 2013. Disponible en: www.qiagen.com
23. Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Method*. 2011; 86(6): 351–356
24. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008;3 (6):1101-1108.

25. Sharma S, Fleming SE. Use of HbA1C testing to diagnose pre-diabetes in high risk African American children: A comparison with fasting glucose and HOMA-IR. *Diabetes Metab Syndr*. 2012; 6(3):157-162.
26. Barja S, Arnaiz P, Domínguez A, Villaroel F, Cassis B, Castillo O, *et al*. Insulinemia e índice HOMA en niños y adolescentes chilenos. *Rev Med Chile* 2011; 139: 1435-1443.
27. Khan B, Flier J. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000; 106 (4): 473-481
28. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444:1022–1023.
29. Santacruz A, Collado MC, García-Valdés L, Segura MT, Martín-Lagos J A, Anjos T, *et al*. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr* 2010; 104:83–92.
30. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen B. *et al*. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one*, 2010; 5 (2): e9085
31. Pussinen P, Havulinna A, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia Is Associated With an Increased Risk of Incident Diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(2): 392–397.
32. Karatzi K, Moschonis G, Barouti AA, Lionis C, Chrousos GP, Manios Y. Dietary patterns and breakfast consumption in relation to insulin resistance in children. The Healthy Growth Study. *Public Health Nutr*. 2014; 15:1-8.
33. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008 57(6):1470-1481.
34. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M. *et al*. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 2009; 58(7), 1509-1517.
35. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF. *et al*. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913–916.

Tabla 1. Oligonucleótidos de los genes de interés.

Oligos	Nombre	Secuencia	Concentración	TM
Universal	926Forward	5´AAACTCAAAGGAATTGACGG 3´	343 pmol/µL	60
	1062Reverse	5´CTCACRRCACGAGCTGAC 3´	266 pmol/µL	68
Bacteroidetes	798cfbForward	5´CRAACAGGATTAGATACCCT 3´	393 pmol/µL	60
	cfb967Reverse	5´GGTAAGGTTCTCGCGTAT 3´	407 pmol/µL	62
Firmicutes	928F-Forward	5´TGAAACTYAAAGGAATTGACG 3´	327 pmol/µL	62
	1040Reverse	5´ACCATGCACCACCTGTC 3´	378 pmol/µL	64

Tabla 2. Características de clínicas, bioquímicas y estilo de vida de los niños y adolescentes categorizados por resistencia a la insulina.

	No (n=769)	Si (n=183)	<i>P</i> (≤0.05)
Edad	9.03 ± 1.97	10.26 ± 2.05	0.0001
IMC	18.77 ± 3.6	23.96 ± 4	0.0001
C. cintura (cm)	64.21 ± 10.41	78.79 ± 10.5	0.0001
PAS(mmHg)	97.19 ± 10.34	101.62 ± 10.51	0.0001
PAD (mmHg)	65.44 ± 8.67	67.60 ± 9.14	0.0014
Glucosa (mg/dL)	80.34 ± 9.08	84.95 ± 9.22	0.0001
Insulina (IU/dL)	4.94 ± 3.67	19.56 ± 10.54	0.0001
Triglicéridos (mg/dL)	84.88 ± 40.92	122.13 ± 59.55	0.0001
HDL (mg/dL)	50.13 ± 11.73	42.97 ± 11.01	0.0001
LDL (mg/dL)	99.49 ± 25.94	102.77 ± 26.44	0.1226
Colesterol total (mg/dL)	152.67 ± 32.37	149.79 ± 32.74	0.2707
Adiponectina (pg/μL)	5.39 ± 1.30	4.91 ± 1.11	0.0001
Energía total (kcal)	3261.18 ± 1046.08	3303.81 ± 1025.28	0.058
Adiponectina (pg/μL)	5.39 ± 1.30	4.91 ± 1.11	0.0001
Actividad Física (Mets/hora/sem)	491.81 ± 410.56	450.86 ± 415.58	0.13

Los valores se expresan en medias y desviación estándar. Valor p: prueba U de Mann-Whitney. IMC: índice de masa corporal, C. cintura: circunferencia cintura, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica. HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad.

Tabla 3. Características generales de los niños y adolescentes (n=952).

Resistencia a la insulina	Genero			AHF de sobrepeso u obesidad			AHF de DT2			Signo de acantosis		
	M	F	<i>p</i> (≤0.05)	No	Si	<i>p</i> (≤0.05)	No	Si	<i>p</i> (≤0.05)	No	Si	<i>p</i> (≤0.05)
No	54.88	45.12	0.001	18.83	51.17	0.003	91.15	8.85	0.003	75	25	0.0001
Si	41.53	58.47		36.6	63.4		83.6	16.4		36.3	63.7	

Los valores se expresan en porcentaje. Valor p: prueba Chi2 para variables categóricas. AHF: antecedente heredofamiliar, DT2: diabetes tipo 2, M: masculino y F: femenino.

Tabla 4. Matriz de carga para los factores. ^a

Grupos de alimentos	Alimentos altos en grasa¹	Alimentos bajos en grasa²
1. Tortilla y alimentos a base de maíz	0.28	0.05
2. Antojitos mexicanos y comida rápida.	<u>0.34</u>	-0.07
3. Pan de trigo y tortilla de harina y productos de panadería azucarados.	0.21	-0.23
4. Cereales listos para comer	0.05	0.09
5. Papas, arroz y pasta	0.29	0.07
6. Leguminosas	0.18	0.28
7. Frutas	-0.10	<u>0.43</u>
8. Verduras	0.04	<u>0.47</u>
9. Picantes	0.19	-0.01
10. Pollo	0.20	0.11
11. Pescado	0.11	<u>0.31</u>
12. Carnes rojas	0.28	0.01
13. Embutidos	<u>0.30</u>	-0.10
14. Agua	-0.25	-0.05
15. Lácteos con bajo contenido de grasa.	-0.03	0.10
16. Lácteos con alto contenido de grasa.	-0.13	-0.34
17. Huevo	0.23	0.16
18. Alimentos con grasa saturada	0.32	0.06
19. Aderezos	0.19	-0.03
20. Dulces y azúcares	-0.06	-0.01
21. Refrescos	0.16	-0.34
22. Botanas saladas	0.27	-0.25

^a: Resultados de la matriz factorial rotada.

¹: Patrón 1. ²: Patrón 2.

Tabla 5. Distribución de la población de acuerdo al consumo de los patrones de alimentación y la abundancia relativa de la microbiota, estratificado por resistencia a la insulina.

Patrones	No (%)	Si (%)	
Patrón 1	n= 769	n= 183	$p(\leq 0.05)$
Consumo $\leq$ del promedio	35.6	33.9	0.66
Consumo $>$ del promedio	64.3	66.12	
Patrón 2			
Consumo $\leq$ del promedio	33.94	38.25	0.27
Consumo $>$ del promedio	66.06	61.75	
Microbiota			
Bacteroidetes			
AR $\leq$ al promedio	35.5	33.3	0.8
AR $>$ al promedio	64.5	66.7	
Firmicutes			
AR $\leq$ al promedio	28.6	22.9	0.12
AR $>$ al promedio	71.4	77.05	

Los valores se expresan en porcentajes. El valor p se obtuvo con prueba Chi².
 Patrón 1: Alimentos altos en grasa, patrón 2: Alimentos bajos en grasa.

Tabla 6. Modelos de asociación de la AR bacteroidetes, firmicutes y patrones de alimentación con resistencia a la insulina, estratificado por IMC.

Modelos	Normal			Sobrepeso/Obesidad		
	OR	IC95%	P (<0.05)	OR	IC95%	P (<0.05)
AR > al promedio de bacteroidetes. ¹	1.14	.49, 2.69	0.75	1.65	1.06, 2.56	0.02
AR > al promedio de firmicutes. ²	0.66	.28, 1.51	0.33	0.92	.55, 1.56	0.78
Consumo > al promedio del patrón 1. ³	1.05	.45, 2.44	0.91	1.2	.77, 1.83	0.41
Consumo > al promedio del patrón 2. ⁴	0.82	.36, 1.84	0.63	0.84	.55, 1.29	0.44
Bacteroidetes + Patrón 1. ^{5, a}	1.31	.34, 5.06	0.70	2.6	1.26, 5.51	0.01
Firmicutes + Patrón 1. ^{6, a}	0.77	.22, 2.60	0.67	1.35	.61, 2.98	0.44
Bacteroidetes + Patrón 2. ^{7, a}	0.8	.24, 2.70	0.72	1.23	.65, 2.34	0.25
Firmicutes + Patrón 2. ^{8, a}	0.64	.18, 2.23	0.49	0.68	.29, 1.64	0.40

AR: abundancia relativa, IMC: índice de masa corporal, IC: intervalos de confianza. Patrón 1: alimentos altos en grasa, patrón 2: alimentos bajos en grasa.

¹: modelo ajustado por, firmicutes, patrón 1, patrón 2, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

²: modelo ajustado por, bacteroidetes, patrón 1, patrón 2, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

³: modelo ajustado por, bacteroidetes, firmicutes, patrón 2, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

⁴: modelo ajustado por, bacteroidetes, firmicutes, patrón 1, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

⁵: modelo ajustado por, firmicutes, patrón 2, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

⁶: modelo ajustado por, bacteroidetes, patrón 2, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

⁷: modelo ajustado por, firmicutes, patrón 1, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

⁸: modelo ajustado por, bacteroidetes, patrón 1, sexo, edad, AHF de sobrepeso u obesidad y AF.

^a: La microbiota se expresa en AR > al promedio y los patrones de alimentación se expresa en consumo > al promedio.

Anexo 1. Descripción de los grupos de alimentos.

Grupo de alimentos	Alimentos que los constituyen
1. Tortilla y alimentos a base de maíz	Tortilla de maíz, elote, pozole, palomitas de maíz, sope asado y tamales.
2. Antojitos mexicanos y comida rápida.	Tacos al pastor, sope frito, tortas, hamburguesas, nuggets, sándwiches, hot dogs, pizza, carnitas y barbacoa.
3. Pan de trigo y tortilla de harina y productos de panadería azucarados	Pan de caja blanco, pan de caja integral, bolillo, tortilla de harina, Pan de dulce, hot cakes, pastel, pastelillo relleno y galletas dulces.
4. Cereales listos para comer	Avena, cereal con fibra, cereales de caja sin azúcar, cereales azucarados y barras de cereal.
5. Papas, arroz y pasta	Papas, arroz, pasta seca y sopa de pasta caldosa
6. Leguminosas	Frijol y lentejas
7. Frutas frescas	Naranja, mandarina, manzana, pera, plátano, melón, mango, piña, papaya, sandía, fresa, durazno, uvas y ciruelas.
8. Verduras frescas	Jitomate, jícama, zanahoria, pepino, lechuga, nopal, calabacitas, brócoli y chicharos.
9. Picantes	Salsas picantes y chiles
10. Pollo	Pollo y hígado de pollo
11. Pescado	Pescado, atún y sardina
12. Carnes rojas	Carne de res, hígado de res y carne de cerdo
13. Embutidos	Jamón y salchichas
14. Agua	Agua natural
15. Lácteos con bajo contenido de grasa.	Leche descremada
16. Lácteos con alto contenido de grasa.	Leche entera, yogurt natural, yogurt activia, queso manchego, queso amarillo, malteadas, danonino, helado, leche con chocolate y queso crema, queso Oaxaca.
17. Huevos	Huevo.
18. Alimentos con grasa saturada	Chicharrón, chorizo y tocino.
19. Aderezos	Mayonesa, margarina y aderezos.
20. Dulces y azúcares	Agua fresca con azúcar, Yakult, agua con endulzante en polvo, jugo de naranja, dulce, chocolate, miel y dulce de chamoy.
21. Refrescos	Refresco de cola y de sabor, jugo industrializado y bebidas hidratantes.
22. Botanas saladas	Papas a la francesa, Frituras, galletas saladas y cacahuates japoneses.