



**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

Evaluación de la asociación de *Lactobacillus reuteri* y consumo de fructuosa con
obesidad infantil, en niños residentes de la Ciudad de México

Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias en Epidemiología

EIRA ELIANA HUERTA ÁVILA

Generación: 2015-2017

Directora de Tesis:

Dra. Ana Burguete García

Asesoras:

Dra. Luisa Elvira Torres Sánchez

Dra. Cinthya Estefhany Díaz Benítez

Cuernavaca, Morelos

Agosto del 2017

Citación sugerida

Huerta-Ávila E.E, Ramírez-Silva C.I, Díaz-Benítez C.E, Torres-Sánchez L.E, Burguete-García A.I. (2017). Tesis de Maestría en Ciencias en Epidemiología. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública. Escuela de Salud Pública de México.

Índice

Resumen.....	3
Introducción	5
Marco teórico	6
Obesidad	6
Obesidad infantil y fructosa.....	8
Obesidad infantil y <i>L. reuteri</i>	10
Planteamiento del problema	14
Justificación	15
Objetivos	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos	16
Metodología	16
Diseño del estudio y población	16
Mediciones antropométricas	17
Muestras de sangre	18
Actividad física.....	18
Información dietética.....	19
Determinación de <i>L. reuteri</i>	19
Análisis estadístico.....	22
Resultados	23
Discusión	25
Conclusión	29
Aspectos éticos y de bioseguridad de la investigación	29
Anexos	30
Anexo 1. Artículo publicable	30
Anexo 2. Tablas	47
Anexo 3. Diagramas	54
Referencia.....	57

Resumen

Antecedentes: México tiene una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad infantil de 33.2% en niños de 5-11 años. En adultos, el consumo dietético de fructosa y la abundancia relativa de *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) en la microbiota intestinal, se asocian con incrementos en el peso corporal. Sin embargo, en niños esta asociación ha sido poco explorada.

Objetivos: Evaluar la asociación entre el consumo de fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri* con cambio en el índice de masa corporal en niños residentes de la Ciudad de México.

Metodología: Estudio transversal con 1087 niños de 6 a 12 años, residentes de la Ciudad de México; a quienes se les calculó el índice de masa corporal al momento de la entrevista. A través de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos semi-cuantitativo, en el que se consideró como referencia el mes previo a la entrevista, se calculó el consumo promedio diario de fructosa de cada individuo. La abundancia relativa de *L. reuteri* se cuantificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) del DNA de heces. La asociación de *L. reuteri* y consumo de fructosa con indicadores de adiposidad (IMC y circunferencia de cintura) y alteraciones metabólicas se evaluó mediante modelos de regresión lineal y análisis de senderos.

Resultados: Una mayor contribución energética de fructosa y una mayor abundancia relativa de *L. reuteri* se asociaron positivamente con el IMC ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.40$, IC 95% 0.06; 0.74, $p=0.02$ y $\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.64$, IC 95% 0.30; 0.98, $p<0.001$, respectivamente) y con la CC ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.04$, IC 95% 0.01; 0.08, $p=0.01$ y $\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.06$; 95% IC 0.02; 0.67, $p=0.002$, respectivamente). Sin embargo, no se observó una interacción entre ambos sobre los indicadores de adiposidad. Así mismo se observó una asociación positiva mediada por los indicadores de adiposidad, entre *L. reuteri* y fructosa con glucosa, triglicéridos, insulina, índice HOMA y el LDL ($p<0.01$); mientras que la asociación con el HDL, fue negativa.

Conclusión: Similar a lo que se ha observado en adultos, la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa incrementan los indicadores de adiposidad en los niños y a través de ellos incrementan las alteraciones metabólicas en niños residentes de la Ciudad de México. Debido a que es el primer estudio que evalúa en forma conjunta el consumo de fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri* en niños, es necesario llevar a cabo estudios prospectivos que permitan confirmar esta asociación.

Palabras clave: Fructosa, *L. reuteri*, obesidad infantil y alteraciones metabólicas

Introducción

La obesidad es uno de los problemas más graves del siglo XXI. En México, 7 de cada 10 adultos tienen sobrepeso u obesidad. A su vez, desde 1999 hasta la fecha, la prevalencia de obesidad infantil ha aumentado en un 29%; alcanzando en el 2012 una prevalencia de un 34.4% en niños de 5-11 años y en el 2016 disminuyendo 1.2 puntos porcentuales con una prevalencia de 33.2% ^(1, 2).

Los niños que presentan obesidad y sobrepeso de acuerdo a lo reportado por Whitaker *et al*, tienen hasta un 50% más de probabilidad de ser obesos en la etapa adulta⁽³⁾ y con ello, mayor riesgo de presentar enfermedades crónicas como diabetes y enfermedades cardiovasculares a edades más tempranas ⁽¹⁾.

Aunque la obesidad se considera una enfermedad multifactorial, la dieta y algunos de sus componentes constituyen un componente importante en la cadena causal. En este proyecto evaluamos la ingesta de fructosa, la cual se ha documentado que al consumirse en grandes cantidades, puede promover entre otros padecimientos el aumento de peso corporal ^(4, 5). En la actualidad, la población infantil tiene mayor acceso al consumo de este monosacárido especialmente a partir de alimentos industrializados⁽⁶⁾. Así mismo, evaluamos el papel que juega la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad. Específicamente se evaluó *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*), el cual pertenece al filo de Firmicutes y se ha relacionado con la ganancia de peso corporal^(7, 8).

Marco teórico

Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial, entre los que destacan factores dietéticos, actividad física, genéticos, metabólicos, ambientales, sociales, económicos y culturales ^(9, 10). Desde el punto de vista clínico, la obesidad se caracteriza por alteraciones metabólicas relacionadas con la excesiva acumulación de grasa corporal y una inflamación crónica de baja intensidad ^(10, 11). Hasta hace pocos años, el tejido adiposo era considerado únicamente como un almacén de energía; actualmente se sabe que además de esa función, el tejido adiposo es un tejido metabólicamente activo capaz de sintetizar y secretar diversas proteínas o citocinas con acciones autócrinas, parácrinas y endócrinas⁽¹²⁾. Cuando hay desequilibrio entre el consumo de energía y gasto de la misma, se tiene como resultado un excesivo almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo; promoviendo hiperplasia e hipertrofia adipocitaria⁽¹³⁾, que a su vez contribuye a la producción de citocinas proinflamatorias (como factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 6 entre otras), así como al reclutamiento e infiltración de células inmunes como los macrófagos ^(11, 13). Estos procesos característicos de la obesidad, reciben el nombre de inflamación crónica de baja intensidad, que está asociada con el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina, los cuales favorecen el desarrollo de otras enfermedades crónicas⁽¹¹⁾.

Los tres principales factores relacionados positivamente con el desarrollo y mantenimiento de la obesidad infantil son el sedentarismo, antecedente de obesidad en los padres y una dieta hipercalórica, con un alto contenido de hidratos de carbono simples y grasas saturadas ⁽¹⁴⁾.

En un estudio realizado por Vilchis-Gil *et al* en niños de 6-12 años de edad, se reportó que un menor tiempo de actividad física moderada a vigorosa se asocia con mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad; así mismo, observaron que independientemente de la ingesta calórica diaria, los niños que pasan entre 3-4 horas al día frente al televisor tienen dos veces más posibilidad de presentar

obesidad en comparación al grupo que ve menos de 3 horas de televisión (OR 2.13, CI 95%; 1.20-3.78) ⁽¹⁵⁾.

Por otra parte, existe evidencia de que el 42% de los niños obesos tienen padres obesos y el riesgo de que un niño presente sobrepeso y obesidad si ambos padres son obesos es 15 veces mayor que el de los niños cuyos padres tienen normopeso ⁽¹⁶⁾. Este incremento en el riesgo de obesidad en los hijos de padres obesos puede estar dado por el hecho de que los padres y los hijos comparten factores genéticos y socioculturales que hace que exista una relación estrecha entre el estado nutricional de los padres con el de sus hijos ⁽¹⁶⁾.

Por último, se ha reportado que los niños y adolescentes (7-15 años de edad) que tienen un patrón dietético caracterizado por un elevado consumo de grasa, azúcares simples y energía, pero bajo en fibra tienen mayor probabilidad de exceso de adiposidad (OR 1.12. IC 95% 1.0-1.25; p=0.038) en comparación a quienes no tienen este patrón dietético ⁽¹⁷⁾.

En México, la obesidad infantil ha aumentado notoriamente a lo largo del tiempo. Comparado con lo observado en la encuesta nacional de salud de 1999, en un periodo de 7 años la prevalencia combinada de obesidad infantil y sobrepeso incrementó un 30% (26.9% vs 34.8%); mientras que la prevalencia de obesidad por si sola aumentó un 62% (9% vs 14.6%). Estos cambios se mantuvieron constantes en la encuesta nacional de 2012 y disminuyeron 1.2 puntos porcentuales en el 2016 ^(2, 18).

La clasificación de obesidad infantil varía conforme a los criterios implementados ⁽¹⁹⁾. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS; 2007), se considera obesos a aquellos niños que de acuerdo a la edad y sexo su puntaje Z sea igual o mayor a 2 desviaciones estándar (DE) ^(14, 20). Por otra parte, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, del Inglés, Centers for Disease Control and Prevention) refiere que un niño presenta obesidad si el

Índice de Masa Corporal (IMC) es igual o mayor al percentil 95 de acuerdo al sexo y edad ⁽²¹⁾.

Obesidad infantil y fructosa

La fructosa es un monosacárido de 6 carbonos, el cual aporta 3.6 kcal/g⁽²²⁾. Las fuentes naturales de fructosa son las frutas, verduras y la miel (en donde se encuentra de manera libre), así como el azúcar de mesa también conocida como sacarosa (disacárido compuesto por 50% de fructosa y 50 % glucosa) ⁽⁶⁾. Así mismo, en la industria alimentaria la fructosa se añade a los alimentos mediante el jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF: constituido por fructosa en una concentración de 42%-55%, siendo el resto complementado por agua y glucosa)⁽⁶⁾.

Existen dos formas en las que la fructosa puede ingresar al organismo: la primera es libre y la segunda es unida a la glucosa⁽⁴⁾. Cuando es en esta última forma, el disacárido formado por glucosa y fructosa es hidrolizado por la enzima sacarasa; una vez que la fructosa está libre, a nivel del duodeno y yeyuno se absorbe por difusión pasiva desde el lumen intestinal hasta el torrente sanguíneo a través de una proteína transportadora denominada GLUT 5 (independiente de sodio) ⁽⁴⁾. La fructosa también puede ser transportada al torrente sanguíneo por la proteína transportadora GLUT 2 que es dependiente de sodio ⁽⁴⁾.

Después de ingresar al torrente sanguíneo, la fructosa es transportada mediante la vena porta hacia el hígado, en donde es transformada a fructosa-1-fosfato por la fructoquinasa ⁽²³⁾. La fructosa-1-fosfato es convertida por la aldolasa β en triosa fosfato, di-hidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, metabolitos intermediarios de la glucólisis⁽²³⁾. Mediante este mecanismo la fructosa funciona como fuente no regulada de glicerol 3-fosfato y acetil-CoA en las numerosas vías metabólicas como glucólisis, gluconeogénesis y lipogénesis ⁽²⁴⁾, asociándose de esta manera al desarrollo de obesidad debido a una mayor disponibilidad de sustrato. Además de ello, existe evidencia de que el consumo excesivo de dicho monosacárido incrementa las concentraciones de ácido úrico, promueve la resistencia a la insulina, altera la disfunción endotelial y produce estrés oxidativo

(5, 22). Otro mecanismo mediante el cual la fructosa puede promover el desarrollo de obesidad es debido a que es un promotor orexigénico; al parecer, este monosacárido no estimula las células beta del páncreas, y al no haber secreción de insulina, no hay señalización de saciedad en el cerebro (25, 26) .

En un revisión sistemática realizada por Sievenpiper *et al* en el 2012; se incluyeron 41 ensayos clínicos que evaluaron la influencia del consumo de fructosa con el peso corporal, observando que cuando la dieta era hipercalórica, los sujetos que recibieron fructosa adicional presentaron un incremento significativo de peso en comparación a aquellos que no recibieron fructosa (diferencia de medias 0.53 kg. CI 95% 0.26 - 0.79), sin embargo con dieta isocalórica no hubo cambios en el peso corporal en los que recibieron la intervención (27). Lo anterior puede explicarse con los resultados obtenidos por Chiavaroli *et al*, quienes al analizar diferentes ensayos clínicos muestran que la concentración media de los triglicéridos es estadísticamente mayor entre quienes reciben fructosa en comparación a quienes no (diferencia de medias = 0.26 mmol/L. 95% IC; 0.11-0.41)⁽²⁸⁾; es decir, la fructosa puede afectar los niveles de lípidos especialmente los triglicéridos cuando la ingesta de calorías es excesiva. Dichas conclusiones son congruentes por las establecidas por Wang y colaboradores (diferencias de medias= 0.65mmol/L. 95%; IC; 0.30-1.01)⁽²⁹⁾.

También se han realizado estudios para evaluar la cantidad y fuente de fructosa consumida por los niños en relación a su peso. En el 2007 Aeberli *et al*, reportaron el consumo de fructosa en niños suizos, en donde la ingesta de fructosa es estadísticamente mayor en los niños obesos en comparación a los normopeso (40.0 ± 31.7 y 23.4 ± 26.0 respectivamente; $p < 0.05$)⁽³⁰⁾. La fuente principal de fructosa para estos niños fueron los dulces y bebidas azucaradas⁽³⁰⁾. Así mismo, se han encontrado asociaciones positivas entre el consumo de refrescos e incremento en el peso corporal, específicamente grasa corporal⁽³¹⁾. En el 2001, Ludwig *et al*, en una muestra de 548 escolares americanos, encontraron que por cada 200ml/día de bebidas azucaradas consumidas, la media del IMC aumentaba 0.24 kg/m² (IC95% 0.10–0.39; $p=0.03$); mediante análisis de regresión logística

para evaluar la asociación entre el consumo de bebidas azucaradas y obesidad, observaron que por cada 200ml/día ingeridos de estas bebidas aumentaba la posibilidad de presentar obesidad en un 60% (OR 1.60, IC 95% 1.14-2.24; $p=0.02$)⁽³²⁾. Recientemente en Grecia, Papandreou y colaboradores mostraron que el consumo de bebidas azucaradas en niños se asoció con un incremento en la posibilidad de presentar sobrepeso y obesidad (OR 2.57, IC 95% 1.06-3.38; $p<0.05$)⁽³³⁾.

En México se ha evaluado la disponibilidad de alimentos densamente energéticos y bebidas azucaradas en niños de 5-11 años de edad, encontrándose una elevada disponibilidad de estos productos dentro y fuera de las escuelas⁽³⁴⁾. También se ha reportado que las bebidas, entre ellas las azucaradas, aportan 21% del total de energía consumida al día en la población mexicana⁽³⁵⁾.

Obesidad infantil y *L. reuteri*

La microbiota es un conjunto de microorganismos en una comunidad o un hábitat que interactúan de manera compleja, desarrollando diferentes actividades de acuerdo al área del cuerpo en que se encuentren⁽³⁶⁾. Las acciones colectivas de estos microorganismos han sido consideradas como las de un órgano vital y a su vez, relevantes para la salud humana y para varios procesos de enfermedades de diferente índole, entre ellas, la obesidad⁽³⁷⁾.

La clasificación taxonómica de la microbiota en orden descendente es: filo o división, clase, orden, familia, y posteriormente género y especie⁽³⁸⁾. En el cuerpo humano hay áreas específicas que cuentan con una gran diversidad de microbiota: oídos, nariz, conjuntivas, piel, uretra, vagina, y tracto gastrointestinal, el cual es el nicho que tiene la mayor abundancia y riqueza de microorganismos^(39, 40).

A nivel de filos, los más importantes en el tracto gastrointestinal humano son: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias y Actinobacterias⁽³⁹⁾. Sin embargo, hay diferencias en la composición y abundancia de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal⁽⁴¹⁾. En la boca y orofaringe predomina los siguientes géneros

bacterianos: *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Eubacteria*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Lactobacterium*, *Nisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Treponema* y *Veillonella* ⁽⁴²⁾. En el estómago los géneros que prevalecen son: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Peptoestreptococcus*, en una proporción promedio de 10^3 ⁽³⁹⁾. En el intestino delgado la riqueza y abundancia de la población de microorganismos incrementa hasta 10^7 , con dominio de *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, los *Mycobacterium*, *Enterococcus* y bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* ⁽³⁹⁾. Al final de tracto gastrointestinal, en el colon, la población de bacterias aumenta aún más, llegando a valores exponenciales de 10^{13} , con presencia de *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Peptoestreptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium* y otras bacterias del filo Actinobacteria ⁽³⁹⁾.

La variación de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal depende de algunos factores internos como: la acidez, la concentración de oxígeno, el tipo de tejido, la existencia de componentes inmunológicos y secreciones gastrointestinales, entre otros ⁽³⁹⁾. Mientras que entre los factores externos que pueden afectar la composición de bacterias presentes se consideran: la dieta, el estrés y el uso de ciertos fármacos (antibióticos, procinéticos, inhibidores de la bomba de protones etc.), prebióticos y probióticos ^(39, 43, 44).

Estudios en modelos animales y en humanos sugieren una asociación entre la microbiota intestinal y obesidad. Un estudio en ratones convencionales y libre de gérmenes alimentados con una dieta *ad libitum* alta en grasa durante 2 semanas, demostró que el contenido de grasa corporal total y el peso del epidídimo fue mayor en los ratones convencionales que en ratones libres de gérmenes (13% vs al 8% y 0.15 g vs 0.10 g, respectivamente); a pesar de que los ratones libres de gérmenes tenían mayor consumo de alimentos (4,3 g / día vs a 3,3 g / día) ⁽⁴⁵⁾.

Un resultado similar se observó en estudios con ratones libres de gérmenes a quienes se les transfirió microbiota de ratones obesos y no obesos ⁽⁴⁶⁾; así como,

otro en el cual se les transfirió microbiota de gemelos humanos discordantes con y sin obesidad ⁽⁴⁷⁾. En el primero, después de 2 semanas los ratones libres de gérmenes que recibieron microbiota de ratones obesos, presentaron un aumento de grasa corporal (47%) significativamente mayor a la de los que recibieron microbiota de ratones con peso normal (26%). La microbiota de los ratones donantes obesos y sus ratones receptores tuvieron una mayor proporción de Firmicutes (69 y 63%, respectivamente) que los ratones donantes de peso normal (55%) y sus receptores (49%) ⁽⁴⁶⁾. En el segundo estudio, los ratones que recibieron el trasplante fecal de personas obesas tuvieron una ganancia de tejido adiposo significativamente mayor ($p \leq 0.001$) que la que tuvieron los ratones que recibieron el trasplante de personas delgadas ⁽⁴⁷⁾. Estos resultados sugieren que la microbiota de los ratones obesos tiene una mayor capacidad de capturar energía de la dieta que la de los no obesos; además parecen promover la absorción de monosacáridos a partir de la luz intestinal, con la consiguiente inducción de la lipogénesis hepática de novo y con ello mayor ganancia de peso ⁽⁴⁵⁾.

En un estudio de intervención dietética realizada por Ley y colaboradores⁽⁴⁸⁾, evaluaron la relación entre el perfil de microbiota intestinal y la grasa corporal en 12 personas obesas, quienes fueron aleatoriamente asignadas a recibir dieta hipocalórica restringida en grasas (FAT-R) o dieta hipocalórica restringida en carbohidratos (CARB-R) en el periodo de un año⁽⁴⁸⁾. Previo a las intervenciones dietéticas, se evaluó el perfil de microbiota de estas personas y se comparó con el de las personas delgadas; en este estudio se mostró que las personas obesas tenían menores concentraciones de Bacteroidetes y mayores de Firmicutes que los controles delgados ($p < 0.05$)⁽⁴⁸⁾. Posterior al año de intervención dietética, el aumento de la abundancia de Bacteroidetes correlacionó positivamente con el porcentaje de pérdida de peso corporal en ambas dietas ($R^2 = 0.5$ (FAT-R) y 0.8 (CARB-R); $p < 0.05$)⁽⁴⁸⁾.

En niños se han encontrado resultados similares. Estrada *et al* encontraron que un perfil de abundancia relativa alta Bacteroidetes tenían 40% menos posibilidades de presentar sobrepeso u obesidad (OR=0.62, IC 95% 0.47-0.82; $p=0.001$) en

comparación con los niños con un perfil de abundancia relativa baja; por otro lado, los niños con un perfil de abundancia relativa alta de Firmicutes tenían 50% más posibilidades de presentar sobrepeso/obesidad (OR=1.53, IC 95% 1.16-2.01; p=0.001) ⁽⁴⁹⁾. Cuando se evaluó la microbiota aunada al tipo de alimentación, observaron que los niños con abundancia relativa alta de Firmicutes y un consumo alto de hidratos de carbono simple y grasas saturadas tenían el doble de posibilidad de tener sobrepeso/obesidad (OR=1.98, IC 95% 1.21- 3.24; p=0.006) ⁽⁴⁹⁾.

La microbiota desempeña funciones de índole metabólica, trófica y de protección inmunológica⁽³⁹⁾. Sin embargo, dentro de dichas funciones, las más intrínsecamente relacionadas con la obesidad son las metabólicas⁽³⁹⁾. Especies del genero *Lactobacillus* del filo Firmicutes se han relacionado con la ganancia de peso debido a que tienen una alteración en 31 genes involucrados con el metabolismo de los hidratos de carbono; con ello, incapacitándolas al catabolismo de monosacáridos como la fructosa y permitiendo a su vez que esta pase al torrente sanguíneo del hospedero ⁽⁵⁰⁾. Una de estas especies es el *L. reuteri*, bacteria grampositiva autóctona del tracto gastrointestinal humano que en condiciones normales es el menos frecuente de los Lactobacilos ⁽⁸⁾. Si bien, *L. reuteri* no puede catabolizar la fructosa, se ha propuesto que se puede aprovechar de esta molécula al obtener la energía generada a partir del intercambio de electrones, para así aumentar su tasa de crecimiento ^(8, 51). Así, *L. reuteri* fermenta los polisacáridos no digeribles de la dieta en monosacáridos absorbibles y en ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lo cual confiere una mayor recuperación de energía para el hospedero ^(51, 52). El butirato, propionato y acetato, que son AGCC, pueden modificar las concentraciones de varias hormonas intestinales involucradas en la homeostasis de la glucosa y de la energía⁽³⁹⁾; incluso, estos AGCC pueden ser metabolizados en el hígado en lípidos complejos (triglicéridos), favoreciendo la ganancia de peso ⁽⁵²⁾.

Entre otras funciones, *L. reuteri* produce sustancias con efecto antimicrobiano como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, reuteriicina y la reuterina, que

inhiben el crecimiento de diversos microorganismos patógenos como *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *H. pylori* y rotavirus⁽⁵³⁾; por lo que esta especie bacteriana juega un papel importante en el tratamiento y control de ciertos trastornos gastrointestinales que comúnmente se presentan en niños, como la diarrea, los cólicos y la colitis necrosante⁽⁵⁴⁾. Debido a esto, las cepas *L reuteri* se han añadido frecuentemente como probióticos a ciertas fórmulas lácteas o se han administrado como lisados bacterianos, cápsulas o gotas para su venta individual⁽⁵⁵⁾.

Existe poca evidencia en humanos acerca de la asociación de *L. reuteri* con el sobrepeso y la obesidad; algunas de las existentes son evidencias indirectas. Por ejemplo, los niños alimentados con fórmula láctea tienen más riesgo de presentar obesidad que los niños alimentados al seno materno⁽⁵⁶⁾ y en una primera caracterización realizada, acerca del tipo de *Lactobacillus* que tienen los bebés alimentados con fórmula en comparación con los alimentados con leche materna, se observó que uno de los *Lactobacillus* más abundantes en aquellos lactantes alimentados con fórmula es el *L. reuteri*⁽⁵⁷⁾. En población adulta, la mayor abundancia de *L. reuteri* se asoció con obesidad (OR=1.79; 95% CI 1.03–3.10; p=0.04)⁽⁷⁾ y además correlacionó positivamente con el IMC (r=0.85, CI 95% 0.12–0.58; p=0.02)⁽⁵⁸⁾.

Planteamiento del problema

En México como en otras países de América Latina se ha relacionado el incremento de la prevalencia de obesidad infantil con el aumentado en el consumo azúcares debido a golosinas, refrescos, jugos, entre otros alimentos industrializados⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. De hecho, nuestro país ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial de consumo de bebidas azucaradas (115,4 litros per cápita al año)⁽⁶²⁾. A partir de los años ochenta con la entrada en vigor del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) los refrescos y demás productos industrializados son endulzados mayormente con fructuosa⁽⁶³⁾; en donde dicho monosacárido se ha relacionado con la obesidad debido a que funciona como

fuerza no regulada de glicerol 3-fosfato y acetil-CoA en la vía metabólica como la lipogénesis ⁽²⁴⁾.

Por otra parte, se ha relacionado a la obesidad con un perfil de microbiota caracterizada por una elevada abundancia relativa del filo Firmicutes y a nivel de especie de *L. reuteri*; la cual se caracteriza por tener la capacidad de aumentar la síntesis de moléculas intermedias para producción de triglicéridos, así como de carecer de enzimas para metabolizar monosacáridos como la fructosa, permitiendo que esta molécula ingrese en mayor proporción al torrente sanguíneo del hospedero ^(50, 52).

Debido a lo anterior, para este estudio nos hemos planteado la siguiente pregunta de investigación: ¿El *Lactobacillus reuteri* y el consumo de fructosa se asocian con un cambio en el índice de masa corporal?

Justificación

Los niños con obesidad tienen mayor riesgo de desarrollar otras enfermedades crónico-degenerativas a edades más tempranas, lo cual conlleva a una carga no solo a nivel personal y familiar, sino también social, así como para el sistema de salud del país. Por lo que se necesita generar conocimiento para una mejor caracterización de los factores asociados a la obesidad.

Tanto el consumo de fructosa como *L. reuteri* se han encontrado asociados a obesidad, pero se han estudiado separados o independientes por lo que dados los efectos de ambos factores como promotores de lipogénesis, y ganancia de peso se requiere evaluar en forma conjunta el consumo fructosa y el *L. reuteri* en niños con obesidad. Con este estudio que toma en cuenta ambos factores en población infantil, se aportará evidencia epidemiológica que contribuirá a reforzar las recomendaciones generales y dietéticas ya establecidas para prevenir y controlar la obesidad.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la asociación de la abundancia relativa de *Lactobacillus reuteri* en colon distal y consumo dietético de fructuosa con obesidad infantil.

Objetivos específicos

- Estimar mediante un cuestionario frecuencia de consumo de alimentos (CFCA), el consumo diario de fructosa de niños con y sin sobrepeso u obesidad.
- Evaluar la asociación entre consumo dietético de fructosa y obesidad infantil en niños residentes en la Ciudad de México.
- Determinar mediante qPCR la abundancia relativa de *L. reuteri* en heces de los niños con y sin sobrepeso u obesidad.
- Evaluar la asociación entre *L. reuteri* y obesidad infantil en niños residentes en la Ciudad de México.
- Evaluar el efecto conjunto entre *L. reuteri* y consumo dietético de fructosa sobre la obesidad infantil en niños residentes en la Ciudad de México.

Metodología

Diseño del estudio y población

Entre Junio del 2011 a Julio del 2013 se realizó un estudio transversal titulado “Evaluación de la interacción entre el consumo de macronutrientes y el perfil de la microbiota del colon distal y su asociación con obesidad infantil (SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 000000000180808)”, el cual contó con la aprobación de las comisiones de ética e investigación del Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP aprobación 1294).

El muestreo que se llevó a cabo en dicho estudio fue simple no probabilístico en cuatro puntos (norte, sur, este y oeste) de la ciudad de México en 1482 niños no relacionados entre 6-14 años edad, que no presentaran antecedentes de diabetes, hipertensión arterial o enfermedad cardiovascular.

Personal debidamente entrenado entrevistó a los niños en conjunto con alguno de sus padres o tutores, y obtuvieron información socioeconómica, demográfica, antecedentes patológicos personales y heredofamiliares, así como información sobre actividad física y dieta. También se tomaron mediciones antropométricas, muestra de sangre venosa y heces fecales. Se excluyeron del estudio original aquellos niños que para el momento de la entrevista presentaran diagnóstico de enfermedades infecciosas, desórdenes gastrointestinales o que hubieran estado tomando antibióticos durante 2 meses previos al estudio.

Para el presente proyecto se realizará un análisis de datos secundarios (banco de muestras biológicas y base de datos), de 1087 niños de la base original, todos ellos de entre 6 y 12 años edad, los cuales cuentan con la información completa de antropometría, datos generales, perfil bioquímico, dieta y DNA de muestras fecales.

Mediciones antropométricas

Las mediciones antropométricas se realizaron por personal capacitado, previamente estandarizado por el método Habicht ⁽⁶⁴⁾. Se utilizaron básculas con una precisión de 0.1 kg, así como estadímetro y cintas métricas, ambos con precisión de 1mm (todos de la marca comercial SECA). La medición de peso (kg), talla (cm), circunferencia de cintura (cm) y circunferencia de cadera (cm) se realizó con la menor cantidad de ropa posible y sin zapatos, siguiendo el procedimiento descrito por Lohman ⁽⁶⁵⁾. El índice de masa corporal se calculó (IMC, kg/m^2) y utilizando el Macro creado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se obtuvo el puntaje Z. La clasificación de los niños en peso normal, sobrepeso y

obesidad se realizó con base a los puntos de corte sobre el puntaje Z de IMC para edad y sexo; Normal de -2 a 1 desviaciones estándar (DE), Sobrepeso de > 1 a ≤ 2 DE y Obesidad > 2 DE ⁽²⁰⁾. Para este estudio solo se consideraron dos estratos; normal vs sobrepeso y obesidad. Para el resto de los análisis fue modelado de manera continua. Para la circunferencia de cintura no se establecieron puntos de corte y fue analizada de manera continua.

Muestras de sangre

La muestra de sangre venosa (5ml) se tomó en vacutainers con EDTA a cada uno de los participantes, tras 12 horas de ayuno. Una vez tomadas las muestras, éstas se trasladaron en hieleras a la unidad de Bioquímica del CMN Siglo XXI en un periodo menor o igual a 2 horas. En la unidad de Bioquímica se realizaron las determinaciones de glucosa, colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos con el equipo Clinical Chemistry System ILAB 300 plus®. Para la medición de insulina, se utilizó el método por quimioluminiscencia con el equipo INMULITE®. El índice de resistencia a la insulina (HOMA; por sus siglas en inglés) se calculó mediante la fórmula propuesta por Hosker y Matthews ⁽⁶⁶⁾.

Actividad física

El cuestionario de actividad física que se usó fue adaptado y validado para esta población ⁽⁶⁷⁾ e incluyó información acerca de la actividad física realizada de forma habitual durante el último mes antes de la entrevista. Se preguntó sobre actividades durante su estancia en la escuela y en el tiempo libre, como: jugar fútbol soccer, ciclismo, entre otras; así mismo, se indagó sobre el tiempo dedicado a actividades sedentarias: ver la televisión o estar frente a la computadora. El tipo y la duración se transformaron en equivalentes metabólicos (MET/mes) mediante el software “Food Processor Nutrition and Fitness Analysis”, versión 10,12.0; ESHA Research Inc., Oregon, EE.UU. ⁽⁶⁸⁾. Esta variable fue utilizada de manera continua.

Información dietética

La información dietética de los niños durante el mes previo a la entrevista, se obtuvo mediante un Cuestionario semi-cuantitativo de Frecuencia de Consumo de 107 Alimentos (CFCA), que fue elaborado para el estudio original siguiendo la metodología descrita por Willet W *et al* ⁽⁶⁹⁾. Las opciones de consumo variaron entre nunca, hasta 6 o más veces al día y con base en el consumo reportado y la porción preestablecida, se obtuvo la frecuencia de consumo de cada alimento en gramos por día. El consumo de energía, macronutrientes y fructosa consumidos por cada niño se calculó usando la base de datos del valor nutritivo de los alimentos desarrollada por el Instituto Nacional de Salud Pública de México ⁽⁷⁰⁾. Debido a que no contamos con información acerca del contenido de fructosa de los alimentos mexicanos ⁽²²⁾, a la base anteriormente mencionada se le adicionó el contenido de fructosa descrito en la plataforma del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) ⁽⁷¹⁾.

El consumo de fructosa fue analizado utilizando el método de ajuste de energía de densidad de nutrientes ⁽⁷²⁾, el cual se obtuvo dividiendo las calorías provenientes del consumo de fructosa entre el consumo energético total y se multiplicó por 100. Este porcentaje de contribución de la fructosa se categorizó en bajo, medio y alto de acuerdo a la distribución en terciles de la población de estudio.

Determinación de *L. reuteri*

Como parte del proyecto original, el DNA de las muestras fecales de cada niño se obtuvo y se almacenó en criotubos a -20°C. El procedimiento de extracción de DNA se realizó de acuerdo a las instrucciones descritas en el kit QIAmp® DNA Stool (Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia). Se cuantificó la concentración y pureza del DNA (260/280) en el espectrofotómetro Nano Drop 1000 LITE (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

La determinación de la abundancia de *L. reuteri* en heces, se realizó mediante PCR cuantitativa. En primera instancia se procedió a la estandarización de la

técnica para obtener las condiciones óptimas de amplificación, efectuando tres amplificaciones de *L. reuteri* utilizando diferentes concentraciones de DNA (5ng/μL, 10 ng/μL y 15 ng/μL), y diluciones de los oligonucleótidos sentido y antisentido de *L. reuteri* (1 pmol/μL, 5pmol/μL y 10pmol/μL) (ver. cuadro A). Se amplificaron los productos utilizando la siguiente mezcla de reacción: 5μl de SYBR® Green/ROX (2X) qPCR Master Mix, oligonucleótido sentido, oligonucleótido antisentido, 2μL de agua libre de RNasas y DNasas, y DNA de heces en un volumen final de 10μL. La mezcla de reacción fue colocada en placas de 96 pozos y la amplificación se llevó a cabo en el equipo Step One Plus de Applied Biosystem. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 minuto a 56°C, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C para *L. reuteri* y para Universal 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 minuto a 58°C, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

La amplificación específica de nuestro gen de interés se confirmó mediante la curva de disociación (curva melt o curva melting) corroborando que la fluorescencia respecto del tiempo (dF/dT) presente un solo pico.

Posteriormente se realizó la determinación de las eficiencias de amplificación para comparar los genes *L. reuteri* ⁽⁵⁷⁾ con el gen normalizador (oligonucleótido universal el cual reconoce el gen ribosomal 16S bacteriano⁽⁷³⁾).

Para lo anterior se utilizaron diluciones exponenciales de DNA de heces (100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 0.1 ng/μL, 0.01 ng/μL).

Esto se calculó con la siguiente fórmula:

$$E=10^{(-1/S)}-1$$

Subsiguientemente se verificó el porcentaje de acoplamiento del oligonucleótido al DNA molde y se graficó los diferentes ΔCT (gen de *L. reuteri* - gen universal) obtenidos en las curvas estándar de cada uno.

El proceso anterior sirvió para establecer la temperatura de alineamiento, así como las concentraciones de DNA y oligonucleótidos.

Una vez que se comprobó la correcta amplificación de DNA con los oligonucleótidos específicos de *L. reuteri*, se eligieron las muestras que amplifiquen a un ciclo temprano. Se verificó el tamaño de los fragmentos

amplificados con los oligonucleótidos de *L. reuteri* en geles de agarosa al 1.5% con buffer TAE 1X. En el primer pozo se agregó 5 µL del marcador de peso molecular L-50 o L-100 (GeneRuler DNA Ladder). En el segundo pozo se pusieron 10 µL del control negativo de la reacción con 2 µL de colorante de carga y en los pozos restantes 10 µL de producto amplificado. Se dejaron migrar las muestras de DNA entre 30 a 40 minutos a 100 voltios y se colocaron el gel teñido con bromuro de etidio (EtBr) sobre un transiluminador de luz ultravioleta para verificar el tamaño esperado.

Para comprobar que la secuencia correspondiera a la especie de *L. reuteri*, se cortó la banda del producto amplificado y se purificó mediante un Kit de purificación de DNA "QIAquick® Gel Extraction Kit" (QUIAGEN). Este fragmento de DNA fue mezclado con el oligonucleótido de amplificación antisentido (3'→5') para *L. reuteri* y fué enviado a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Los archivos de secuenciación fueron leídos en el programa Chromas y BLAST (nucleotide blast) de la página NCBI.

Cada reacción se realizó por duplicado para disminuir el rango de error en la amplificación, además se colocó un control negativo (mezcla de reacción sin DNA) en cada placa.

Se obtuvieron las unidades de abundancia relativa de *L. reuteri* mediante el método comparativo de Ct en el cual se utilizaron como gen normalizador los oligonucleótidos universales⁽⁷⁴⁾.

La fórmula es la siguiente:

$$2^{-\Delta Ct}$$

Dónde:

2= Representa la eficiencia máxima de la PCR

ΔCt = Ct del gen de interés (*L. reuteri*) - Ct del gen ribosomal 16S

Análisis estadístico

Las variables seleccionadas se compararon de acuerdo a la condición de peso normal y sobrepeso/obesidad. Para las variables continuas se usó la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney debido a que estas variables no tuvieron una distribución normal, la cual se evaluó mediante la prueba de Shapiro Wilk y gráficas pertinentes. Para la comparación de las variables categóricas se usó la prueba de Chi-cuadrada (χ^2).

También se evaluó la distribución de estas mismas variables de acuerdo a los terciles de contribución energética de fructosa y terciles de abundancia relativa de *L. reuteri*, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para las variables continuas y nuevamente la prueba χ^2 para las variables categóricas.

La asociación entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el porcentaje de contribución energética de fructosa sobre el puntaje Z de IMC y la circunferencia de cintura, se estimó mediante modelos independientes de regresión lineal. Tanto la abundancia relativa de *L. reuteri* como el porcentaje de contribución energética de fructosa fueron estratificados en terciles. Además se evaluó un término de interacción multiplicativa entre estas variables sobre el puntaje Z de IMC y la circunferencia de cintura. En ambos modelos se valoraron los supuestos de linealidad, normalidad, homocedasticidad y no colinealidad, mediante métodos estadísticos numéricos y gráficos. Debido a que el modelo en el que se incluyó a la circunferencia de cintura no cumplió los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se transformó dicha variable utilizando el logaritmo natural. Los modelos finales fueron ajustados por edad, sexo, antecedentes heredofamiliares de obesidad y actividad física en tiempo libre. El antecedente heredofamiliar de diabetes fue otra covariable de ajuste que se examinó, sin presentar alteraciones en el estimador por lo cual fue retirada. Las covariables de ajuste fueron seleccionadas con base a su relevancia biológica y a que estuvieran relacionados con las variables de exposición y a las variables de respuesta pero que no formarán parte de la cadena causal.

Finalmente, con la intención de evaluar la asociación directa, indirecta y total entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el porcentaje de la contribución de fructosa con el IMC, circunferencia de cintura y parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL, insulina e Índice HOMA) se realizó un análisis de senderos. El colesterol total no fue incluido en el análisis de senderos, porque entre este bioquímico y las variables independientes no se encontró una asociación significativa. Se consideró como significativo una $p < 0.05$.

Todos los análisis se realizaron utilizando la versión 13.0 del paquete estadístico STATA SE (College Station, TX).

Resultados

La prevalencia de sobrepeso u obesidad en estos niños fue de 53.08%. En la Tabla 1 se muestran las características generales, bioquímicas y dietéticas, del total de los niños y de acuerdo a la condición de normopeso y sobrepeso/obesidad. Comparado con los niños normopeso, los niños con sobrepeso u obesidad, se caracterizaron por tener mayor edad (9.63 vs. 9.1 años, $p < 0.001$), ser más hombres que mujeres (58.58 vs 41.42, $p = 0.02$), tener más antecedentes heredofamiliares de obesidad (61.35 vs 47.74%, $p < 0.001$) y diabetes tipo 2 (13.52 vs 9.63, $p = 0.05$), así como concentraciones más elevadas de glucosa (82 vs 81 mg/dl, $p = 0.009$), triglicéridos (98 vs 68 mg/dl, $p < 0.001$), colesterol total (160.5 vs 153mg/dl, $p = 0.001$), LDL (107 vs 96 mg/dl, $p < 0.001$), insulina (8.62 vs 4.35 UI/ml, $p < 0.001$) e índice HOMA (1.73 vs 0.84, $p < 0.001$) y más bajas de HDL (47 vs 53 mg/dl, $p < 0.001$).

El principal aporte de fructosa provino del consumo de bebidas azucaradas industrializadas y caseras; seguido de frutas enteras, bebidas lácteas endulzadas, dulces, chocolates y bollería (datos no mostrados en tablas). El mayor consumo de fructosa (59.67 vs 40.33%, $p = 0.009$) y la alta abundancia relativa de *L. reuteri* se observó en los niños con sobrepeso/obesidad (61.88 vs 38.12%, $p < 0.001$) (Tabla 2).

Los niños con mayor contribución energética de fructosa tuvieron un menor consumo de energía con respecto al resto de los niños (1948.79 vs 2218.09 kcal/día, $p < 0.001$) (Tabla 3). Por otro lado, los niños con una mayor abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con mayor concentración de insulina (6.63 vs 5.63 UI/ml, $p = 0.02$) e índice HOMA (1.39 vs. 1.11, $p = 0.01$) (Tabla 4).

Después de ajustar por edad, sexo, antecedentes familiares de obesidad y actividad física en tiempo libre, se observó que los niños con mayor contribución energética de fructosa ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.40$; IC 95% 0.06; 0.74, $p = 0.02$) y mayor abundancia relativa de *L. reuteri* ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.64$; IC 95% 0.30; 0.98, $p < 0.001$), tuvieron en promedio un mayor puntaje Z de IMC. De forma similar, los niños con mayor contribución energética de fructosa tuvieron una CC 4% mayor que los niños que reportaron un menor consumo de fructosa ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.04$; IC 95% 0.01; 0.08, $p_{\text{tendencia}} = 0.01$). Esta tendencia también se observó con respecto a los terciles de abundancia relativa de *L. reuteri*; en donde los niños con mayor abundancia relativa de *L. reuteri*, presentaron una CC 6% ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.06$; IC 95% 0.02; 0.67, $p = 0.002$) mayor que la observada en los niños con abundancia relativa baja (Tabla 5). No se observó una interacción significativa entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa sobre el puntaje Z de IMC ($p_{\text{de interacción}} = 0.44$) y la CC ($p_{\text{de interacción}} = 0.70$) (Tabla 5).

En las figuras 2, 3 y en la tabla suplementaria 1, se muestran las asociaciones directas e indirectas del consumo de fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri*, con los indicadores de adiposidad y variables bioquímicas estimadas a través del modelo de senderos. De acuerdo con este tipo de modelaje, un incremento porcentual en el consumo de fructosa solo se asoció de forma directa con un aumento significativo en el puntaje Z de IMC ($\beta = 0.07$; 95% IC 0.01, 0.12, $p = 0.008$) y de la CC ($\beta = 0.65$; 95% IC 0.27, 1.04, $p = 0.001$). Las asociaciones con los parámetros bioquímicos, fueron de tipo indirecto y positivos, a través de los indicadores de adiposidad; excepto para el HDL, el cual disminuyó de manera significativa conforme aumentó porcentualmente la contribución energética de

fructuosa ($\beta = -0.28$; 95% CI $-0.46, -0.09$, $p=0.003$) (tabla suplementaria 1; figuras 2 y 3).

Al igual que la fructuosa, un incremento en la abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con un incremento directo en el puntaje Z de IMC ($\beta = 0.16$; 95% IC $0.09, 0.24$, $p<0.001$) y en la CC ($\beta = 1.13$; 95% IC $0.58, 1.68$, $p<0.001$). De igual forma se asoció indirectamente y en el mismo sentido con los parámetros bioquímicos; excepto con las concentraciones séricas de triglicéridos, donde la asociación fue directa e indirecta y en direcciones opuestas. De forma directa, un incremento en la abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con una disminución en las concentraciones de triglicéridos ($\beta = -3.24$; 95% CI $-2.18, -1.01$, $p=0.001$); mientras que de manera indirecta la asociación fue positiva ($\beta = 2.50$; 95% IC $1.56, 3.41$, $p<0.001$).

Discusión

Estos resultados sugieren que la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa son dos factores independientes relacionados con la obesidad y sus alteraciones metabólicas en población infantil. Una mayor abundancia relativa de *L. reuteri* y de contribución energética de fructosa se asociaron directa y positivamente con los indicadores de adiposidad; mientras que con la mayoría de los parámetros bioquímicos la asociación fue positiva y mediada por su asociación con los indicadores de adiposidad. El único parámetro que se asoció con ambos factores y de forma negativa fue el HDL. En contraste, la asociación de *L. reuteri* con las concentraciones de triglicéridos tienen un comportamiento directo e indirecto y en sentidos inversos.

El consumo de fructosa y su asociación con obesidad se ha estudiado considerablemente en adultos. En concordancia con nuestros resultados, Stanhope KL *et al*⁽⁷⁵⁾, en un ensayo clínico realizado en adultos estadounidense entre 40-72 años, encontraron que en comparación con los sujetos que consumieron glucosa, los que consumieron fructosa durante 8 semanas

presentaron un aumento del 1.4% en el peso corporal ($p < 0.001$), y de 14.5% en el área intra-abdominal medida por densitometría ($p < 0.01$)⁽⁷⁵⁾. En contraste, en un estudio realizado por Lê KA *et al*⁽⁷⁶⁾ en hombres suizos con una edad promedio de 24.7 ± 1.3 , no se detectó un cambio estadísticamente significativo ($p > 0.05$) en el peso corporal ni en la masa grasa tras 4 semanas de intervención con fructosa; lo cual, puede ser debido al corto tiempo de exposición de dicho monosacárido y a un tamaño de muestra pequeño ($n=7$)⁽⁷⁶⁾. Así mismo, en un metaanálisis que incluyó 41 ensayos clínicos, el consumo de fructuosa entre sujetos que reportaron dietas hipercalóricas, se asoció con un incremento significativo de 0.53 kg de peso corporal⁽²⁷⁾. En los sujetos con dieta normocalórica no se observó ningún efecto pero esto puede ser debido a que los estudios en su mayoría se caracterizaron por tener muestras pequeñas (<15 participantes), periodo de intervención corto (<12 semanas) y al menos el 60% de los estudios fue de baja calidad de acuerdo al índice de calidad metodológica de Heyland⁽⁷⁷⁾.

Diversos estudios preclínicos han descrito el mecanismo por el cual la fructosa se relaciona con la obesidad. La fructosa se absorbe por difusión pasiva a nivel de duodeno/yeyuno hasta llegar al torrente sanguíneo (sin estimular la secreción de la insulina, bloqueando el mecanismo de saciedad). A través de la vena porta la fructuosa pasa al hígado, en donde es metabolizada por la fructoquinasa (vía alterna a la glicolítica), y en etapas posteriores genera glicelaldehído y dihidroxiacetona fosfato⁽⁷⁸⁾. De esta manera, la fructosa sirve como una fuente no regulada por ATP y citrato tanto de glicerol-3-fosfato como de acetil-CoA para la producción de triglicéridos hepáticos; los cuales, se pueden almacenar en el hígado y/o ser ensamblados y transportados por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; por sus siglas en inglés) en la circulación sanguínea hasta llegar al tejido adiposo propiciando obesidad⁽⁷⁹⁾.

Recientemente se ha reportado que además de la dieta, la obesidad está asociada a ciertos perfiles de microbiota intestinal. Una abundancia relativa alta de Firmicutes y baja de Bacteroidetes se asocia a obesidad tanto en adultos⁽⁴⁸⁾ como en niños⁽⁴⁹⁾. De igual manera, en pacientes adultos con obesidad se ha observado

una mayor concentración de *Lactobacillus*, en comparación a los pacientes anoréxicos ($p=0.03$) y controles normopeso ($p=0.01$)⁽⁸⁰⁾. Particularmente, ciertas cepas de *L. reuteri* se han relacionado con ganancia de peso corporal en aves que recibieron *L. reuteri*⁽⁸¹⁾, lechones^(82, 83) y en ratones⁽⁸⁴⁾. En humanos, la asociación de *L. reuteri* con obesidad sólo se ha estudiado en adultos franceses y una elevada abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con obesidad (OR= 1.79; IC 95% 1.03–3.10; $p=0.04$)⁽⁷⁾, y correlacionó positivamente con el IMC ($r= 0.85$, IC 95% 0.12–0.58; $p= 0.02$)⁽⁵⁸⁾. El mecanismo propuesto para explicar la asociación positiva entre *L. reuteri* y los indicadores de adiposidad; se basa en su característica heterofermentativa que le permite degradar los carbohidratos no digeribles de la dieta y generar ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el acetato; el cual, es especialmente utilizado como sustrato para la lipogénesis^(51, 85). El acetato una vez que es absorbido en el colon y transportado al hígado, es fuente de acetil-CoA mediante la acetil CoA sintasa; estimulando de esta forma una cascada que conduce a un mayor almacenamiento de grasa⁽⁸⁶⁾.

En relación a la asociación observada, de estos dos factores con los diferentes parámetros bioquímicos y el hecho de que esta asociación esté mediada por los indicadores de adiposidad, es biológicamente plausible; debido a que una vez que hay hiperplasia e hipertrofia en el tejido adiposo por la acumulación excesiva de triglicéridos, se producen citocinas pro-inflamatorias y se incrementa la respuesta inmune. Ambos procesos están implicados con el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina asociada a las dislipidemias^(11, 13). Sin embargo, las evidencias que existen en relación con el consumo de fructosa, son controversiales. En dos estudios con adultos sanos, el consumo elevado de fructosa incrementó las concentraciones séricas de triglicéridos en ayuno (100 ± 18.58 vs 55.75 ± 6.19 mg/dl, $p<0.05$)⁽⁸⁷⁾ y postprandiales (172 ± 29 vs 140 ± 28 mg/dL, $p= 0.002$)⁽⁸⁸⁾, sin alteraciones en el peso y la composición corporal. Sin embargo, en niños y adolescentes latinos y afroamericanos, la restricción de fructosa por un periodo de 9 días, redujo significativamente las concentraciones séricas de triglicéridos (123.89 ± 79.65 a 88.5 ± 44.25 mg/dl, $p=0.02$), LDL (92.80 ± 23.20 a 81.20 ± 23.20 mg/dl, $p<0.001$), glucosa (97.3 ± 9.01 a 91.89 ± 7.21 mg/dl, $p<0.001$) e insulina

(28.16 ± 16.58 a 19.52 ± 9.07 , UI/ml $p < 0.001$) y los autores concluyen que probablemente esto se debe a la disminución de peso que presentaron estos pacientes ⁽⁸⁹⁾.

En ratas el subgrupo de *L. reuteri* Lr263 ha demostrado que es capaz de suprimir genes lipogénicos como el que codifica para la sintasa de ácidos grasos (FAS) ⁽⁹⁰⁾. Esta sería una potencial explicación para la asociación observada para el *L. reuteri* sobre los triglicéridos y que podría ser motivo de un siguiente estudio en el que se detallan los subgrupos de *L. reuteri*.

Para la correcta interpretación de nuestros resultados, se deben tomar en cuenta algunas consideraciones metodológicas. Debido a que se trata de un estudio transversal no se puede establecer una adecuada relación temporal entre las asociaciones encontradas. La posibilidad que incurriéramos en sesgo de selección lo descartamos al evaluar el consumo de fructuosa entre el grupo de niños que no fueron incluidos y son parte de la población del estudio original, observando que no hubo diferencias significativas entre los grupos a comparar (3.93% vs 3.90%, $p=0.86$) (Tabla suplementaria 2).

La información dietética del consumo de fructosa obtenida a partir del CFCA potencialmente puede tener un error de medición. Sin embargo, debido a que los participantes y los entrevistadores estuvieron cegados a la hipótesis específica de estudio, este sería no diferencial, subestimando nuestros resultados. Además del cegamiento del personal y los participantes, otra fortaleza del estudio es que el personal que entrevistó y midió a los participantes y analizó las muestras de heces y sangre de los mismos, fue capacitado y sus procedimientos de medición se estandarizaron, por lo cual también descartamos error de medición diferencial en los datos antropométricos, bioquímicos y de abundancia relativa de *L. reuteri*. Aunado a ello, se utilizó el método de PCR cuantitativo (qPCR) para analizar la abundancia relativa de *L. reuteri*, el cual es considerado como el método de referencia siguiendo los estándares internacionales.

Al ajustar por actividad física en tiempo libre como un proxy de actividad física total, cabe la posibilidad de tener confusión residual lo que podría estar subestimando nuestros resultados.

Conclusión

Nuestros resultados sugieren una asociación no benéfica entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa con el riesgo de presentar obesidad y alteraciones metabólicas. Debido a que la fructosa proveniente de la fruta entera probablemente, no tenga los mismos efectos que la proveniente de alimentos industrializados, ya que estas contiene además fibra, minerales, vitaminas con efectos antioxidantes así como fitoquímicos ⁽⁹¹⁾, recomendamos estudios prospectivos que evalúen el consumo de fructosa aportado por diferentes alimentos en población infantil. Así mismo, consideramos la importancia de realizar estudios que evalúen la asociación de *L. reuteri* a nivel de cepas lo que nos permitirá tener una mejor comprensión de los procesos fisiopatológicos involucrados.

Aspectos éticos y de bioseguridad de la investigación

El proyecto original (No. 1129) que lleva por nombre “Evaluación de la interacción entre el consumo de macronutrientes y el perfil de la microbiota del colon distal y su asociación con obesidad infantil” fue aprobado por el comité de Ética y bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública (aprobación 1294). Se obtuvo de los padres y niños participantes el consentimiento y asentimiento informado, mediante firma o huella (padres) y huella (niños), para de ésta manera proceder a la aplicación de cuestionarios y obtención de los productos biológicos.

También se obtuvo la autorización de los investigadores encargados para utilizar la base de datos, así como el banco de muestras biológicas para su procesamiento.

Anexos

Anexo 1. Artículo publicable

Asociación entre *Lactobacillus reuteri* y consumo de fructuosa con obesidad infantil, en niños residentes de la Ciudad de México

Eira E. Huerta-Ávila¹, Ivonne Ramírez-Silva², Cinthya E. Díaz-Benítez¹, Luisa E. Torres-Sánchez³, Ana I. Burguete-García¹

¹Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, ² Centro de Investigación en Nutrición y Salud y ³Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México

Autor correspondiente

Ana I. Burguete-García, MD, PhD.

Departamento de Epidemiología Genética, Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México. Teléfono: 01 777 329 3000 ext. 2886. E-mail: aburguete@insp.com

Resumen

Antecedentes: México tiene una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad infantil de 33.2%. En adultos, el consumo dietético de fructosa y la abundancia relativa de *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) en la microbiota intestinal, se asocian con incrementos en el peso corporal. Sin embargo, en niños esta asociación ha sido poco explorada. Objetivo: Evaluar la asociación entre el consumo de fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri* con cambio en el índice de masa corporal en niños residentes de la Ciudad de México. Metodología: Estudio transversal con 1087 niños de 6 a 12 años, residentes de la Ciudad de México; a quienes se les calculó el índice de masa corporal (IMC), se les midió la circunferencia de cintura (CC) y perfil bioquímico al momento de la entrevista. A través de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos semi-cuantitativo, que tomó como referencia el mes previo a la entrevista, se calculó el consumo de fructosa de cada individuo. La abundancia relativa de *L. reuteri* se cuantificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) del DNA de las heces. La asociación de *L. reuteri* y consumo de fructosa con IMC, CC y alteraciones metabólicas se evaluó mediante modelos de regresión lineal y análisis de senderos. Resultados: Una mayor contribución energética de fructosa y una mayor abundancia relativa de *L. reuteri* se asociaron positivamente con el IMC ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.40$, IC 95% 0.06; 0.74, $p=0.02$ y $\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.64$, IC 95% 0.30; 0.98, $p<0.001$, respectivamente) y con la CC ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.04$, IC 95% 0.01; 0.08, $p=0.01$ y $\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.06$; 95% IC 0.02; 0.67, $p=0.002$, respectivamente). Sin embargo, no se observó una interacción entre ambos sobre los indicadores de adiposidad. Así mismo se observó una asociación positiva mediada por los indicadores de adiposidad, entre *L. reuteri* y fructosa con glucosa, triglicéridos, insulina, índice HOMA y el LDL ($p<0.01$); mientras que la asociación con el HDL, fue negativa. Conclusión: Similar a lo que se ha observado en adultos, la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa incrementan los indicadores de adiposidad en los niños y a través de ellos incrementan las alteraciones metabólicas en niños residentes de la

Ciudad de México. Debido a que es el primer estudio que evalúa en forma conjunta el consumo de fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri* en niños, es necesario llevar a cabo estudios prospectivos que permitan confirmar esta asociación.

Palabras clave: Fructosa, *L. reuteri*, obesidad infantil y alteraciones metabólicas

Introducción

La obesidad infantil es uno de los principales problemas de Salud Pública. Los niños con obesidad tienen mayor probabilidad de seguir siendo obesos en la edad adulta ⁽³⁾ y desarrollar tempranamente, enfermedades crónicas como diabetes y/o enfermedades cardiovasculares ⁽¹⁾. Los factores de riesgo asociados con la obesidad infantil incluyen la historia familiar de obesidad y enfermedades metabólicas, inactividad física, hábitos dietéticos inadecuados ⁽¹⁴⁾ y más recientemente, la prevalencia de ciertos perfiles de microbiota intestinal ⁽⁴⁹⁾.

En la actualidad, debido a la sustitución en alimentos industrializados de sacarosa por fructosa para endulzar, la población infantil tiene mayor acceso al consumo de éste monosacárido especialmente a través de alimentos como golosinas, jugos y refrescos ⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. Las dietas con alto consumo de fructosa se relacionan con aumento de los triglicéridos así como de peso corporal en adultos ^(27, 29). En niños solo se ha reportado que el alto consumo de fructosa presente en bebidas azucaradas se asocia con ganancia de peso y grasa corporal ^(32, 33).

Por otro lado, aunque la microbiota intestinal participa en diferentes funciones metabólicas e inmunológicas necesarias para el organismo, su alteración (disbiosis) puede generar diversas patologías, entre ellas la obesidad ⁽⁹²⁾. Uno de los componentes de la microbiota es *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*). Esta especie bacteriana es capaz de producir moléculas antimicrobianas como la reutericina ⁽⁹³⁾ y es uno de los probióticos más utilizados en animales y humanos para tratar problemas gastrointestinales. Además se caracteriza por aumentar la síntesis de moléculas intermedias en la producción de triglicéridos, así como de carecer de enzimas para metabolizar monosacáridos como la fructosa, permitiendo que esta molécula ingrese en mayor proporción al torrente sanguíneo del hospedero ^(50, 52). Esto es congruente con el hallazgo de que un incremento en la abundancia relativa de *L. reuteri* en el intestino se asocia con mayor probabilidad de presentar obesidad en adultos ⁽⁷⁾.

México se encuentra entre los 10 primeros lugares de obesidad infantil, de acuerdo a los datos reportados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ⁽⁹⁴⁾. El papel de la microbiota y la obesidad infantil ha sido poco estudiado y hasta donde sabemos ningún estudio ha evaluado la asociación tanto independiente como conjunta entre el consumo de fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri* con el aumento en el índice de masa corporal en población infantil. Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar dicha asociación en niños residentes de la Ciudad de México.

Métodos

Diseño y población de estudio

El presente trabajo se deriva de un estudio transversal realizado entre junio del 2011 y julio del 2013, cuyo objetivo fue evaluar la interacción entre el consumo de macronutrientes y el perfil de la microbiota del colon distal y su asociación con obesidad infantil. Se identificaron a 1482 niños entre 6-14 años edad, no relacionados entre sí, residentes en los cuatro puntos cardinales de la Ciudad de México y que al momento de la entrevista no contaban con diagnóstico de diabetes, hipertensión arterial, enfermedad cardiovascular, diagnóstico de enfermedad infecciosa o desórdenes gastrointestinales, ni antecedentes de haber ingerido antibióticos durante los dos meses previos al estudio. A cada niño y a sus padres se les explicó en qué consistiría la participación en el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de uno o ambos padres, así como el asentimiento de los niños. El estudio, contó con la aprobación de la Comisión de ética, bioseguridad e investigación del Instituto Nacional de Salud Pública de México (No. 1294).

El estudio incluyó una entrevista estructurada, mediciones antropométricas y se obtuvo una muestra de sangre para perfil bioquímico y una muestra de heces para determinar el perfil de microbiota. Para este trabajo (Figura 1), sólo se incluyeron 1087 niños de entre 6 y 12 años, los cuales contaban con resultado de DNA en muestras fecales.

Recolección de datos y análisis de laboratorio

Personal debidamente entrenado entrevistó a alguno de los padres o tutores, en conjunto con los niños. El cuestionario incluyó información acerca de: edad, sexo, área de residencia de los niños, dieta habitual y actividad física del niño; también se preguntó la edad y escolaridad de los padres, así como antecedentes heredofamiliares de primer grado de obesidad y diabetes. La edad en años fue analizada de forma continua. El sexo fue analizado de manera dicotómica así como los antecedentes familiares de obesidad y diabetes.

Evaluación de actividad física. El cuestionario de actividad física que se usó fue adaptado y validado para esta población ⁽⁶⁷⁾ e incluyó información acerca de la actividad física realizada de forma habitual durante el último mes antes de la entrevista. Se preguntó sobre actividades durante su estancia en la escuela y en el tiempo libre, como: jugar futbol soccer, ciclismo, entre otras; así mismo, se indagó sobre el tiempo dedicado a actividades sedentarias: ver la televisión o estar frente a la computadora. El tipo y la duración se transformaron en equivalentes metabólicos (MET/mes) mediante el software “Food Processor Nutrition and Fitness Analysis”, versión 10,12.0; ESHA Research Inc., Oregon, EE.UU. ⁽⁶⁸⁾. Esta variable fue utilizada de manera continua.

Mediciones antropométricas. Las mediciones antropométricas se realizaron por personal capacitado, previamente estandarizado por el método Habicht ⁽⁶⁴⁾. Se utilizaron básculas con una precisión de 0.1 kg, así como estadímetro y cintas métricas, ambos con precisión de 1mm (todos de la marca comercial SECA). La medición de peso (kg), talla (cm), circunferencia de cintura (CC, cm) y circunferencia de cadera (cm) se realizó con la menor cantidad de ropa posible y sin zapatos, siguiendo el procedimiento descrito por Lohman ⁽⁶⁵⁾. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como kg/m^2 y utilizando el Macro creado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se obtuvo el puntaje Z. La clasificación de los niños en peso normal, sobrepeso y obesidad se realizó con base a los puntos de corte sobre el puntaje Z de IMC para edad y sexo; Debido a que consideramos que el sobrepeso y obesidad forman parte de un mismo proceso,

para fines de describir la población de estudio clasificamos a los niños como: Normal de -2 a 1 desviaciones estándar (DE), y Sobrepeso-Obesidad > 1 DE (20). Para el resto del análisis, el IMC al igual que la circunferencia de cintura se analizaron de manera continua.

Análisis bioquímicos. Las concentraciones de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y triglicéridos se determinaron en suero posterior a un ayuno de 12 horas. La cuantificación se realizó con el equipo Clinical Chemistry System ILAB 300 plus®. Para la medición de insulina, se utilizó el método por quimioluminiscencia con el equipo INMULITE®. El índice de resistencia a la insulina (HOMA; por sus siglas en inglés) se calculó mediante la fórmula propuesta por Hosker y Matthews ⁽⁶⁶⁾. Todas estas variables fueron analizadas de forma continua.

Evaluación dietética. La información dietética de los niños durante el mes previo a la entrevista, se obtuvo mediante un Cuestionario semi-cuantitativo de Frecuencia de Consumo de 107 Alimentos (CFCA), que fue elaborado para el estudio original siguiendo la metodología descrita por Willet W *et al* ⁽⁶⁹⁾. Las opciones de consumo variaron entre nunca, hasta 6 o más veces al día y con base en el consumo reportado y la porción preestablecida, se obtuvo la frecuencia de consumo de cada alimento en gramos por día. El consumo de energía, macronutrientes y fructosa consumidos por cada niño se calculó usando la base de datos del valor nutritivo de los alimentos desarrollada por el Instituto Nacional de Salud Pública de México ⁽⁷⁰⁾. Debido a que no contamos con información acerca del contenido de fructosa de los alimentos mexicanos ⁽²²⁾, a la base anteriormente mencionada se le adicionó el contenido de fructosa descrito en la plataforma del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) ⁽⁷¹⁾.

El consumo de fructosa fue analizado utilizando el método de ajuste de energía de densidad de nutrientes ⁽⁷²⁾, el cual se obtuvo dividiendo las calorías provenientes del consumo de fructosa entre el consumo energético total y multiplicado por 100. Este porcentaje de contribución de la fructosa se categorizó en bajo, medio y alto

de acuerdo a la distribución en terciles de la población de estudio. Esta variable fue analizada tanto de forma continua como categórica.

Cuantificación de la abundancia relativa de L. reuteri. La extracción de DNA a partir de 200 mg de heces, se llevó a cabo mediante el kit QIAmp® DNA Stool (Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia). Se determinó la concentración y pureza del DNA (260/280) en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 LITE (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y se almacenó a -20°C. La determinación de la abundancia relativa de *L. reuteri* se realizó por qPCR, con los oligonucleótidos previamente reportados ⁽⁵⁷⁾, utilizando como gen de referencia los oligonucleótidos universales ⁽⁷³⁾. Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 10µL, el cual contiene 1 µL de DNA 5 ng, 5 µL de 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA), 1 µL de cada oligonucleótido a 5pmol/µL y 2 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación: 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 minuto a 56°C, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C para *L. reuteri* y para Universal 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 minuto a 58°C, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La amplificación específica del gen de interés se confirmó mediante curvas de disociación, corroborando que la fluorescencia respecto del tiempo (dF/dT) presentara un solo pico. Cada reacción se realizó por duplicado para disminuir el rango de error en la amplificación, además se colocó un control negativo en cada placa. Las unidades de abundancia relativa (AR) de *L. reuteri* se obtuvieron mediante el método comparativo de $2^{-\Delta Ct}$ (Ct de *L. reuteri* - Ct de universal) ⁽⁷⁴⁾. Dicha variable fue analizada tanto de forma continua y categórica, tomando como puntos de corte su distribución en terciles.

Análisis estadístico

Las variables seleccionadas se compararon de acuerdo a la condición de peso normal y sobrepeso/obesidad. Debido a que las variables continuas no se distribuyeron normalmente, se usó la prueba no paramétrica de U de Mann

Whitney. Para la comparación de las variables categóricas se usó la prueba de Chi-cuadrada (χ^2).

También se evaluó la distribución de estas mismas variables de acuerdo a los terciles de contribución energética de fructosa y terciles de abundancia relativa de *L. reuteri*, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para las variables continuas y nuevamente la prueba χ^2 para las variables categóricas.

La asociación entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el porcentaje de contribución energética de fructosa sobre el puntaje Z de IMC y la circunferencia de cintura, se estimó mediante modelos independientes de regresión lineal múltiple. La prueba de tendencia para las variables categóricas se realizó incluyendo al modelo la variable categórica en su forma ordinal. Para evaluar la asociación conjunta de ambas variables sobre el IMC y la CC, en cada modelo independiente se incluyó un término de interacción y se consideró como significativo una $p < 0.10$. En ambos modelos se evaluaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad y no colinealidad, mediante las pruebas estadísticas de Shapiro Wilk, Breusch-Pagan y Cook-Weisberg y el factor de inflación de la varianza y gráficos de estimación de la densidad de Kernel, gráficos de residuos/valores ajustados y de residuos/valores predichos. Debido a que el modelo de circunferencia de cintura no cumplía con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, dicha variable se transformó al logaritmo natural. Los modelos finales fueron ajustados por edad, sexo, antecedentes heredofamiliares de obesidad y actividad física en tiempo libre. El antecedente heredofamiliar de diabetes fue otra covariable de ajuste que se examinó, sin presentar alteraciones en el estimador por lo cual fue retirada. Las covariables de ajuste fueron seleccionadas con base a su relevancia biológica y a que estuvieran relacionados con las variables de exposición y a las variables de respuesta pero que no formarán parte de la cadena causal.

Finalmente, con la intención de evaluar la asociación directa, indirecta y total entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el porcentaje de la contribución de fructosa

con el IMC, circunferencia de cintura y parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, HDL, LDL, insulina e Índice HOMA) se realizó un análisis de senderos. Debido a que los marcadores bioquímicos pueden ser una consecuencia de la adiposidad, en el análisis de senderos se consideraron a el IMC y CC como mediadores de la asociación entre el consumo fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri* sobre los niveles de glucosa, triglicéridos, HDL, LDL, insulina e índice HOMA. El colesterol total no fue incluido en el análisis de senderos, porque éste no se asoció significativamente con el *L. reuteri* ni con el consumo de fructuosa. Se consideró como significativo una $p < 0.05$.

Todos los análisis se realizaron utilizando la versión 13.0 del paquete estadístico Stata SE (College Station, TX).

Resultados

La prevalencia de sobrepeso u obesidad en estos niños fue de 53.08%. En la Tabla 1 se muestran las características generales, bioquímicas y dietéticas, del total de los niños y de acuerdo a la condición de normopeso y sobrepeso/obesidad. Comparado con los niños normopeso, los niños con sobrepeso u obesidad, se caracterizaron por tener mayor edad (9.63 vs. 9.1 años, $p < 0.001$), ser más hombres que mujeres (58.58 vs 41.42, $p = 0.02$), tener más antecedentes heredofamiliares de obesidad (61.35 vs 47.74%, $p < 0.001$) y diabetes tipo 2 (13.52 vs 9.63, $p = 0.05$), así como concentraciones más elevadas de glucosa (82 vs 81 mg/dl, $p = 0.009$), triglicéridos (98 vs 68 mg/dl, $p < 0.001$), colesterol total (160.5 vs 153mg/dl, $p = 0.001$), LDL (107 vs 96 mg/dl, $p < 0.001$), insulina (8.62 vs 4.35 UI/ml, $p < 0.001$) e índice HOMA (1.73 vs 0.84, $p < 0.001$) y más bajas de HDL (47 vs 53 mg/dl, $p < 0.001$).

El principal aporte de fructosa provino del consumo de bebidas azucaradas industrializadas y caseras; seguido de frutas enteras, bebidas lácteas endulzadas, dulces, chocolates y bollería (datos no mostrados en tablas). El mayor consumo de fructosa (59.67 vs 40.33%, $p = 0.009$) y la alta abundancia relativa de *L. reuteri*

se observó en los niños con sobrepeso/obesidad (61.88 vs 38.12%, $p < 0.001$) (Tabla 2).

Los niños con mayor contribución energética de fructosa tuvieron un menor consumo de energía con respecto al resto de los niños (1948.79 vs 2218.09 kcal/día, $p < 0.001$) (Tabla 3). Por otro lado, los niños con una mayor abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con mayor concentración de insulina (6.63 vs 5.63 UI/ml, $p = 0.02$) e índice HOMA (1.39 vs. 1.11, $p = 0.01$) (Tabla 4).

Después de ajustar por edad, sexo, antecedentes familiares de obesidad y actividad física en tiempo libre, se observó que los niños con mayor contribución energética de fructosa ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.40$; IC 95% 0.06; 0.74, $p = 0.02$) y mayor abundancia relativa de *L. reuteri* ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.64$; IC 95% 0.30; 0.98, $p < 0.001$), tuvieron en promedio un mayor puntaje Z de IMC. De forma similar, los niños con mayor contribución energética de fructosa tuvieron una CC 4% mayor que los niños que reportaron un menor consumo de fructosa ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.04$; IC 95% 0.01; 0.08, $p_{\text{tendencia}} = 0.01$). Esta tendencia también se observó con respecto a los terciles de abundancia relativa de *L. reuteri*; en donde los niños con mayor abundancia relativa de *L. reuteri*, presentaron una CC 6% ($\beta_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.06$; IC 95% 0.02; 0.67, $p = 0.002$) mayor que la observada en los niños con abundancia relativa baja (Tabla 5). No se observó una interacción significativa entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa sobre el puntaje Z de IMC ($p_{\text{de interacción}} = 0.44$) y la CC ($p_{\text{de interacción}} = 0.70$) (Tabla 5).

En las figuras 2, 3 y en la tabla suplementaria 1, se muestran las asociaciones directas e indirectas del consumo de fructosa y la abundancia relativa de *L. reuteri*, con los indicadores de adiposidad y variables bioquímicas estimadas a través del modelo de senderos. De acuerdo con este tipo de modelaje, un incremento porcentual en el consumo de fructosa solo se asoció de forma directa con un aumento significativo en el puntaje Z de IMC ($\beta = 0.07$; 95% IC 0.01, 0.12, $p = 0.008$) y de la CC ($\beta = 0.65$; 95% IC 0.27, 1.04, $p = 0.001$). Las asociaciones con los parámetros bioquímicos, fueron de tipo indirecto y positivos, a través de los

indicadores de adiposidad; excepto para el HDL, el cual disminuyó de manera significativa conforme aumentó porcentualmente la contribución energética de fructuosa ($\beta = -0.28$; 95% CI $-0.46, -0.09$, $p=0.003$) (tabla suplementaria 1; figuras 2 y 3).

Al igual que la fructuosa, un incremento en la abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con un incremento directo en el puntaje Z de IMC ($\beta = 0.16$; 95% IC $0.09, 0.24$, $p<0.001$) y en la CC ($\beta = 1.13$; 95% IC $0.58, 1.68$, $p<0.001$). De igual forma se asoció indirectamente y en el mismo sentido con los parámetros bioquímicos; excepto con las concentraciones séricas de triglicéridos, donde la asociación fue directa e indirecta y en direcciones opuestas. De forma directa, un incremento en la abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con una disminución en las concentraciones de triglicéridos ($\beta = -3.24$; 95% CI $-2.18, -1.01$, $p=0.001$); mientras que de manera indirecta la asociación fue positiva ($\beta = 2.50$; 95% IC $1.56, 3.41$, $p<0.001$).

Discusión

Estos resultados sugieren que la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa son dos factores independientes relacionados con la obesidad y sus alteraciones metabólicas en población infantil. Una mayor abundancia relativa de *L. reuteri* y de contribución energética de fructosa se asociaron directa y positivamente con los indicadores de adiposidad; mientras que con la mayoría de los parámetros bioquímicos la asociación fue positiva y mediada por su asociación con los indicadores de adiposidad. El único parámetro que se asoció con ambos factores y de forma negativa fue el HDL. En contraste, la asociación de *L. reuteri* con las concentraciones de triglicéridos tienen un comportamiento directo e indirecto y en sentidos inversos.

El consumo de fructosa y su asociación con obesidad se ha estudiado considerablemente en adultos. En concordancia con nuestros resultados,

Stanhope KL *et al* ⁽⁷⁵⁾, en un ensayo clínico realizado en adultos estadounidense entre 40-72 años, encontraron que en comparación con los sujetos que consumieron glucosa, los que consumieron fructosa durante 8 semanas presentaron un aumento del 1.4% en el peso corporal ($p < 0.001$), y de 14.5% en el área intra-abdominal medida por densitometría ($p < 0.01$) ⁽⁷⁵⁾. En contraste, en un estudio realizado por Lê KA *et al* ⁽⁷⁶⁾ en hombres suizos con una edad promedio de 24.7 ± 1.3 , no se detectó un cambio estadísticamente significativo ($p > 0.05$) en el peso corporal ni en la masa grasa tras 4 semanas de intervención con fructosa; lo cual, puede ser debido al corto tiempo de exposición de dicho monosacárido y a un tamaño de muestra pequeño ($n=7$) ⁽⁷⁶⁾. Así mismo, en un metaanálisis que incluyó 41 ensayos clínicos, el consumo de fructuosa entre sujetos que reportaron dietas hipercalóricas, se asoció con un incremento significativo de 0.53 kg de peso corporal ⁽²⁷⁾. En los sujetos con dieta normocalórica no se observó ningún efecto pero esto puede ser debido a que los estudios en su mayoría se caracterizaron por tener muestras pequeñas (<15 participantes), periodo de intervención corto (<12 semanas) y al menos el 60% de los estudios fue de baja calidad de acuerdo al índice de calidad metodológica de Heyland.

Diversos estudios preclínicos han descrito el mecanismo por el cual la fructosa se relaciona con la obesidad. La fructosa se absorbe por difusión pasiva a nivel de duodeno/yeyuno hasta llegar al torrente sanguíneo (sin estimular la secreción de la insulina, bloqueando el mecanismo de saciedad). A través de la vena porta la fructuosa pasa al hígado, en donde es metabolizada por la fructoquinasa (vía alterna a la glicolítica), y en etapas posteriores genera glicelaldehído y dihidroxiacetona fosfato ⁽⁷⁸⁾. De esta manera, la fructosa sirve como una fuente no regulada por ATP y citrato tanto de glicerol-3-fosfato como de acetil-CoA para la producción de triglicéridos hepáticos; los cuales, se pueden almacenar en el hígado y/o ser ensamblados y transportados por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; por sus siglas en inglés) en la circulación sanguínea hasta llegar al tejido adiposo propiciando obesidad ⁽⁷⁹⁾.

Recientemente se ha reportado que además de la dieta, la obesidad está asociada a ciertos perfiles de microbiota intestinal. Una abundancia relativa alta de Firmicutes y baja de Bacteroidetes se asocia a obesidad tanto en adultos⁽⁴⁸⁾ como en niños⁽⁴⁹⁾. De igual manera, en pacientes adultos con obesidad se ha observado una mayor concentración de *Lactobacillus*, en comparación a los pacientes anoréxicos ($p=0.03$) y controles normopeso ($p=0.01$)⁽⁸⁰⁾. Particularmente, ciertas cepas de *L. reuteri* se han relacionado con ganancia de peso corporal en aves que recibieron *L. reuteri*⁽⁸¹⁾, lechones^(82, 83) y en ratones⁽⁸⁴⁾. En humanos, la asociación de *L. reuteri* con obesidad sólo se ha estudiado en adultos franceses y una elevada abundancia relativa de *L. reuteri* se asoció con obesidad (OR= 1.79; IC 95% 1.03–3.10; $p=0.04$)⁽⁷⁾, y correlacionó positivamente con el IMC ($r= 0.85$, IC 95% 0.12–0.58; $p= 0.02$)⁽⁵⁸⁾. El mecanismo propuesto para explicar la asociación positiva entre *L. reuteri* y los indicadores de adiposidad; se basa en su característica heterofermentativa que le permite degradar los carbohidratos no digeribles de la dieta y generar ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el acetato; el cual, es especialmente utilizado como sustrato para la lipogénesis^(51, 85). El acetato una vez que es absorbido en el colon y transportado al hígado, es fuente de acetil-CoA mediante la acetil CoA sintasa; estimulando de esta forma una cascada que conduce a un mayor almacenamiento de grasa⁽⁸⁶⁾.

En relación a la asociación observada, de estos dos factores con los diferentes parámetros bioquímicos y el hecho de que esta asociación esté mediada por los indicadores de adiposidad, es biológicamente plausible; debido a que una vez que hay hiperplasia e hipertrofia en el tejido adiposo por la acumulación excesiva de triglicéridos, se producen citocinas pro-inflamatorias y se incrementa la respuesta inmune. Ambos procesos están implicados con el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina asociada a las dislipidemias^(11, 13). Sin embargo, las evidencias que existen en relación con el consumo de fructosa, son controversiales. En dos estudios con adultos sanos, el consumo elevado de fructosa incrementó las concentraciones séricas de triglicéridos en ayuno (100 ± 18.58 vs 55.75 ± 6.19 mg/dl, $p<0.05$)⁽⁸⁷⁾ y postprandiales (172 ± 29 vs 140 ± 28 mg/dL, $p= 0.002$)⁽⁸⁸⁾, sin alteraciones en el peso y la composición corporal. Sin embargo, en niños y

adolescentes latinos y afroamericanos, la restricción de fructosa por un periodo de 9 días, redujo significativamente las concentraciones séricas de triglicéridos (123.89 ± 79.65 a 88.5 ± 44.25 mg/dl, $p=0.02$), LDL (92.80 ± 23.20 a 81.20 ± 23.20 mg/dl, $p<0.001$), glucosa (97.3 ± 9.01 a 91.89 ± 7.21 mg/dl, $p<0.001$) e insulina (28.16 ± 16.58 a 19.52 ± 9.07 , UI/ml $p<0.001$) y los autores concluyen que probablemente esto se debe a la disminución de peso que presentaron estos pacientes ⁽⁸⁹⁾.

En ratas el subgrupo de *L. reuteri* Lr263 ha demostrado que es capaz de suprimir genes lipogénicos como el que codifica para la sintasa de ácidos grasos (FAS) ⁽⁹⁰⁾. Esta sería una potencial explicación para la asociación observada para el *L. reuteri* sobre los triglicéridos y que podría ser motivo de un siguiente estudio en el que se detallen los subgrupos de *L. reuteri*.

Para la correcta interpretación de nuestros resultados, se deben tomar en cuenta algunas consideraciones metodológicas. Debido a que se trata de un estudio transversal no se puede establecer una adecuada relación temporal entre las asociaciones encontradas. La posibilidad que incurriéramos en sesgo de selección lo descartamos al evaluar el consumo de fructuosa entre el grupo de niños que no fueron incluidos y son parte de la población del estudio original, observando que no hubo diferencias significativas entre los grupos a comparar (3.93% vs 3.90%, $p=0.86$) (Tabla suplementaria 2).

La información dietética del consumo de fructosa obtenida a partir del CFCA potencialmente puede tener un error de medición. Sin embargo, debido a que los participantes y los entrevistadores estuvieron cegados a la hipótesis específica de estudio, este sería no diferencial, subestimando nuestros resultados. Además del cegamiento del personal y los participantes, otra fortaleza del estudio es que el personal que entrevistó y midió a los participantes y analizó las muestras de heces y sangre de los mismos, fue capacitado y sus procedimientos de medición se estandarizaron, por lo cual también descartamos error de medición diferencial en los datos antropométricos, bioquímicos y de abundancia relativa de *L. reuteri*.

Aunado a ello, se utilizó el método de PCR cuantitativo (qPCR) para analizar la abundancia relativa de *L. reuteri*, el cual es considerado como el método de referencia siguiendo los estándares internacionales.

Al ajustar por actividad física en tiempo libre como un proxy de actividad física total, cabe la posibilidad de tener confusión residual lo que podría estar subestimando nuestros resultados.

Conclusión

Nuestros resultados sugieren una asociación no benéfica entre la abundancia relativa de *L. reuteri* y el consumo de fructosa con el riesgo de presentar obesidad y alteraciones metabólicas. Debido a que la fructosa proveniente de la fruta entera probablemente, no tenga los mismos efectos que la proveniente de alimentos industrializados, ya que estas contiene además fibra, minerales, vitaminas con efectos antioxidantes así como fitoquímicos ⁽⁹¹⁾, recomendamos estudios prospectivos que evalúen el consumo de fructosa aportado por diferentes alimentos en población infantil. Así mismo, consideramos la importancia de realizar estudios que evalúen la asociación de *L. reuteri* a nivel de cepas lo que nos permitirá tener una mejor comprensión de los procesos fisiopatológicos involucrados.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Agradecemos a los niños de la Ciudad de México que participaron en este estudio así como al equipo de la Unidad de Bioquímica-IMSS y a diferentes organizaciones por el financiamiento recibido para llevarlo a cabo (SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 2012 -180808, CONACYT SALUD-2005-C02-14412; Proyectos Estratégicos IMSS 2004-3601-0020; Fundación IMSS, A.C).

Anexo 2. Tablas

TABLA 1 Características general por estrato de Índice de Masa Corporal

Características	Todos n=1087	Estrato de Índice de Masa Corporal		Valor p*
		Peso normal n=510 (46.90%)	Sobrepeso/obesidad n=577 (53.10%)	
Edad (años)				
Mediana	9.80	9.09	9.63	<0.001
P₁₀-P₉₀	6.91-11.91	6.83-11.64	7.30-11.95	
Niños, n (%)	601 (55.29)	263(51.57)	338 (58.58)	0.02
Historia familiar**				
Obesidad, n (%)	597 (54.97)	243 (47.74)	354 (61.35)	<0.001
Diabetes, n (%)	127 (11.69)	49 (9.63)	78 (13.52)	0.05
Actividad física (METs/mes)				
Mediana	337.5	344.37	336.25	0.35
P₁₀-P₉₀	31.25-997.5	31.25-975	12.5-1042.5	
Parámetros bioquímicos				
Glucosa (mg/dl)				
Mediana	82	81	82	0.009
P₁₀-P₉₀	71-94	69-94	72-95	
Triglicéridos (mg/dl)				
Mediana	81	68	98	<0.001
P₁₀-P₉₀	48-154	44-111	55-181	
Colesterol total (mg/dl)				
Mediana	157	153	160.5	0.001
P₁₀-P₉₀	118-200	117-196	120-203	
Colesterol HDL (mg/dl)				
Mediana	50	53	47	<0.001
P₁₀-P₉₀	35-68	41-71	33-64	
Colesterol LDL (mg/dl)				
Mediana	101	96	107	<0.001
P₁₀-P₉₀	71-138	71-129	77-142	
Insulina (UI/ml)				
Mediana	6.01	4.35	8.62	<0.001
P₁₀-P₉₀	0.5-15.41	0.5-9.85	0.61-13	
Índice HOMA				
Mediana	1.19	0.84	1.73	<0.001
P₁₀-P₉₀	0.11-3.20	0.10-2.04	0.13-4.10	
Energía (kcal)				
Mediana	2091	2098	2083	0.48
P₁₀-P₉₀	1308-3158	1309-3079	1308-3249	

*Prueba de U de Mann-Whitney para variables continuas y χ^2 de Pearson para variables categóricas.

** Historia familiar de primer grado; al menos uno de los padres con el antecedente.

TABLA 2 IMC por terciles de fructosa y de *L. reuteri*

Característica	Estratos de IMC		Valor p*
	Peso normal n=510 (46.90%)	Sobrepeso/obesidad n=577 (53.10%)	
Consumo de fructosa			
Bajo	181 (49.86)	182 (50.14)	0.009
Medio	183 (50.55)	179 (49.45)	
Alto	146 (40.33)	216 (59.67)	
<i>L. reuteri</i>			
Bajo	202 (55.65)	161 (44.35)	<0.001
Medio	170 (46.96)	192 (53.04)	
Alto	138 (38.12)	224 (61.88)	

* χ^2 de Pearson

TABLA 3 Características general por terciles de fructosa

Características	Terciles de contribución de fructosa			Valor p^*
	Bajo	Medio	Alto	
Edad (años)				
Mediana	9.37	9.22	9.44	0.55
P ₁₀ -P ₉₀	7.11-11.91	6.97-11.67	6.90-12.14	
Niños, n (%)	200 (55.10)	206 (56.91)	195 (53.87)	0.71
Historia familiar**				
Obesidad, n (%)	203 (55.92)	204 (56.35)	190 (52.63)	0.54
Diabetes, n (%)	37 (10.19)	39 (10.77)	51 (14.13)	0.20
Actividad física (METs/mes)				
Mediana	337.50	328.12	350.62	0.58
P ₁₀ -P ₉₀	31.25-975	25-1006.25	43.75-1032.50	
Parámetros bioquímicos				
Glucosa (mg/dl)				
Mediana	82	82	82	0.32
P ₁₀ -P ₉₀	70-93	71.5-96	72-94	
Triglicéridos (mg/dl)				
Mediana	81	80.5	81	0.99
P ₁₀ -P ₉₀	48-156	48.5-154.5	49-150	
Colesterol total (mg/dl)				
Mediana	157	159.5	157	0.42
P ₁₀ -P ₉₀	120-201	116-204.5	118-196	
Colesterol HDL (mg/dl)				
Mediana	50.5	50	50	0.83
P ₁₀ -P ₉₀	37-68	35-68	36-68	
Colesterol LDL (mg/dl)				
Mediana	101	102	100	0.45
P ₁₀ -P ₉₀	74-129	71-141.5	71-137	
Insulina (UI/ml)				
Mediana	5.70	6	6.50	0.17
P ₁₀ -P ₉₀	0.5-13.69	0.5-13.91	0.5-18.47	
Índice HOMA				
Mediana	1.12	1.18	1.32	0.20
P ₁₀ -P ₉₀	0.10-2.80	0.11-3.04	0.11-3.50	
Energía (kcal)				
Mediana	2071.63	2218.09	1948.79	0.001
P ₁₀ -P ₉₀	1278.63-3129.67	1411.432- 3192.99	1246.362- 3132.46	
<i>L. reuteri</i>***				
Mediana	0.0005	0.0003	0.0008	0.25
P ₁₀ -P ₉₀	0.00003, 0.07	0.00002, 0.01	0.00005, 0.23	

*Prueba de Kruskal Wallis para variables continuas y χ^2 de Pearson para variables categóricas.

**Historia familiar de primer grado; al menos uno de los padres con el antecedente.

***Unidades de abundancia relativa

TABLA 4 Características general por terciles de abundancia de *L. reuteri*

Características	Terciles de <i>L. reuteri</i>			Valor p*
	Bajo	Medio	Alto	
Edad (años)				
Mediana	9.20	9.32	9.74	0.06
P ₁₀ -P ₉₀	6.98-11.83	6.80-11.78	7.15-12.11	
Niños, n (%)	199 (54.82)	194(53.59)	208(57.46)	0.56
Historia familiar**				
Obesidad, n (%)	207 (57.18)	196 (54.14)	194(53.59)	0.57
Diabetes, n (%)	43 (11.88)	47 (12.98)	37 (10.22)	0.50
Actividad física (METs/mes)				
Mediana	373.75	325.625	315.63	0.14
P ₁₀ -P ₉₀	62.5-1037.5	31.25-975	0-978.75	
Parámetros bioquímicos				
Glucosa (mg/dl)				
Mediana	81	82	82	0.27
P ₁₀ -P ₉₀	70-93	70-94	72-95	
Triglicéridos (mg/dl)				
Mediana	79	80	83	0.40
P ₁₀ -P ₉₀	47-149	50-151	48-158	
Colesterol total (mg/dl)				
Mediana	157	159	158	0.84
P ₁₀ -P ₉₀	120-200	118-200.5	118-200	
Colesterol HDL (mg/dl)				
Mediana	51	50	50	0.38
P ₁₀ -P ₉₀	38-68	35-66.5	34-69	
Colesterol LDL (mg/dl)				
Mediana	99.5	102	101	0.58
P ₁₀ -P ₉₀	72-137	72-136	75-140	
Insulina (UI/ml)				
Mediana	5.63	5.45	6.63	0.02
P ₁₀ -P ₉₀	0.5-14.92	0.5-14.38	0.5-17.46	
Índice HOMA				
Mediana	1.11	1.07	1.39	0.01
P ₁₀ -P ₉₀	0.10-2.90	0.11-2.99	0.10-4.56	
Energía (kcal)				
Mediana	2104.20	2006.60	2140.83	0.06
P ₁₀ -P ₉₀	1278.93-3234.85	1308.01-2947.55	1356.02-3222.31	
Consumo de fructosa (%)				
Mediana	3.91	4.02	3.95	0.35
P ₁₀ -P ₉₀	2.64-6.02	2.62-6.11	2.43-5.85	

*Prueba de Kruskal Wallis para variables continuas y χ^2 de Pearson para variables categóricas.

** Historia familiar de primer grado; al menos uno de los padres con el antecedente.

TABLA 5 Asociación entre terciles de abundancia relativa de *L. reuteri* y terciles consumo de fructosa sobre indicadores de adiposidad

Característica	Índice de Masa Corporal			Circunferencia de Cintura		
	Abundancia Relativa de <i>L. reuteri</i>					
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
	β^* (IC 95%)	β^* (IC 95%)	β^* (IC 95%)	β^* IC 95%	β^* IC 95%	β^* IC 95%
Consumo de Fructuosa						
Bajo	Ref	0.32 (-0.02; 0.67)	0.64 (0.30; 0.98)**	Ref	0.03 (-0.01; 0.07)	0.06 (0.02; 0.67)**
Medio	-0.07(-0.42; 0.27)	0.15 (-0.34; 0.65)	-0.19 (-0.68; 0.29)	0.001 (-0.04; 0.04)	0.01 (-0.04; 0.07)	-0.01 (-0.06;0.05)
Alto	0.40 (0.06; 0.74)**	-0.33 (-0.82; 0.15)	-0.18 (-0.67; 0.30)	0.04 (0.01; 0.08)**	-0.03(-0.08;0.02)	-0.01(-0.06;0.04)
<i>p de la interacción</i>			0.44			0.70

* Modelos ajustados por: sexo, edad, historia familiar de obesidad y actividad física en tiempo libre. La referencia tanto para la abundancia relativa de *L. reuteri* y la contribución de fructosa fue el tercil bajo.

**p de tendencia < 0.01

Los resultados en negrilla corresponden a una $p < 0.05$

TABLA SUPLEMENTARIA 1 Estimación de la asociación directa, indirecta y total de la abundancia relativa de *L. reuteri* y contribución de fructosa en los indicadores de adiposidad y bioquímicos

Indicadores de adiposidad	Consumo de fructosa								
	Asociación directa			Asociación indirecta			Asociación total		
	β^*	IC 95%	Valor p	β^*	IC 95%	Valor p	β^*	IC 95%	Valor p
IMC	0.07	0.01,0.12	0.008	NS	-	-	0.07	0.01,0.12	0.008
CC	0.65	0.27,1.04	0.001	NS	-	-	0.65	0.27,1.04	0.001
Biomarcadores									
Glucosa (mg/dl)	0.04	-0.32, 0.40	0.80	0.05	0.001,0.09	0.04	0.09	-0.26, 0.45	0.61
Insulina (UI/ml)	0.18	-0.07, 0.45	0.15	0.22	0.07,0.35	0.002	0.40	0.11, 0.70	0.007
Índice HOMA	0.04	-0.01, 0.10	0.14	0.05	0.02,0.08	0.003	0.09	0.02,0.15	0.007
LDL (mg/dl)	-0.56	-1.58, 0.45	0.27	0.29	0.10,0.49	0.003	-0.27	-1.30, 0.76	0.60
HDL (mg/dl)	0.06	-0.38, 0.51	0.77	-0.28	-0.46,-0.09	0.003	-0.21	-0.69, 0.26	0.37
Triglicéridos (mg/dl)	-0.58	-2.18, 1.01	0.47	1.29	0.66,1.92	<0.001	0.70	-0.99, 2.40	0.41
	<i>L. reuteri</i>								
Indicadores de adiposidad	Asociación directa			Asociación indirecta			Asociación total		
	β^*	IC 95%	Valor p	β^*	IC 95%	Valor p	β^*	IC 95%	Valor p
IMC	0.16	0.09,0.24	<0.001	NS	-	-	0.16	0.09,0.24	<0.001
CC	1.13	0.58,1.68	<0.001	NS	-	-	1.13	0.58,1.68	<0.001
Biomarcadores									
Glucosa (mg/dl)	-0.30	-0.82, 0.20	0.24	0.10	0.02,0.17	0.01	-0.20	-0.71, 0.31	0.43
Insulina (UI/ml)	0.24	-0.13, 0.62	0.20	0.36	0.16,0.57	<0.001	0.61	0.19,1.03	0.004
Índice HOMA	0.04	-0.04,0.12	0.36	0.07	0.04,0.12	<0.001	0.11	0.02, 0.21	0.01
LDL (mg/dl)	-0.63	-2.10, 0.83	0.39	0.64	0.33,0.94	0.001	0.008	-1.46, 1.48	0.99
HDL (mg/dl)	0.55	-0.08,1.20	0.09	-0.47	-0.76,-0.20	<0.001	0.08	-0.60, 0.76	0.81
Triglicéridos (mg/dl)	-3.24	-2.18,-1.01	0.006	2.50	1.56,3.41	<0.001	-0.74	-3.17,1.68	0.54

* Modelos ajustados por: sexo, edad, historia familiar de obesidad y actividad física en tiempo libre.

TABLA SUPLEMENTARIA 2 Comparación entre características generales de la submuestra del proyecto de *L. reuteri* y Fructosa (LRyF) contra el resto de la muestra proyecto de microbiota en pacientes no relacionados

Variables	Muestra LRyF n=1,087	Muestra restante n=309	Valor p
Edad (años)			
Mediana	9.36	9.80	0.06
P ₁₀ -P ₉₀	6.98-11.91	6.90-11.96	
Niños n (%)	601 (55.29)	132 (42.72)	<0.0001
Actividad física en tiempo libre (METs/mes)			
Mediana	337.5	318.75	0.30
P ₁₀ -P ₉₀	31.25-997.5	0-1020	
Antecedentes familiares de sobrepeso y obesidad n (%)**	597 (54.97)	147 (47.73)	0.02
Consumo de fructosa (%)			
Mediana	3.93	3.90	0.86
P ₁₀ -P ₉₀	2.57-6.06	2.61-6.21	
IMC n (%)			
Sobrepeso/obesidad	577 (53.08)	140 (45.45)	0.02

*Prueba de U de Mann-Whitney para variables continuas y χ^2 de Pearson para variables categóricas. ** Historia familiar de primer grado; al menos uno de los padres con el antecedente.

Anexo 3. Diagramas

FIGURA 1 Muestra de niños de la ciudad de México

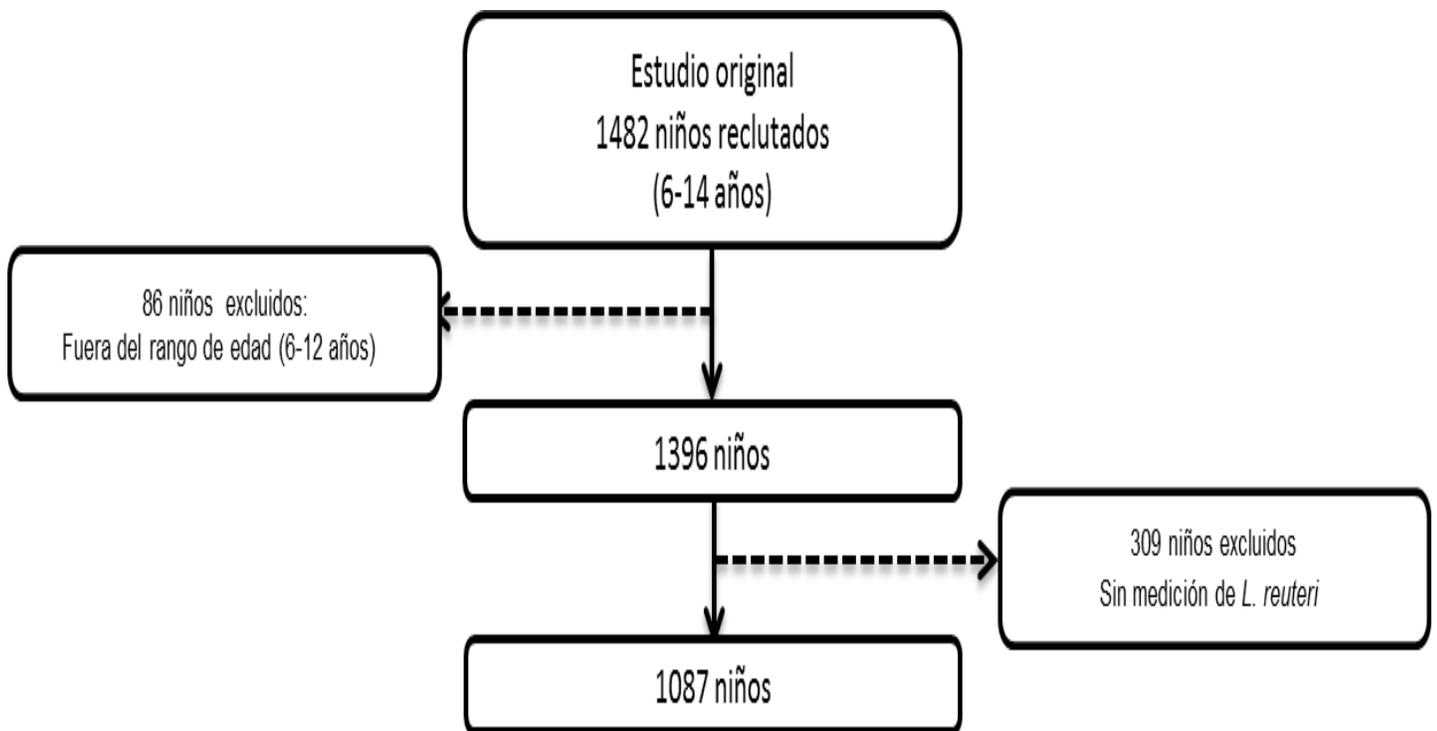


FIGURA 2 Efectos directos de *L. reuteri* y fructosa en indicadores de adiposidad

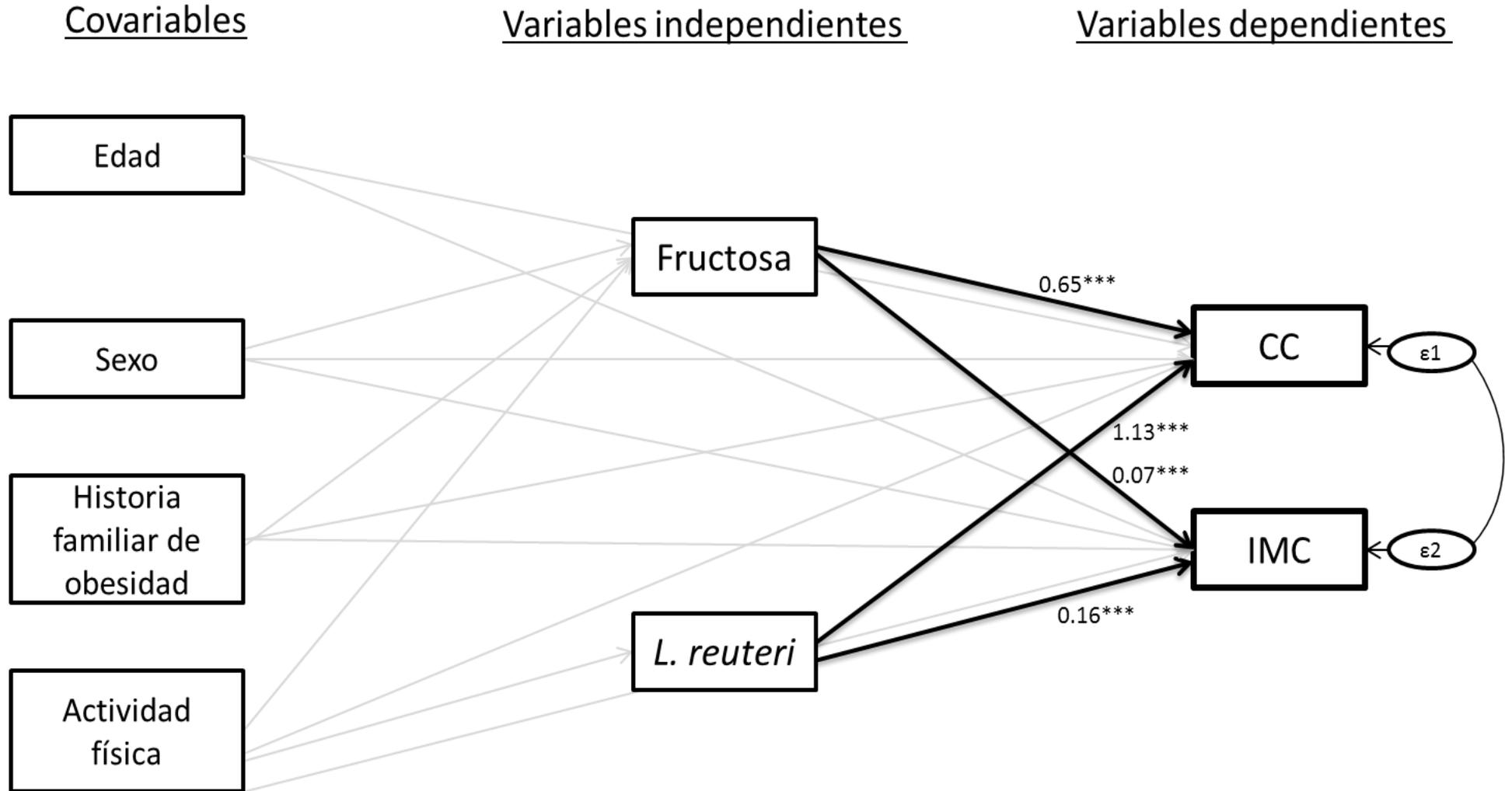
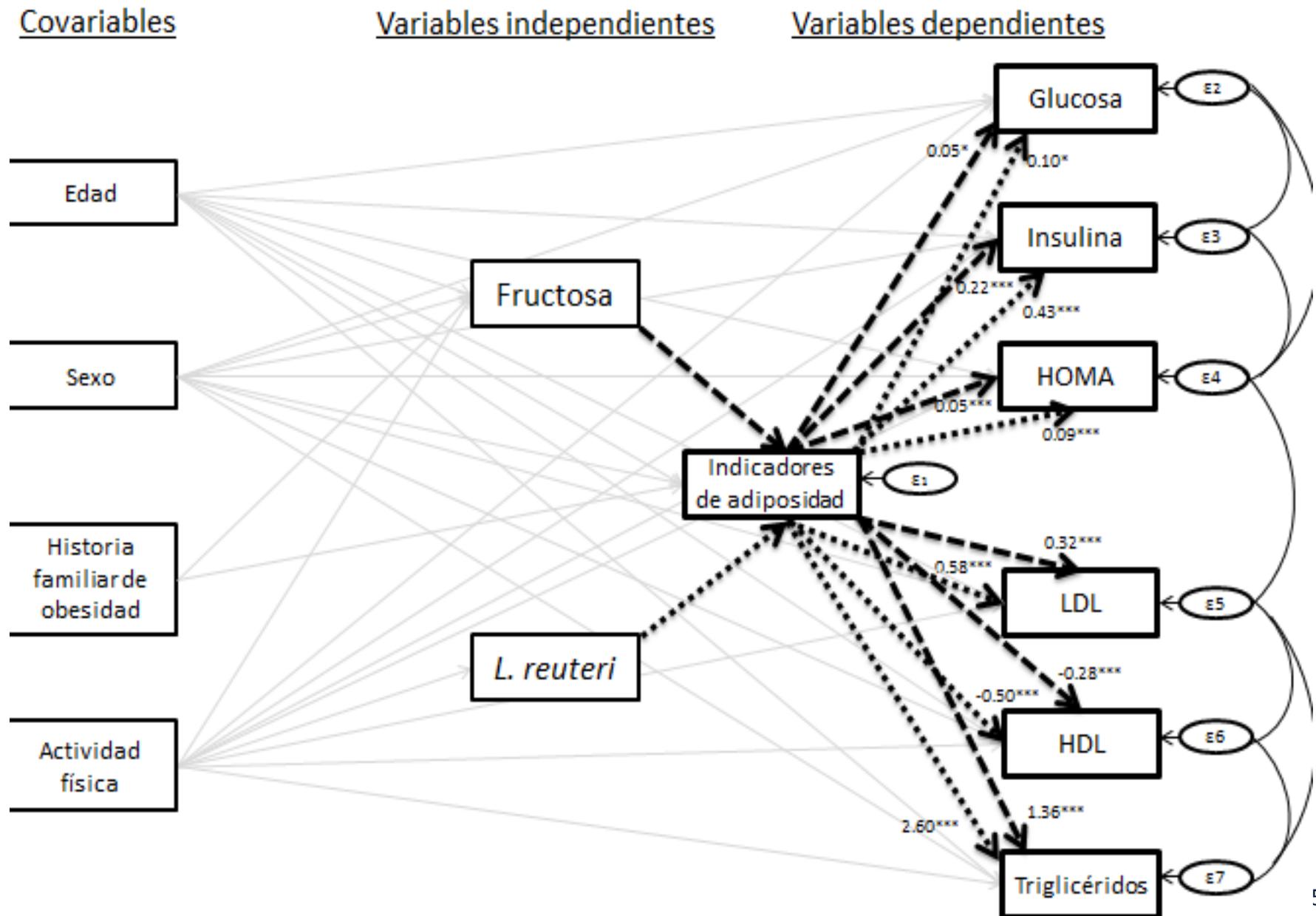


FIGURE 3 Efectos indirectos de *L. reuteri* y fructosa en parámetros bioquímicos mediado por indicadores de adiposidad



Referencia

1. ORGANIZACION MUDIAL DE LA SALUD O. Sobrepeso y obesidad infantil. 2014; Available from: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/es/>.
2. Gutiérrez J, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública (MX). 2012.
3. Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med*. 1997 Sep 25;337(13):869-73.
4. Esquivel V, Gómez G. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *AMC*. 2007;49(4):202-198.
5. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Senturk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2013 Feb 28;19(8):1166-72.
6. Riveros M, Parada A, Pettinelli P. Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutr Hosp*. 2014;29(3):491-9.
7. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Jun;36(6):817-25.
8. Walter J, Britton RA, Roos S. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4645-52.
9. Barrera A, Rodríguez A, Molina M. Escenario actual de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013;51(3):292-99.
10. Castro A, Toledo A, Macedo L, Inclán V. La obesidad infantil, un problema de salud multisistémico. *Rev Med Hosp Gen Méx* 2012;75(1):41-9.
11. Holvoet P. Stress in Obesity and Associated Metabolic and Cardiovascular Disorders. *Scientifica*. 2012.
12. Marcano Y, Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairet C, Maldonado M, et al. Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Rev Venez Endocrinol Metab*. 2006;4(1):15-21.
13. Bastarrachea r, López JC, Bolado V, Téllez J, Laviada H, A. C. Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gac Méd Méx* 2007;143(6):505-12.
14. Xu S, Xue Y. Pediatric obesity: Causes, symptoms, prevention and treatment. *Exp Ther Med*. 2016 Jan;11(1):15-20.
15. Vilchis-Gil J, Galvan-Portillo M, Klunder-Klunder M, Cruz M, Flores-Huerta S. Food habits, physical activities and sedentary lifestyles of eutrophic and obese school children: a case-control study. *BMC Public Health*. 2015;15:124.
16. Kluder-Kluder M, CRUZ M, MEDINA P, FLORES. S. Padres con sobrepeso y obesidad y el riesgo de que sus hijos desarrollen obesidad y aumento en los valores de la presión arterial. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2011;68(6):438-46.
17. Ambrosini GL, Johns DJ, Northstone K, Emmett PM, Jebb SA. Free Sugars and Total Fat Are Important Characteristics of a Dietary Pattern Associated with Adiposity across Childhood and Adolescence. *J Nutr*. 2016 Mar 9.
18. UNICEF. Salud y nutrición. 2015.
19. Moraes LI, Nicola TC, Jesus JS, Alves ER, Giovaninni NP, Marcato DG, et al. High blood pressure in children and its correlation with three definitions of obesity in childhood. *Arq Bras Cardiol*. 2014 Feb;102(2):175-80.

20. Rivera JA, de Cossio TG, Pedraza LS, Aburto TC, Sanchez TG, Martorell R. Childhood and adolescent overweight and obesity in Latin America: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Apr;2(4):321-32.
21. Lujan AM, Piat GL, Ott RA. Obesidad infantil la lucha contra un ambiente obesogénico *Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina.* 2010;197:19-24.
22. Ávila Y, Almeda P, Gómez M, Brito G, Manjarez I, Gómez F. Utilidad de un instrumentos simplificado para evaluar el consumo de fructosa. *Rev Mex Endocrinol Metab Nutr.* 2016;3(1):12-7.
23. Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem.* 2012 Mar;23(3):203-8.
24. Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? *Adv Nutr.* 2013 Mar;4(2):236-45.
25. Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 4;105(44):16871-5.
26. Payne AN, Chassard C, Lacroix C. Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host-microbe interactions contributing to obesity. *Obes Rev.* 2012 Sep;13(9):799-809.
27. Sievenpiper JL, de Souza RJ, Mirrahimi A, Yu ME, Carleton AJ, Beyene J, et al. Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2012 Feb 21;156(4):291-304.
28. Chiavaroli L, de Souza RJ, Ha V, Cozma AI, Mirrahimi A, Wang DD, et al. Effect of Fructose on Established Lipid Targets: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Feeding Trials. *J Am Heart Assoc.* 2015 Sep;4(9):e001700.
29. Wang D, Sievenpiper JL, Souza de RJ, Cozma AI, Chiavaroli L, Ha V, et al. Effect of fructose on postprandial triglycerides: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Atherosclerosis.* 2014 Jan;232(1):125-33.
30. Aeberli I, Zimmermann MB, Molinari L, Lehmann R, l'Allemand D, Spinaz GA, et al. Fructose intake is a predictor of LDL particle size in overweight schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 2007 Oct;86(4):1174-8.
31. Vartanian L, Schwartz M, Brownell K. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health.* 2007;97(4):667-75.
32. Ludwig, Peterson, Gortmaker S. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* 2001;357:505-8.
33. Papandreou D, Andreou E, Heraclides A, Rousso I. Is beverage intake related to overweight and obesity in school children? . *Hippokratia* 2013;17:42-6.
34. Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Méndez-Gómez-Humarán I, Jimenez-Aguilar A, Mendoza-Ramírez A, S. V. La obesidad en niños mexicanos en edad escolar se asocia con el consumo de alimentos fuera del hogar: durante el trayecto de la casa a la escuela. *ALAN.* 2011;61(3):288-95.
35. Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin M, C. WW. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud pública Méx.* 2008;50(2):173-95.
36. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res.* 2009 Feb;16(1):1-12.
37. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006 Jul;7(7):688-93.

38. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Nov;74(11):5088-90.
39. Valdovinos M, Gómez E, Torres G. *Gastrotrilogía I. Gastroenterología AMd*, editor. Mexico, D.F.: Clave; 2014.
40. Dore J, Corthier G. [The human intestinal microbiota]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010 Sep;34 Suppl 1:S7-15.
41. Wostmann BS. The germfree animal in nutritional studies. *Annu Rev Nutr*. 1981;1:257-79.
42. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. 2009 Aug;28(8):405-11.
43. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev*. 2004 Jun;9(2):180-97.
44. Chen J, He X, Huang J. Diet effects in gut microbiome and obesity. *J Food Sci*. 2014 Apr;79(4):R442-51.
45. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23.
46. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.
47. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013 Sep 6;341(6150):1241214.
48. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1022-3.
49. Estrada B, Cruz M, García J, Valladares A, Peralta J, Guna M, et al. La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre los firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutr Hosp*. 2015;31(3):1074-81.
50. Drissi F, Merhej V, Angelakis E, El Kaoutari A, Carriere F, Henrissat B, et al. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr Diabetes*. 2014;4:e109.
51. Gerez CL, Cuzzo S, Rollan G, Font de Valdez G. *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 as starter culture for wheat dough fermentation. *Food Microbiol*. 2008 Apr;25(2):253-9.
52. Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity. *Curr Obes Rep*. 2015 Jun;4(2):250-61.
53. Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res*. 2008 Jun 30;15(3):151-61.
54. Anabrees J, Indrio F, Paes B, AlFaleh K. Probiotics for infantile colic: a systematic review. *BMC Pediatr*. 2013;13:186.
55. Pascual M. Uso de prebióticos y probióticos en las fórmulas lácteas infantiles. *Nutr Hosp*. 2013;28(1): 55-3.
56. Rivera J, Hernández M, Aguilar C, Vadillo F, Murayama C. *Obesidad en México: Recomendaciones para una política de Estado*. México, D.F.: Médix; 2012.
57. Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Apr;72(4):2359-65.
58. Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium*

- animalis, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes (Lond)*. 2013 Nov;37(11):1460-6.
59. Hoelscher D, RS Day, ES Lee, R. RF. Measuring the Prevalence of Overweight in Texas Schoolchildren. *American Journal of Public Health*. 2004;94(6):1002.
60. Fajardo E, Ángel L. Prevalencia de sobrepeso y obesidad, consumo de alimentos y patrón de actividad física en una población de niños escolares de la ciudad de Bogotá. *Revista Med* 2012;20(1):101-16.
61. Barquera S, Hernández L, Campos I, Juan Espinosa, Mario Flores, Armando Barriguete J, et al. Energy and nutrient consumption in adults: Analysis of the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *salud pública de méxico* 2009;51(4):573-62.
62. Silva P, S. D. Bebidas azucaradas, más que un simple refresco. *Rev chil nutr* 2014;41(1):97-1.
63. Serna C. *Dumoing en México: Azúcar vs Jarabe de Maíz Alto en Fructosa*. México: UAM; 2003.
64. Habicht J. Estandarización de métodos epidemiológicos cuantitativos sobre el terreno. *Of Sanit Panam*. 1974;75(5):375-84.
65. Lohman T, Roche A, Martorell R. *Anthropometric standardization reference manual*. . Champaign, Illinois: Human Kinetics Books. 1988;3(8):39-70.
66. Hosker JP, Matthews DR, Rudenski AS, Burnett MA, Darling P, Bown EG, et al. Continuous infusion of glucose with model assessment: measurement of insulin resistance and beta-cell function in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):401-11.
67. Hernández B, Gortmaker SL, Laird NM, Colditz GA, Parra-Cabrera S , KE. P. Validez y reproducibilidad de un cuestionario de actividad e inactividad física para escolares de la ciudad de México. *Salud Pública Méx* 2000;42(4):315-23.
68. Cardenas-Cardenas LM, Burguete-Garcia AI, Estrada-Velasco BI, Lopez-Islas C, Peralta-Romero J, Cruz M, et al. Leisure-time physical activity and cardiometabolic risk among children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2015 Mar-Apr;91(2):136-42.
69. Willet W. *Nutritional Epidemiology*. ed s, editor. USA: Oxford University Press; 1990.
70. INSP. *Bases de datos del valor nutritivo de los alimentos*. Compilación del Instituto Nacional de Salud Pública. 2012.
71. USDA USDoAARS. *Food Composition Databases*. 2016; Available from: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
72. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 1997 Apr;65(4 Suppl):1220S-8S; discussion 9S-31S.
73. 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. *J Microbiol Methods*. 2011 Sep;86(3):351-6.
74. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
75. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009 May;119(5):1322-34.
76. Le KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2006 Dec;84(6):1374-9.

77. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*. 2001 Aug 22-29;286(8):944-53.
78. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2002 Nov;76(5):911-22.
79. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2016 May;61(5):1282-93.
80. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS One*. 2009 Sep 23;4(9):e7125.
81. Dunham HJ, Casas IA, Edens FW, Parkhurst CR, Garlich JD, WJ. D. Avian growth depression in chickens induced by environmental, microbiological, or nutritional stress is moderated by probiotic administrations of *Lactobacillus reuteri*. *Bioscience Microflora*. 1998;17(2):133-9.
82. Liu H, Zhang J, Zhang S, Yang F, Thacker PA, Zhang G, et al. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets. *J Agric Food Chem*. 2014 Jan 29;62(4):860-6.
83. Wang A, Yu H, Gao X, Li X, Qiao S. Influence of *Lactobacillus fermentum* I5007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged piglets. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009 Jun;96(1):89-98.
84. Fak F, Backhed F. *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in *Apoe*^{-/-} mice. *PLoS One*. 2012;7(10):e46837.
85. Blaut M. Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2015 Aug;74(3):227-34.
86. Ma L, Robinson LN, Towle HC. ChREBP**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):28721-30.
87. Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):1907-13.
88. Schwarz JM, Noworolski SM, Wen MJ, Dyachenko A, Prior JL, Weinberg ME, et al. Effect of a High-Fructose Weight-Maintaining Diet on Lipogenesis and Liver Fat. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jun;100(6):2434-42.
89. Lustig RH, Mulligan K, Noworolski SM, Tai VW, Wen MJ, Erkin-Cakmak A, et al. Isocaloric fructose restriction and metabolic improvement in children with obesity and metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Feb;24(2):453-60.
90. Hsieh FC, Lee CL, Chai CY, Chen WT, Lu YC, Wu CS. Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2013 Apr 17;10(1):35.
91. Duthie SJ, Duthie GG, Russell WR, Kyle JAM, Macdiarmid JI, Rungapamestry V, et al. Effect of increasing fruit and vegetable intake by dietary intervention on nutritional biomarkers and attitudes to dietary change: a randomised trial. *Eur J Nutr*. 2017:1-18.
92. Sanchez M, Panahi S, A. T. Childhood Obesity: A Role for Gut Microbiota? *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2015;12(1):162-75.
93. Hou C, Zeng X, Yang F, Liu H, Qiao S. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J Anim Sci Biotechnol*. 2015;6(1):14.
94. OCDE. Health at a Glance 2015: OECD Indicators. Paris: OCDE; 2015.