

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL I.PN.**

Departamento de Farmacología



Cinvestav

**ASOCIACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL CON LOS
NIVELES DE BUTIRATO EN LA OBESIDAD INFANTIL**

Tesis que presenta

DORA LUISA GARNICA LÓPEZ

Para obtener el Grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA**

MÉXICO, D.F., MAYO DEL 2012

El presente trabajo de investigación se desarrollo en el laboratorio de Farmacogenómica (Lab. 10) del departamento de Farmacología y en el laboratorio de Genómica Ambiental (Lab. 6) del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), bajo la dirección del Dr. Carlos Hoyo Vadillo y la co-dirección del Dr. Jaime García Mena, en el período comprendido de noviembre 2010 a marzo 2012 con apoyo de la beca CONACyT No. 350422.

DEDICATORIA

A mis padres Martha y
Juventino Garnica, a mis
hermanos, compañeros y amigos

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento al Dr. Carlos Hoyo Vadillo y al Dr. Jaime García Mena por brindarme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios e integrarme al equipo de trabajo con el cual compartí inolvidables experiencias y aprendizajes, por introducirme al campo de la biología molecular en el estudio de comunidades microbianas y por el apoyo brindado a mis ideas e inquietudes.

Mi más sincero agradecimiento al Biol. Alberto Piña Escobedo, auxiliar de investigación por haberme brindado apoyo y consejo en el aprendizaje diario experimental, al técnico José Rodrigo García Gutiérrez por su apoyo con material de laboratorio, a la Nut. Elisa Barroeta por su apoyo en el manejo de la información nutricia y a todos ellos por su amistad y compañía.

A la Lic. Ma. Antonieta Ortega Gutiérrez, jefa del Departamento de Jardín Infantil y al Dr. José Ricardo Medina Dávila por su apoyo en la gestión de los permisos para la obtención de las muestras, a la asociación de padres Jin-Cinvestav, así como los padres y niños que participaron en el estudio.

A mis compañeros de laboratorio por su comprensión, amistad, solidaridad y por haber hecho agradable e inolvidable mi estancia.

A mis compañeros de generación, a mis amigos y a mi familia por apoyarme en todo momento con su cariño, consejo y enseñanzas.

Mi respeto y gratitud al Cinvestav y a los Departamentos de Farmacología y Genética y Biología Molecular, profesores, trabajadores y amigos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1.1. GENERALIDADES	6
1.1.1. <i>Epidemiología de la obesidad infantil.</i>	6
1.1.2. <i>Relevancia del estudio y prevención de la obesidad pediátrica en México</i>	7
1.2. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS	9
1.2.1. <i>Etiología</i>	9
1.2.2. <i>Diagnóstico de la obesidad infantil.</i>	11
1.2.3. <i>Métodos terapéuticos</i>	12
1.2.4. <i>Terapia farmacológica</i>	12
1.3. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.....	13
1.3.1. <i>Microbiota intestinal y su relación con la obesidad</i>	15
1.3.2. <i>Naturaleza y función fisiológica de los AGCC</i>	18
1.4. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA Y SUS METABOLITOS.	20
1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AGCC.....	25
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO	28
2.1. JUSTIFICACIÓN	28
2.2. HIPÓTESIS.....	29
2.3. OBJETIVO GENERAL	29
2.4. OBJETIVOS PARTICULARES	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BUTIRATO Y LA COMPOSICIÓN MICROBIANA	30
3.1.1. <i>Elección del método de análisis del butirato en las heces</i>	30
3.1.1.1. Condicionamiento del cartucho para la extracción en fase sólida	30
3.1.1.2. Extracción de butirato de la muestra biológica.....	31
3.1.1.3. Protocolo de análisis del butirato por HPLC de fase reversa.....	31
3.1.1.4. Validación del sistema y del método.....	33
3.1.2. <i>Elección del método de extracción del DNA genómico bacteriano</i>	33
3.1.2.1. Extracción por el protocolo de fenol/cloroformo	34
3.1.2.2. Extracción por el método de columna (kit comercial).....	35
3.1.3. <i>Evaluación de la integridad del DNA bacteriano por fraccionamiento electroforético</i>	35
3.1.4. <i>Cuantificación y pureza del DNA por espectrofotometría UV</i>	36
3.1.5. <i>Amplificación de la sección intermedia del gen 16S rRNA bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	36
3.1.6. <i>Fraccionamiento electroforético en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de amplicones obtenidos por PCR</i>	38
3.1.6.1. Formación del gel de poliacrilamida	38
3.1.6.2. Precalentamiento y preparación del equipo.....	40
3.1.6.3. Preparación de la muestra	41
3.1.6.4. Tinción y documentación de los geles de DGGE	41
3.1.7. <i>Corrimiento de los geles analíticos de DGGE para establecer las condiciones de fraccionamiento</i> ...42	
3.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE COPRO DE LOS GRUPOS CONTROL Y CASO.....	43
3.2.1. <i>Voluntarios</i>	43
3.2.2. <i>Criterios de inclusión</i>	44

3.2.3.	<i>Criterios de exclusión</i>	44
3.2.4.	<i>Protocolo de recolección de copro</i>	44
3.3.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA POR PERFILES DE DGGE Y GENERACIÓN DE DENDOGRAMAS	45
3.4.	RECUPERACIÓN DEL DNA (FRAGMENTO DEL GEN 16S rRNA) FRACCIONADO EN GEL DE POLIACRILAMIDA POR EL MÉTODO DE ELECTROELUCIÓN	45
3.5.	REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL FRAGMENTO DE 16S rRNA RECUPERADO POR ELECTROELUCIÓN DE UN GEL PREPARATIVO DE DGGE.....	47
3.6.	PRECIPITACIÓN CON EDTA-ETOH PARA LIMPIAR REACCIONES DE SECUENCIACIÓN	48
3.7.	CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN 16S rRNA EN VECTOR pJET1.2/BLUNT RECUPERADO DE UN GEL DE DGGE POR ELECTROELUCIÓN	48
3.7.1.	<i>Preparación de las células competentes</i>	49
3.7.2.	<i>Ligación</i>	49
3.7.3.	<i>Transformación</i>	50
3.8.	EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA	50
3.8.1.	<i>Cálculo de la eficiencia de transformación</i>	51
3.8.2.	<i>Confirmación por PCR de inserto en el plásmido pJET 1.2/blunt</i>	52
3.9.	REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO DE 16S rRNA CLONADO EN EL VECTOR pJET1.2/BLUNT	53
3.10.	ANÁLISIS DE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y ASIGNACIÓN DE FILOGENIA	54
3.11.	MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	54
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1.	ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BUTIRATO Y LA COMPOSICIÓN MICROBIANA.	55
4.1.1.	<i>Elección del método de análisis del butirato en las heces</i>	55
4.1.1.1.	Extracción de butirato en la muestra biológica.....	56
4.1.1.2.	Validación del sistema y del método.....	56
4.1.2.	<i>Elección del método de extracción del DNA genómico bacteriano</i>	57
4.2.	FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE) DE AMPLICONES OBTENIDOS POR PCR.	59
4.3.	ANÁLISIS DE MUESTRAS DE COPRO DE LOS GRUPOS CONTROL Y CASO.....	64
4.3.1.	<i>Voluntarios</i>	64
4.3.2.	<i>Antecedentes familiares</i>	64
4.3.3.	<i>Análisis de recordatorio 24h</i>	65
4.3.4.	<i>Niveles de ácido butírico en muestras de copro de los grupos control y caso</i>	67
4.3.5.	<i>Extracción del DNA bacteriano de las muestras y evaluación de la integridad</i>	72
4.3.5.1.	Cuantificación y pureza del DNA por espectrofotometría UV.....	73
4.3.5.2.	Amplificación de la sección intermedia del gen 16S rRNA bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	74
4.4.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA POR PERFILES DE DGGE Y GENERACIÓN DE DENDOGRAMAS	75
4.4.1.	<i>Análisis de los índices de similitud por presencia/ausencia de bandas en base al grupo</i>	81
4.4.2.	<i>Análisis de similitud de la composición microbiana por DGGE en base al nivel de butirato</i>	82
4.4.3.	<i>Análisis semicuantitativo por intensidad de banda</i>	85
4.4.4.	<i>Elección de bandas sujetas a corte para secuenciación</i>	87
4.5.	REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL FRAGMENTO DE 16S rRNA RECUPERADO POR ELECTROELUCIÓN DE UN GEL PREPARATIVO DE DGGE.....	87
4.6.	CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN 16S rRNA EN VECTOR pJET1.2/BLUNT RECUPERADO DE UN GEL DE DGGE POR ELECTROELUCIÓN.....	88
4.7.	EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA.....	91
4.8.	ANÁLISIS DE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y ASIGNACIÓN DE FILOGENIA	93
5.	CONCLUSIONES	98

6. BIBLIOGRAFÍA.....	101
7. ANEXOS.....	109
ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN	109
ANEXO 2. CUESTIONARIO DE ANTECEDENTES CLÍNICO-FAMILIARES.....	110
ANEXO 3. RECORDATORIO NUTRICIONAL DE 24 HORAS DE PASOS MÚLTIPLES.....	111
ANEXO 4. PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR PARA LA RECOLECCIÓN DE LAS HECES.....	114
ANEXO 5. APROBACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA DEL CINVESTAV	115
ANEXO 6. MATRICES DE DATOS OBTENIDOS POR ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	116
ANEXO 7. MATRIZ DE LAS INTENSIDADES Y CONCENTRACIONES RELATIVAS DE LAS BANDAS EN LOS GELES ANALÍTICOS DE DGGE ..	120
ANEXO 8. CORTE DE LAS BANDAS SELECCIONADAS PARA LA SECUENCIACIÓN	123
ANEXO 9. SECUENCIACIÓN Y DEPURACIÓN	124
ANEXO 10. TABLAS DE IDENTIDAD UTILIZANDO LA HERRAMIENTA BLAST	135

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. UNIÓN DE LOS PRIMERS CGO465F-GC Y CGO465R A LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA DE <i>E. COLI</i> .	37
FIGURA 2. FORMACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA. (A) ARMADO DEL SÁNDWICH, (B) LLENADO DEL GEL DE POLIACRILAMIDA.	39
FIGURA 3. RUEDA FORMADORA DE GRADIENTES.	40
FIGURA 4. EQUIPO DCODE. (A) MONTAJE DE LA CÁMARA DE CORRIMIENTO, (B) ENSAMBLE DEL SÁNDWICH Y DELCORE.	41
FIGURA 5. ESQUEMA DE UNA CÁMARA DE ELECTROELUCIÓN. (A) POLO NEGATIVO, (B) POLO POSITIVO, (C) FRAGMENTO DE POLIACRILAMIDA, (D) CONDUCTO ANTERIOR Y (E) CONDUCTO POSTERIOR.	46
FIGURA 6. MAPA DEL VECTOR PJET1.2/BLUNT.	49
FIGURA 7. CURVA PATRÓN DE ESTÁNDARES DE BUTIRATO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AGCC.	57
FIGURA 8. INTEGRIDAD DE LOS EXTRACTOS DE DNA OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS. (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ . DNA EXTRAÍDO CON EL KIT MoBio (A1-2), DNA EXTRAÍDO CON EL KIT QIAAMP (A3-4), DNA EXTRAÍDO CON EL KIT ZYMORESEARCH (A5-6), DNA EXTRAÍDO POR EL MÉTODO FENOL/CLOROFORMO (B1-4).	58
FIGURA 9. AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE DNA DE MUESTRAS FECALES CON EL KIT QIAAMP. (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR, (P) DNA <i>E. COLI</i> CONTROL POSITIVO, (N) CONTROL NEGATIVO, AMPLIFICACIÓN 16S rRNA HECES DE ADULTO (1 - 2) , AMPLIFICACIÓN 16S rRNA HECES DE NIÑO (3 - 4).	59
FIGURA 10. FRACCIONAMIENTO DGGE DE AMPLICÓN DE 16S rRNA PROVENIENTE DE HECES DE 3 ADULTOS SANOS. (1-3 CORRESPONDEN A LA MISMA MUESTRA), EL GRADIENTE DESNATURALIZANTE SE INDICA EN EL EXTREMO IZQUIERDO.	60
FIGURA 11. AJUSTE DEL INTEVALO DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE PARA ESTANDARIZACIÓN DE FRACCIONAMIENTO DGGE. (A) 20 μ G DE AMPLICÓN DE TRES MUESTRAS DE HECES DE ADULTO (1-3) Y DE UN INFANTE (4), (B) FRACCIONAMIENTO DE 20 μ G DE AMPLICÓN DE LAS MISMAS MUESTRAS.	60
FIGURA 12. AJUSTE DE LA CANTIDAD DE AMPLICÓN (DNA) DE UNA MUESTRA DE ADULTO. (A) CARGA DE 1, 5, 25 Y 75 μ G DNA (1-4), (B) CARGA DE 12, 18, 24 Y 30 μ G DNA (1-4).	61
FIGURA 13. FRACCIONAMIENTO DGGE DE PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS. (M) ESTÁNDAR DE MIGRACIÓN, AMPLICÓN NO PURIFICADO (1), PURIFICADO POR FENOL/CLOROFORMO (2), PRECIPITACIÓN CON ACETATO (3), PURIFICACIÓN POR COLUMNA (4) Y PREPARATIVO AGAROSA-COLUMNA (5). LAS CONDICIONES DE LA ELECTROFORESIS FUERON 20H A 65V (0.03A).	62
FIGURA 14. AJUSTE FINAL DE CONDICIONES DE ELECTROFORESIS (DGGE) PARA LAS MUESTRAS PROBLEMA. (A) GRADIENTE 38-43%, (B) GRADIENTE DESNATURALIZANTE DE 38 - 55% Y (C) GRADIENTE 38 A 60%. LOS GELES A - C FUERON CARGADOS CON 20 μ G DE AMPLICÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA.	63

FIGURA 15. VALORES DE LA INGESTA CALÓRICA RECOMENDADA Y REAL PARA EL GRUPO CONTROL.	66
FIGURA 16. VALORES DE LA INGESTA CALÓRICA RECOMENDADA Y REAL PARA EL GRUPO CASO.	66
FIGURA 17. COMPARACIÓN DE LA INGESTA CALÓRICA MEDIA ENTRE EL GRUPO CONTROL Y CASO.	67
FIGURA 18. COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MEDIA DE BUTIRATO EN LAS HECEs DE LOS GRUPOS CONTROL Y CASO.	68
FIGURA 19. NIVELES PROMEDIO DE BUTIRATO EN LAS MUESTRAS DEL GRUPO CONTROL.	68
FIGURA 20. NIVELES PROMEDIO DE BUTIRATO EN MUESTRAS DEL GRUPO CASO.	69
FIGURA 21. COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MEDIA DE BUTIRATO EN LAS HECEs DE INDIVIDUOS CASO Y CONTROL.	69
FIGURA 22. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES. CARGA DE LAS DIFERENTES VARIABLES MEDIDAS EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE COPRO DE LOS GRUPOS CONTROL Y CASO.	71
FIGURA 23. NIVELES DE BUTIRATO EN LAS MUESTRAS DEL GRUPO DE LACTANTES.	72
FIGURA 24. INTEGRIDAD DE LOS EXTRACTOS DEL DNA DE LAS MUESTRAS. (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR Λ , DNA GRUPO CONTROL (A1-8), DNA GRUPO LACTANTES (A9-B12), DNA GRUPO CASO (B13-18).	73
FIGURA 25. ESPECIFICIDAD DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE 16S rRNA. AMPLICÓN DEL GRUPO CONTROL (A1-8), AMPLICÓN GRUPO LACTANTES (A9-12), AMPLICÓN GRUPO CASO (B1-6).	74
FIGURA 26. FRACCIONAMIENTO DGGE DE LOS AMPLICONES DE 8 MUESTRAS CONTROL. (M) ESTÁNDAR DE MIGRACIÓN, DE IZQUIERDA A DERECHA FOLIOS C023, C002, C028, C005, C019, C003, C032, C031 (1-8).	76
FIGURA 27. FRACCIONAMIENTO DGGE DE LOS AMPLICONES DE 6 MUESTRAS CASO Y 4 LACTANTES. (M) ESTÁNDAR DE MIGRACIÓN, DE IZQUIERDA A DERECHA FOLIOS DEL GRUPO CASO C001, C020, C029, C022, C006, C011 (1-6), FOLIOS DE LACTANTES C004, C012, C013, C018 (7-10).	77
FIGURA 28. DENDOGRAMA GENERADO EN EL PROGRAMA GELCOMPAR II v.6.5. EL VALOR DE CADA NODO CORRESPONDE AL ÍNDICE DE SIMILITUD DE ACUERDO A LA ESCALA SUPERIOR. LOS CÍRCULOS Y LAS ESTRELLAS DENOTAN A LOS INTEGRANTES DE CADA GRUPO (VERDE PARA CONTROLES Y ROJO PARA CASOS). EN LAS COLUMNAS CENTRALES SE INDICA EL FOLIO, LA AGRUPACIÓN Y EL VALOR DE BUTIRATO PARA CADA MUESTRA Y EN LA EXTREMA DERECHA SE GRAFICA LA MATRIZ DE SIMILITUD EN UN PATRÓN DE INTENSIDAD (ESCALA SUPERIOR).	78
FIGURA 29. GRÁFICO DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE SIMILITUD Y LA CONCENTRACIÓN DE BUTIRATO EN LOS CUATRO CLUSTERS OBTENIDOS AL AGRUPAR LAS MUESTRAS POR LA COMPOSICIÓN MICROBIANA USANDO LA TÉCNICA DE DGGE.	79
FIGURA 30. AUSENCIA DE CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE BANDAS (DIVERSIDAD RELATIVA) Y LA CONCENTRACIÓN DE BUTIRATO EN CADA SUBCONJUNTO DE MUESTRAS (A-D).	82

- FIGURA 31.** DENDOGRAMA DE SIMILITUD EN BASE AL PERFIL DE BANDEO DGGE DEL GRUPO CON NIVEL BAJO DE BUTIRATO. PRIMERA COLUMNA: FOLIO DE LA MUESTRA, SEGUNDA COLUMNA: TIPO DE MUESTRA Y TERCERA COLUMNA: NIVEL DE BUTIRATO (MMOL/KG). 83
- FIGURA 32.** DENDOGRAMA DE SIMILITUD EN BASE AL PERFIL DE BANDEO DGGE DEL GRUPO CON NIVEL ALTO DE BUTIRATO. PRIMERA COLUMNA: FOLIO DE LA MUESTRA, SEGUNDA COLUMNA: TIPO DE MUESTRA Y TERCERA COLUMNA: NIVEL DE BUTIRATO (MMOL/KG). 84
- FIGURA 33.** GEL PREPARATIVO CON 200 μ G DE FRAGMENTO DEL GEN 16S rRNA DE *E. COLI* (CEPA TOP 10 F') PARA CORTE DE BANDA Y RECUPERACIÓN DEL DNA POR ELECTROELUCIÓN. 88
- FIGURA 34.** CONFIRMACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE DNA DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA POR ELECTROELUCIÓN. (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR, (P) CONTROL POSITIVO (*E. COLI*), (1) BANDA M3 (MUESTRA C006), (2) BANDA M4 (C029), (3) BANDA M7 (C011), (4) BANDA M8 (C023) Y (5) BANDA M9 (C032). 88
- FIGURA 35.** PLAQUEO DE POST-TRANSFORMANTES RESULTANTES DE LA CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DE 16S RECUPERADO DE DGGE. (A) CONTROL J, (B) CONTROL C, POSTTRANSFORMANTES DE CLONACIÓN DE BANDAS M3, M4, M7, M8 Y M9 (C-G). 90
- FIGURA 36.** AISLAMIENTO POR ESTRÍA SIMPLE DE POST-TRANSFORMANTES. (A) SIEMBRA DE UNA COLONIA DE LOS CONTROLES J Y C. (B-D) SIEMBRA DE UNA COLONIA DE LAS CLONAS TRANSFORMADAS CON UNA BANDA DE DGGE. 90
- FIGURA 37.** PLÁSMIDOS OBTENIDOS DE LA CLONACIÓN DE 5 FRAGMENTOS DE 16S rRNA RECUPERADOS DE DGGE. (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ , PLÁSMIDO CONTROL J (A1-2 Y B1-2), PLÁSMIDO M3 (A3-4), PLÁSMIDO M4 (A5-7), PLÁSMIDO M7 (A8-9), PLÁSMIDO M8 (B3-5), PLÁSMIDO M9 (C1-3). PLÁSMIDO C (C4-6). 91
- FIGURA 38.** AMPLIFICACIÓN POR PCR PARA LA CONFIRMACIÓN DE LA INSERCIÓN DEL FRAGMENTO DE 16S rRNA EN pJET1.2/BLUNT. (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR, PLÁSMIDO M3 (A1-2), PLÁSMIDO M4 (A3-4), PLÁSMIDO M8 (B1-2), PLÁSMIDO M9 (B3-5) Y PLÁSMIDO M7 (B6-7). 92
- FIGURA 39.** RELACIONES TAXONÓMICAS EVOLUTIVAS. LA HISTORIA EVOLUTIVA FUE INFERIDA UTILIZANDO EL MÉTODO UPGMA (JONES ET AL., 1973). SE MUESTRA EL ÁRBOL OPTIMIZADO CON LA SUMA DE LA LONGITUD DE NODOS= 3.45961074. EL ÁRBOL ESTÁ A ESCALA CON LA SUMA DE LAS LONGITUDES DE NODO EN LAS MISMAS UNIDADES COMO AQUELLAS DE LAS DISTANCIAS EVOLUTIVAS UTILIZADAS PARA INFERIR EL ÁRBOL FILOGENÉTICO. LAS DISTANCIAS EVOLUTIVAS FUERON CALCULADAS UTILIZANDO EL MÉTODO DE PARENTESCO COMPUESTO MÁXIMO (MAXIMUM COMPOSITE LIKELIHOOD) Y ESTÁ EN UNIDADES DEL NUMERO DE SUBSTITUCIONES DE BASE POR SITIO (TAMURA ET AL., 2004). EL ANÁLISIS INVOLUCRÓ 22 SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS. LAS POSICIONES DE LOS CODONES INCLUIDOS FUERON 1RO,+2DO+3RO+ NO CODIFICANTE. TODAS LAS POSICIONES QUE CONTENÍAN GAPS FUERON ELIMINADAS.

HUBO UN TOTAL DE 414 POSICIONES EN EL SET DE DATOS FINAL. EL ANÁLISIS FUE CONDUCTO EN MEGA5 (TAMURA ET AL., 2011).

94

FIGURA 40. ÁRBOL FILOGENÉTICO PARA LA SECUENCIA DE LA BANDA 52.5 (CR= 0.13 $\mu\text{g DNA}/\mu\text{L AMPLICÓN}$) ENRIQUECIDA EN LA MUESTRA CASO C006 CON NIVEL DE BUTIRATO ALTO (85.9 MMOL/KG).

95

FIGURA 41. ÁRBOL FILOGENÉTICO PARA LA SECUENCIA DE LA BANDA 60.7 PROVENIENTE DE LA MUESTRA CASO C029 CON NIVEL DE BUTIRATO ALTO (109.2 MMOL/KG).

96

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. EXPRESIONES MATEMÁTICAS PARA EL CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE SIMILITUD Y DIVERGENCIA.	25
TABLA 2. COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA AMPLIFICAR 16S rRNA BACTERIANO.	37
TABLA 3. PROTOCOLO DE TEMPERATURAS PARA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FRAGMENTOS DEL GEN 16S rRNA CON PINZA DE GC.	38
TABLA 4. COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA SECUENCIAR.	47
TABLA 5. PROTOCOLO DE TEMPERATURAS PARA LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DE AMPLICONES RECUPERADOS DE DGGE.	47
TABLA 6. COMPONENTES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN DE LIGACIÓN.	50
TABLA 7. COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA AMPLIFICAR 16S rRNA BACTERIANO.	52
TABLA 8. PROTOCOLO DE TEMPERATURAS PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL FRAGMENTO DE 16S rRNA CLONADO EN PJET1.2/BLUNT.	52
TABLA 9. COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA SECUENCIAR.	53
TABLA 10. PROTOCOLO DE TEMPERATURAS PARA LA REACCIÓN DE LA SECUENCIACIÓN DE INSERTO EN PJET1.2/BLUNT.	53
TABLA 11. PUREZA Y CONCENTRACIÓN DEL DNA GENÓMICO BACTERIANO EXTRAÍDO POR DIFERENTES MÉTODOS DE UNA MUESTRA FECAL.	58
TABLA 12. APORTACIÓN CALÓRICA PORCENTUAL DIARIA POR GRUPO.	65
TABLA 13. CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DEL DNA DE MUESTRAS DE COPRO.	73
TABLA 14. CUANTIFICACIÓN DE LOTES DE AMPLIFICACIÓN 16S rRNA.	75
TABLA 15. CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE SIMILITUD O DIVERGENCIA DE LOS GRUPO CASO Y CONTROL POR PERFIL DE BANDEO EN DGGE.	81
TABLA 16. MATRIZ DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA (Cr) DE LAS BANDAS CON MAYOR INTENSIDAD EN TODAS LAS MUESTRAS.	86
TABLA 17. BANDAS SELECCIONADAS PARA EL CORTE Y LA SECUENCIACIÓN.	87
TABLA 18. CUENTA DE COLONIAS POST-TRANSFORMANTES VIABLES.	89
TABLA 19. CUANTIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.	91

NOTACIÓN DE ABREVIATURAS

AGCC:	Ácidos grasos de cadena corta
ABX:	Antibiótico
Amp:	Ampicilina
CDC:	Centro de control de enfermedades de Atlanta
dsDNA:	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
DGGE:	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
EDTA:	Ácido etilendiamin-tetra-ácetico
FD:	Factor de dilución
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
IMC:	Índice de masa corporal
JIN:	Jardín Infantil del Cinvestav
λ ó tetra:	Tetraciclina
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
SD:	Desviación estándar (standard deviation)
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
TAE:	Buffer Tris-Acético-EDTA
TBE:	Buffer Tris-Borato-EDTA
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
Tris-HCl:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol ácido
UFC:	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultravioleta

RESUMEN

La microbiota humana se conforma de los millones de microorganismos que colonizan diferentes regiones anatómicas del cuerpo humano; sus genes se han asociado con capacidades metabólicas que el hospedero intrínsecamente no posee y cuyo estudio se ha enfocado en la evaluación del papel que estos desempeñan en los procesos fisiológicos, en especial en la homeostasis energética y la regulación del sistema inmune. Se sabe que la microbiota por sí misma ejerce un efecto sobre la composición corporal de un individuo favoreciendo la extracción energética de los alimentos, sugiriendo su implicación en el establecimiento de patologías tales como la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico. Se ha propuesto que cambios específicos en la composición de la microbiota desencadenan efectos particulares en el hospedero; sin embargo, los mecanismos aun no son suficientemente claros. En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de muestras de copro de catorce niños entre 3 y 12 años de edad así como de cuatro infantes lactantes con la finalidad de realizar el análisis de composición de su microbiota intestinal y la cuantificación de ácido butírico, metabolito producido por fermentación anaerobia bacteriana y que es fuente energética aprovechable por las células epiteliales del colon, al cual se le han atribuido diversos efectos terapéuticos, principalmente una actividad anti-inflamatoria. Para determinar la composición microbiana se implementó un protocolo basado en la amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S rRNA seguido de fraccionamiento electroforético con gradiente desnaturizante (DGGE) para visualizar la diversidad microbiana en cada muestra. Cinco bandas que presentaron una concentración relativa (de acuerdo a la intensidad de banda) mayor a $0.12 \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$ amplicón se clonaron en el vector pJET1.2/blunt para posteriormente obtener las secuencias y realizar una asignación filogenética por contraste en la base de datos del NCBI. Para el análisis cuantitativo de butirato se implementó un protocolo de extracción en fase sólida seguido de un análisis por HPLC con columna de fase reversa, las muestras fueron procesadas en base a peso húmedo para la extracción y se construyó la curva de calibración para la cuantificación por estándar externo. En este

trabajo se observó que los niveles de butirato así como la composición microbiana en base a la presencia de bandas en DGGE fue altamente variable de manera inter-individual. No se obtuvo un índice de similitud mayor entre los individuos de alguno de los grupos (caso o control) ni la presencia de una banda específica. Las secuencias obtenidas de dos bandas clonadas, ambas correspondientes a muestras del grupo CASO, sugieren estar relacionadas con las bacterias *B. plebeius* DSM 17135 cepa M12 la primera y *E. fergusonii* ATCC 35469 la segunda, ambas con un índice de identidad de 99% y nivel de expectación de cero. Aun no se sabe si alguna de estas especies se encuentra involucrada en el metabolismo del butirato; sin embargo, *B. plebeius* está implicada en el metabolismo de polisacáridos de la dieta mientras que *E. fergusonii* es un potencial patógeno que se ha encontrado presente en padecimientos inflamatorios como la cistitis. De acuerdo a los niveles de butirato se llevó a cabo una agrupación de individuos con niveles bajos (menos de 50 mmol/kg) e individuos con niveles altos del metabolito (más de 50 mmol/kg); sin embargo, esto tampoco correlacionó con la presencia de obesidad. Del estudio, no se encontró una correlación directa entre los niveles de butirato con un perfil específico de composición microbiana intestinal ni con la patología, además la diferencia interindividual fue significativa; de este modo se propone realizar más estudios de la acción y el origen de las concentraciones observadas de butirato como de la afiliación filogenética microbiana.

ABSTRACT

The human microbiota is made up of millions of microorganisms that colonize different anatomical regions of the human body, their genes have been associated with host metabolic capabilities that inherently does not own and whose research has focused on the evaluation of role they play on physiological processes, especially those in energy homeostasis and the immune system regulation. It is well known that the microbiota itself affects the individual body composition promoting food energy extraction and suggesting their involvement on the onset of obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome. Specific changes in microbiota composition triggers particular effects of risk or protection for the host, however the mechanisms are not yet clear enough. In the present study fourteen faeces samples from children between 3 and 12 years old and four breast feeding infants was undertaken in order to perform the analysis of the intestinal microbiota composition and butyric acid quantification, metabolite which is produced by bacterial anaerobic fermentation and which is able to use by the colonic epithelial cells as energy source. Butyrate has been considered by its therapeutic effects, including anti-inflammatory activity. To determine the microbial composition was implemented a protocol based on PCR amplification of a region of 16S rRNA gene followed by denaturing gradient fractionation electrophoresis (DGGE) to visualize the microbial diversity in each sample. Five bands which had an increased relative concentration (according to band intensity) of 0.12 μg DNA / μl amplicon was cloned into pJET1.2/blunt vector to obtain sequences and subsequently performs a phylogenetic assignment by contrast in the NCBI database . For quantitative analysis of butyrate was implemented a protocol of solid phase extraction followed by HPLC analysis with a reverse phase column, the samples were processed in a wet weight basis for the extraction and the calibration curve for quantification by external standard was constructed. In this work it was observed that the levels of butyrate and microbial composition based on the presence of bands in DGGE was highly inter-individual variable. There was not obtained a higher similarity index among individuals of the same group (case or control). The sequences obtained from two bands

cloned, both from case group samples, suggest to be related to *B. plebeius* DSM 17135 *cepa* M12 and *E. fergusonii* ATCC 35469, both at a rate of 99% identity and anticipation level of zero. Still unknown if any of these species are involved in the butyrate metabolism, but *B. plebeius* is involved in the metabolism of polysaccharides from diet meanwhile *E. fergusonii* is a potential pathogen that has been found in inflammatory diseases such as cystitis. According to the levels of butyrate samples were grouped in two new groups: low butyrate level individuals (less than 50 mmol / kg) and high butyrate level individuals (over 50 mmol / kg) however, this does not correlate with the presence of obesity. Study found no direct correlation between the levels of butyrate with any specific intestinal microbial composition, also the inter-individual difference was significant, thus proposes further study of the action and the origin of the butyrate concentrations and the microbial phylogenetic affiliation.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial que necesita prevenirse urgentemente. Es un proceso que comúnmente se inicia en edades tempranas y que se establece por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. En su origen, se involucran factores genéticos y ambientales que determinan un trastorno metabólico que conduce a una acumulación excesiva de grasa corporal para el valor normal esperado según el sexo, talla y edad de un individuo (Crocker y Yanovski, 2009; Azcona et al., 2005). La evidencia científica ha demostrado que los individuos que padecen sobrepeso u obesidad exhiben una alta predisposición a patologías como diabetes tipo 2, hipertensión arterial, apnea del sueño y desórdenes del sistema inmunológico, entre otras (Achor et al., 2007).

Los procesos fisiológicos que regulan la composición corporal y el metabolismo conforman un sistema complejo determinado por elementos como el trasfondo genético y sus interacciones, los factores sociales, culturales, conductuales y ambientales que rodean al individuo (DiBaise et al., 2008) de aquí que el hallazgo de un tratamiento único y eficaz para combatir la obesidad resulte particularmente difícil y que en cambio se opte por implementar estrategias combinadas con un enfoque en la prevención y el diagnóstico temprano, para lo cual es necesario dilucidar los mecanismos involucrados en la etiología de dicha enfermedad.

Los trabajos recientes proponen que el conjunto de microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal humano (microbiota), (Million et al., 2011; Gerritsen et al., 2011; Conterno et al., 2011; Scarpellini et al., 2010; Ruiz et al., 2010; Vrieze et al., 2010; Santacruz et al., 2009; Reinhardt et al., 2009) su genoma (microbioma)(Gill et al., 2006) y los productos de su metabolismo (metaboloma)(Blaut y Clavel, 2007; Topping y Clifton, 2001; Lewis y Heaton, 1997) desencadenan algún efecto (bien de protección o de riesgo) sobre la salud del hospedero y que esto depende de la abundancia y la riqueza de géneros

presentes. Se ha sugerido que algún tipo particular de microbiota intestinal modifica la adquisición y regulación energética del anfitrión contribuyendo de manera positiva o negativa al desarrollo de la obesidad (Blaut y Clavel, 2007; Turnbaugh et al., 2006; Sanz et al., 2008; Cani y Delzenne, 2009; DiBaise et al., 2008).

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son producto de la fermentación anaerobia realizada por algunas especies bacterianas en el tracto gastrointestinal y a los cuales se les ha atribuido un efecto anti-inflamatorio (Topping y Clifton, 2001; Al-Lahham et al., 2010; Hamer et al., 2010), han sido utilizados tradicionalmente como terapia en enfermedades como la colitis, la úlcera colítica (Dicksved, 2008; Breuer et al., 1997; van Vliet et al., 2010; Neish, 2009) y la puchitis (Renom et al., 2001) y aunque sus mecanismos no han sido completamente dilucidados, uno de ellos apunta hacia la inhibición del factor NFκB (Segain et al., 2000).

De esta manera, se cree que los AGCC podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades como la obesidad, la cual se caracteriza por ser un proceso inflamatorio crónico de bajo grado; de aquí que en épocas recientes el interés en el estudio de la microbiota y sus productos, sus efectos y asociaciones se haya incrementado de manera importante (Bozon, 1991; Cook y Sellin, 1998; Samuel et al., 2008).

1.1. GENERALIDADES

1.1.1. Epidemiología de la obesidad infantil.

La obesidad es una de las problemáticas de salud pública más serias del siglo XXI que afecta tanto a los países desarrollados como aquellos en transición económica, particularmente en las zonas urbanas. La organización mundial de la salud (OMS) reportó que para 2010 el número de niños con sobrepeso en edad escolar se estimó sobre los 42 millones y que las causas principales eran el cambio general en el estilo de vida por esquemas de alimentación poco nutritivos y baja actividad física([OMS], 2010).

La prevalencia mundial del sobrepeso y la obesidad de niños en edad preescolar se incrementó de 4.2% (intervalo de confianza de 95%, 3.2-5.2%) en 1990 hasta 6.7% en 2010 y con esta tendencia, la proyección calculada fue de 9.1% (intervalo de confianza 95%, 7.3%-10.9%) o aproximadamente 60 millones de niños para 2020 (Gupta et al., 2012).

Según lo reportado por 450 encuestas representativas de estudios seccionales-cruzados realizados en 144 países en vías de desarrollo se estimó que 17.5 millones de niños en edad preescolar ya padecían sobrepeso en estos países en 1995 y que 60% de los casos se concentraban en los países asiáticos mientras que en Latinoamérica se reportó únicamente el 4.4% (de Onis et al., 2010).

Por otro lado, la prevalencia mundial promedio de la obesidad y del sobrepeso en estos mismos países para niños y adolescentes entre 5 y 19 años correspondía a un 10% donde el menor índice correspondió a Pakistán con 5.7% y el mayor a México, con una prevalencia de hasta 40%. Los países en vías de desarrollo que exhibieron los valores más elevados de prevalencia fueron Brasil (22.1%), India (36.9%), Argentina (35%) y México donde en 2004 se encontró una prevalencia de 41.8% (Moraes et al., 2006).

A pesar de que la desnutrición infantil permanece siendo una problemática principal en estos países en desarrollo, algunos de ellos comienzan a resentir ya también los efectos de la obesidad y sus comorbilidades asociadas; por ello, el enfoque de promover el crecimiento y desarrollo infantil adecuado debe ser una prioridad para los sistemas de salud.

1.1.2. Relevancia del estudio y prevención de la obesidad pediátrica en México

En México, el 35% de la población adulta, 40% de los adolescentes y 30% de la población infantil padecen sobrepeso u obesidad (prevalencia combinada) de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud del 2006, ubicando a México en el primer lugar a escala

mundial de prevalencia en población con exceso de peso(Olaiz-Fernández et al., 2006); adicionalmente, la ENSANUT 2006 reportó que el incremento de dicha prevalencia correspondía con el género siendo más alarmante en los niños varones (77%) que en las niñas (47%).

Para 2010, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) reportó un estado de alarma crítico al observarse un incremento en la prevalencia de obesidad y sobrepeso de niños en edad escolar a una razón de 1.1% anual. Asimismo, señaló que la diabetes tipo 2 (la complicación más importante de la obesidad) figuró como la causa principal de muerte en México y que en datos económicos costaba al estado cerca de 80 mil millones de pesos aunado al impacto sobre la economía familiar y el sufrimiento humano que trae consigo (Osorio, 2010; INSP, 2010).

La principal estrategia que el gobierno mexicano estableció en base a un acuerdo entre la Secretaria de Educación Pública (SEP) y la Secretaría de Salud (SSA) fue implementar el Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria: estrategia contra el sobrepeso y la obesidad (SSA, 2010), un documento en el que se identifican los objetivos para este fin y que propone los lineamientos generales para el expendio o distribución de alimentos y bebidas en los establecimientos de consumo escolar y que sigue la propuesta principal de la OMS que dicta: “Para proteger la salud de los escolares, la escuela debe promover una alimentación sana, así como la actividad física. Se alienta a los gobiernos a que limiten la disponibilidad de productos con alto contenido de sal, azúcar y grasas (ambiente obesogénico).”

Así, también se implementó el programa CAMBIO (Canada-Mexico Battling Childhood Obesity, por sus siglas en inglés) un grupo internacional multidisciplinario en el que se investiga y monitorea la obesidad pediátrica en México promoviendo una cooperación e intercambio de conocimiento entre las instituciones educativas, el gobierno

y otras organizaciones no gubernamentales dentro de un contexto de transición nutricional, actividad física y promoción de comunidades saludables (Shah et al., 2010).

Los niños que padecen sobrepeso u obesidad probablemente la desarrollaran durante su vida adulta y estarán aún más propensos a padecer sus comorbilidades asociadas (diabetes tipo 2, alteraciones metabólicas y complicaciones cardiovasculares) a una edad más temprana, de aquí la relevancia de su estudio y prevención ([OMS], 2010).

1.2. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS

1.2.1. Etiología

La obesidad es un trastorno multifactorial en cuya etiopatogenia están implicados factores genéticos, metabólicos, psicosociales y ambientales tal que para desarrollar esta enfermedad es necesario el efecto combinado de predisposición la genética a dicho trastorno y la exposición a condiciones ambientales adversas (Achor et al., 2007).

Se han reportado más de 300 locus génicos involucrados en la regulación del peso corporal y de los cuales se cree que la selección natural favoreció polimorfismos que conllevaron al incremento en la ingesta y el almacenamiento calórico independientemente de la disponibilidad de alimentos (Crocker y Yanovski, 2009). Diversas hipótesis explican esta situación basándose en teorías evolutivas donde una capacidad aumentada de almacenar energía como tejido adiposo incrementa la habilidad humana de sobrevivir en periodos largos de ayuno; sin embargo, se asume que el gasto energético actual diario es mucho menor que en épocas pasadas y esto empeora particularmente en un ambiente 'obesogénico'. Asimismo, esta teoría sustentaría la idea de que cualquier proceso que otorgue una ventaja metabólica para almacenar u obtener energía podría ser una causa potencial de obesidad en el individuo.

La obesidad es una enfermedad extremadamente compleja y diversos factores han sido reportados para explicar la causa de los desórdenes que trae consigo, entre los que afectan directamente la ganancia de peso corporal en niños se incluyen:

- 1) Desórdenes endócrinos clásicos como el hipotiroidismo, las deficiencias en la hormona de crecimiento, el síndrome de Cushing y los insulinomas;
- 2) Desórdenes estructurales del hipotálamo involucrados con la producción de neuropéptidos asociados al control del apetito;
- 3) Alteración en genes involucrados en las vías de señalización de la leptina, en la producción de pro-opiomelanocortina, en los receptores a melanocortina, en el factor neurotrófico BDNF (acrónimo en inglés) y la osteodistrofia de Albright;
- 4) Variaciones alélicas en genes que afectan el balance energético como FTO y PPAR- γ o en los genes que codifican a los receptores β -adrenérgicos y a las perilipinas;
- 5) Síndromes Prader Willi, Bardet Biedl y Alstrom y
- 6) Obesidad adquirida por uso de medicamentos, por infección con adenovirus AD36 o por diversos mecanismos epigenéticos; así como los factores ambientales y conductuales de cada individuo (Crocker y Yanovski, 2009).

Investigaciones más profundas de cada uno de estos factores se realiza con la finalidad de comprender mejor el origen de la enfermedad y de este modo, encontrar métodos más efectivos para su prevención y tratamiento.

Debido a lo anterior, un campo emergente atractivo es el estudio de las bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal (la microbiota), las cuales han sido asociadas tanto con efectos protectores como de riesgo pues se encuentran en un sitio anatómico metabólicamente muy activo comprobándose que la misma flora o bien sus productos ejercen algún efecto o función sobre el metabolismo del individuo; un ejemplo claro de ello son los estudios más clásicos en inmunología de mucosas que confirman la activación de los componentes del sistema inmunológico asociado a la riqueza y la diversidad de la

flora bacteriana presente en el tracto gastrointestinal (Santacruz et al., 2009; Sanz et al., 2008; Bäckhed, 2009).

1.2.2. Diagnóstico de la obesidad infantil

Los criterios para asegurar el diagnóstico de obesidad infantil han sido sujetos a debate e investigación, los métodos actuales implican la toma invasiva de muestras para el análisis sérico de parámetros nutricionales, la evaluación somatométrica y el seguimiento exhaustivo.

Debido al efecto de crecimiento, el valor de IMC de un niño es representativo sólo cuando se lo relaciona con el género y la edad, observándose que la prevalencia de las comorbilidades asociadas a la obesidad aumenta con el valor de este índice. Mundialmente es aceptado el uso de los estándares de crecimiento publicados por la OMS o bien las cartas de crecimiento proporcionadas por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC por sus siglas en inglés, 2002) como referencia para diagnosticar el riesgo de obesidad y con ello poder aconsejar la implementación y el tipo de intervención necesaria para su tratamiento (Weiss et al., 2004).

De acuerdo a las cartas del CDC se define con sobrepeso a aquellos niños entre 2 y 20 años de edad cuyo IMC los ubica entre los percentiles 85 – 94avo de la carta que corresponde a su género, mientras que se considera que padecen obesidad a aquellos que se ubican por encima del percentil 94avo ([CDC], 2002).

Por otro lado, la serie de estándares de crecimiento proporcionados por la OMS para infantes recién nacidos a 5 años y el modelo para niños de 5 a 18 años consiste en definir al IMC con respecto a la edad como un valor o score Z. De acuerdo a ello, el sobrepeso se define como un valor Z entre 1 y 2 unidades mientras que la obesidad es definida como Z mayor o igual a 2. La OMS también realizó un gran esfuerzo al

proporcionar el software Who Anthro[®] que auxilia en el cálculo de este índice a partir de las variables nutricionales y somatométricas del infante.

1.2.3. Métodos terapéuticos

El desarrollo de un enfoque terapéutico exitoso para el tratamiento de la obesidad en niños y adolescentes aún representa un reto, las opciones básicas incluyen cambios en el estilo de vida a largo plazo, en especial la implementación de dietas personalizadas y programas de promoción para la actividad física.

Sin embargo, según el estudio CATCH (Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health, por su acrónimo en inglés) realizado en Estados Unidos (Weigel et al., 2008) y en el cual se dio seguimiento a un grupo control (sin tratamiento) y a otro sometido a programas de educación familiar, actividad física y alimentación saludable, reveló un incremento en el IMC en ambos grupos independientemente del efecto de etnicidad, sugiriendo que las alteraciones en los sistemas de regulación o bien la existencia de mecanismos inexplorados que conducen al establecimiento de obesidad en un individuo siguen activamente funcionales a pesar de la implementación del tratamiento básico.

Es importante remarcar que los programas de prevención siempre han mostrado ser más efectivos que el tratamiento de la adiposidad y se propone que una intervención preventiva personalizada y específica para cohortes pequeñas y homogéneas pudiese ser más exitosa.

1.2.4. Terapia farmacológica

Actualmente, sólo existe un fármaco para el tratamiento de la obesidad disponible en el mercado, Orlistat (Xenical) que reduce la absorción intestinal de grasa a través de la inhibición de la lipasa pancreática, mientras que la Sibutramina (Reductil) que era un anoréctico o supresor del apetito fue retirado recientemente; sin embargo, ambos

presentan una variedad de efectos secundarios adversos que incluyen el incremento de la presión sanguínea, boca seca, constipación, dolor de cabeza e insomnio y no son recomendados para su uso pediátrico.

Existe una serie de fármacos bajo estudio clínico que exhiben diversos mecanismos de acción: los que actúan de manera central (radafaxine y oleoil-estrona), los que tienen como blanco terapéutico el bloqueo de las señales periféricas de saciedad (lorcaserin), los que bloquean la absorción de grasa (cetilistat y AOD9604) e incluso se investiga el uso de fragmentos de la hormona de crecimiento humana; no obstante, todos ellos constituyen una serie de compuestos químicamente complejos, que aún exhiben costos elevados y con efectos adversos potencialmente peligrosos (Yun, 2010), de aquí que la propuesta principal para el tratamiento farmacológico de la obesidad sea el uso de productos naturales que muestren efectividad y seguridad al paciente.

1.3. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL

La metagenómica combina las técnicas de biología molecular y genética para caracterizar la diversidad microbiológica (definida aquí como la riqueza y la abundancia) de muestras ambientales o de origen biológico, resultando una herramienta poderosa en la caracterización del contenido genético de comunidades bacterianas ubicadas en diferentes sitios anatómicos del cuerpo humano, la microbiota.

El tracto gastrointestinal (GI) se encuentra habitado por una densa microbiota simbiótica muy diversa cuya composición es el resultado de una co-adaptación evolutiva hospedero-microorganismos y donde una estrecha integración crea una señalización cruzada intensa a niveles celulares y metabólicos (Ktsoyan et al., 2011).

Se sabe que la microbiota intestinal posee una actividad metabólica importante en la extracción de energía de compuestos que no son digeribles por el hospedero con la subsecuente producción de nutrientes como aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta

(AGCC) y las vitaminas K, B12 y ácido fólico (Gerritsen et al., 2011; Hamer et al., 2008; Wong et al., 2006). La microbiota intestinal también está involucrada en mecanismos de defensa contra patógenos como la resistencia a la colonización y la producción de compuestos antimicrobianos además de colaborar en el desarrollo, maduración y mantenimiento de las funciones sensoriales y motrices de la barrera intestinal y la respuesta mucosal inmune (Barbara et al., 2005; Cerf-Bensussan y Gaboriau-Routhiau, 2010; O'Hara y Shanahan, 2006). Un incremento en las publicaciones acerca de las funciones de la microbiota dan sustento a la relación que existe entre esta y la salud del hospedero (Gerritsen et al., 2011).

Trabajos iniciales utilizando análisis microbiológicos basados en cultivo revelaron que en el tracto GI había presentes más de 400 especies bacterianas; sin embargo, hoy en día y gracias al uso de técnicas de biología molecular se sabe que el número de especies asciende a más de 1000 y de las cuales, al menos 160 especies diferentes colonizan en promedio el intestino de un sólo individuo; asimismo, la abundancia relativa de estas especies varía de 12 a 2200 veces de manera interindividual, lo cual se cree que depende del fenotipo del hospedero (Qin et al., 2010).

En cuanto a la diversidad de especies, se ha demostrado que la mayoría de las bacterias intestinales pertenecen a dos *phyla*: *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Mariat et al., 2009). El primero de ellos se constituye de 3 clases principales, la clase *Bacteroidetes* es la más importante de ellas ya que incluye a los géneros *Bacteroides* y *Prevotella* que han sido ampliamente estudiados y que han sido asociados con diversas patologías.

Por otra parte, el *phyla* de los *Firmicutes* que es probablemente el más rico en abundancia de especies por contener a más de 200 géneros incluye a dos grupos principales *Clostridium coccoides* (también conocido como cluster XIVa) y *Clostridium leptum* (ó bien cluster IV) dentro de los cuales se encuentran los géneros *Clostridium*, *Eubacterium* y *Ruminococcus*, todos estos relevantes para nuestro estudio pues dentro de

ellos se clasifica a la mayoría de las especies productoras de butirato (butirogénicas) como las relacionadas con *Faecalibacterium prausnitzii* (*Butyricoccus pullicaecorum*, *A. butyraticus* y *A. caccae*) que comprenden entre el 5 y 15% de la microbiota total y las relacionadas con *Eubacterium rectale* y *Roseburia* que en conjunto abarcan entre 5 y 10% (Guilloteau et al., 2010).

Por gramo de contenido intestinal, la densidad microbiana se incrementa de 10^1 a 10^4 en estómago y duodeno, 10^4 a 10^8 en el yeyuno y el íleon hasta 10^{10} a 10^{12} UFC en colon y heces. Esta diversidad microbiana contribuye con una amplia gama de funciones que dependen de los genes que expresan y los cuales superan en número hasta 150 veces a los propios del individuo, por lo que se requieren investigaciones profundas para dilucidar la funcionalidad metabólica que estos exhiben, el estudio del microbioma y su metaboloma. Un trabajo interesante fue el que demostró la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos en la microbiota fecal humana (Booijink et al., 2007).

Debido a la presión selectiva ejercida por las características fisicoquímicas en cada zona anatómica, las especies bacterianas se encuentran regionalizadas, así los patrones de expresión de sus genes se encuentran distribuidos de manera diferencial y con ello, las funciones que realizan, de aquí que no sólo baste con saber cuáles o cuántas especies están presentes, sino también se requiere evaluar el sitio en el que están presentes y qué funciones desempeñan. Qin reportó que cerca del 40% de las especies microbianas presentes en cada individuo se encontraron compartidas en al menos la mitad de los participantes de su estudio introduciendo la definición de microbiota central o 'core' (Qin et al., 2010).

1.3.1. Microbiota intestinal y su relación con la obesidad

El tipo y número de microorganismos que conforman la microbiota intestinal resulta de la combinación de factores tales como el grado de inflamación, la dieta, la

genética del individuo y los factores ambientales, de este modo, el hospedero puede influenciar directamente la composición de su microbiota, ambos han co-evolucionado. Debido a que el hospedero depende de su microbiota en varios procesos vitales, se considera que esta última impacta directamente la salud humana. Algunos estudios intensivos han relacionado una disbiosis de la microbiota intestinal con padecimientos como la enfermedad de la inflamación del intestino (IBD) y el síndrome de intestino irritable (IBS)(Bibiloni et al., 2006).

La microbiota es relativamente estable a través del tiempo, sin embargo durante la infancia y la vejez se ha observado que ocurren cambios drásticos en su composición. Aun permanecen poco claros los factores que influyen sobre la diversidad y la colonización microbiana en la infancia pero los disturbios en su desarrollo se asocian a la presencia de enfermedades a largo plazo; varios autores reportan haber encontrado una asociación entre una disbiosis en la microbiota y la presencia de obesidad, enfermedades atópicas y alergias en niños (Kalliomaki et al., 2008; Kalliomaki et al., 2001; Collado et al., 2007; Penders et al., 2006; Sjogren et al., 2009; Wang et al., 2005).

Un estudio pionero que relacionó la composición de la microbiota con la obesidad fue el realizado en 2005 por el grupo de Ley, quienes reportaron un cambio en la abundancia relativa de los dos grupos bacterianos que dominan el intestino, los *Bacteroidetes* y los *Firmicutes* (Ley et al., 2005).

Utilizando un modelo de obesidad en roedores observaron que en contraste con sus contrapartes delgadas, su proporción de *Bacteroidetes* se hallaba disminuida y la de *Firmicutes* incrementada. Posteriormente, este mismo grupo realizó estudios comparativos con respecto a la microbiota de individuos delgados y obesos donde confirmaron dicha observación (Ley et al., 2006) y sugirieron que esta variación propiciaba un incremento en la extracción calórica de la dieta; sin embargo, muchos grupos no han podido reproducir los resultados de Ley (Duncan et al., 2008; Nadal et al., 2009; Schwartz

et al., 2010b; Zhang et al., 2009) e incluso reportan que la proporción es inversa (mayor de *Bacteroidetes* y menor *Firmicutes*) generando una gran controversia. Alternativamente, Turnbaugh reportó que la disbiosis no se debía a un cambio a nivel de *phyla* sino más bien a una reducción en la diversidad total microbiana en individuos obesos en comparación con los delgados (Turnbaugh et al., 2009).

El grupo de Bäckhed observó que al trasplantar la microbiota de un ratón producido en medio convencional a un ratón libre de microbiota (germ-free), este último ganaba peso en masa grasa y que la ausencia de microbiota lo protegía de desarrollar obesidad a pesar de mantener una dieta altamente energética, sin embargo, esto también producía alteraciones en la función del sistema inmune del roedor (Bäckhed et al., 2004).

Posteriormente, Turnbaugh trasplantó la microbiota de un ratón delgado a un germ-free y observó que de igual manera ganaba peso pero en menor grado que el trasplantado con la microbiota de un ratón obeso evidenciando la existencia de una regulación energética mediada por un tipo particular de microbiota. Más tarde, este mismo grupo encontró que la microbiota asociada a un fenotipo de obesidad exhibía una capacidad incrementada en la extracción energética de la dieta (Turnbaugh et al., 2006).

Se explicó que los componentes de la dieta como carbohidratos complejos, proteínas y los demás compuestos que escapan a la digestión, pueden ser sustratos potenciales para las bacterias del colon y que su conversión bacteriana lleva a la formación de metabolitos que funcionalmente actúan como sustratos energéticos o que participan de las vías de señalización implicadas en la homeostasis energética del hospedero (Blaut y Clavel, 2007) un ejemplo muy claro de ello es la actividad de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) cuya síntesis se debe a la fermentación anaerobia bacteriana.

Se ha comprobado que la influencia de la dieta sobre la composición de la microbiota es independiente de la predisposición genética a la obesidad y que la

administración de polisacáridos complejos (fibra dietética) pueden modificarla sustancialmente y por ende, también a la producción de AGCC (Hildebrandt et al., 2009; Murphy et al., 2010). El uso de prebióticos, probióticos, simbióticos y antibióticos como métodos de modulación de la microbiota y sus metabolitos aún se sigue explorando otorgando datos importantes en el campo.

1.3.2. Naturaleza y función fisiológica de los AGCC

La producción diaria de AGCC en el intestino fundamentalmente de acetato, propionato y butirato ha sido estimada en el intervalo de 70-100 mM (Cook y Sellin, 1998); la producción de AGCC resulta relevante pues estos exhiben funciones importantes en algunos tejidos; por ejemplo, las células epiteliales del colon obtienen hasta un 70% de su energía por la β -oxidación del butirato aprovechándola en sus procesos de crecimiento, regulación y diferenciación (Roediger, 1980a).

Por su parte, el acetato y el propionato generados en el lumen intestinal pueden llegar a la circulación sistémica y al hígado a través de la vena porta, donde el acetato contribuye a la síntesis de lípidos y colesterol por activación de la 2-S-acetilCoA sintetasa citosólica. En modelos animales, se ha observado que el propionato puede inhibir la síntesis lipídica del acetato e incluso se considera que una sobreproducción de propionato vía la fermentación anaerobia bacteriana se asocia con la reducción de niveles séricos y hepáticos de colesterol en ratas (Sanz et al., 2008). Aunque la administración de dosis elevadas de acetato en los hepatocitos de rata también pueden inducir a la AMP cinasa y/o reducir la expresión de SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein) para la inhibición de la lipogénesis, aun se requieren estudios en humanos para verificar su influencia positiva o negativa sobre el metabolismo lipídico (Sanz et al., 2008).

Se ha sugerido que de estos tres ácidos grasos, el butirato está relacionado con una alta actividad metabólica local ya que no se detectan concentraciones elevadas en sangre, en el tracto GI puede actuar de manera directa o indirecta en el desarrollo y

reparación de tejidos, está implicado en sistemas hormono-neuro-inmunológicos y también se asocia con una regulación a la baja de la virulencia bacteriana (Guilloteau et al., 2010). Es un metabolito generalmente visto como saludable por sus efectos antiinflamatorios y su contribución a la diferenciación de células que producen el péptido parecido al glucagón (GLP-1) involucrado en los mecanismos de saciedad (Hamer et al., 2009; Delzenne et al., 2007).

En el colon abundan bacterias sacarolíticas y proteolíticas productoras de AGCC, CO₂, CH₄, H₂, fenoles y aminas. Los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos resistentes a la acción de las enzimas hidrolíticas del tracto GI superior pueden llegar al colon, donde por acción de enzimas secretadas o que están asociadas a la membrana bacteriana son despolimerizados a sus monómeros (azúcares) constituyentes y entonces pueden ser fermentados. Durante la oxidación del sustrato por la vía fermentativa, la energía es ganada en forma de ATP y hay una transferencia de los equivalentes reductores resultantes a intermediarios metabólicos que favorecen la formación de productos reducidos como el butirato, este actúa como un aceptor terminal de electrones en un ambiente limitado de O₂.

Existen dos vías distintas para la producción de butirato intracelular en bacterias. En la primera, el butiril-CoA es convertido a butirato por las enzimas fosfotransbutirilasa y butirato cinasa a través de la formación del intermediario butiril-fosfato. En la segunda vía, la enzima butiril-CoA:acetato-CoA transferasa está involucrada en la transferencia de la mitad del butiril-CoA a un acetato externo llevando a la formación de acetyl-CoA y butirato; esta última ruta de transferencia de CoA ha mostrado ser más dominante en la microbiota humana (Duncan et al., 2002).

Se han adjudicado diversas funciones al butirato, por ejemplo, se propone que disminuye el riesgo de cáncer de colon por su habilidad al inhibir la actividad genotóxica de las nitrosamidas y del peróxido de hidrógeno en células de colon humano (Wollowski

et al., 2001) además de inducir la apoptosis en líneas celulares de tumores de colon en una vía independiente de p53 (Hague et al., 1993).

Inicialmente, se consideró que un incremento en el butirato desempeñaba un papel importante en la etiología de la inflamación crónica de la mucosa intestinal característica de la colitis ulcerativa (UC, por su acrónimo en inglés) dado que las células epiteliales del colon de pacientes que padecían esta enfermedad mostraban una capacidad reducida para oxidar los AGCC (Roediger, 1980b; Roediger, 1980c); sin embargo, trabajos más actuales mostraron que esta reducción es revertida durante la remisión, sugiriendo que la mucosa no es intrínsecamente alterada en dicha capacidad y se descartó como factor etiopatogénico en la UC (Den Hond et al., 1998), en cambio, el uso terapéutico de butirato en este tipo de padecimientos mejoró macroscópica e histológicamente los signos de inflamación (Breuer et al., 1997).

Es concebible que de manera fisiológica, el butirato actúe al menos parcialmente vía su efecto en los mediadores de inflamación disminuyendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias como los factores de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y TNF- β) y las Interleucinas 6 y 1 β (IL-6, IL-1 β) por inhibición de la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) (Segain et al., 2000) como se reportó en las células mononucleares y los macrófagos de la *lamina propria mucosæ* de pacientes con enfermedad de Crohn y UC donde disminuyó de manera significativa la actividad de la enfermedad (Luhrs et al., 2002b; Luhrs et al., 2002a).

1.4. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA Y SUS METABOLITOS.

Se ha presentado evidencia de que la microbiota y sus productos afectan la salud de un individuo, particularmente, la investigación de la ecología microbiana del intestino humano ha mostrado a la modulación de la microbiota o sus metabolitos como un recurso útil en el tratamiento de padecimientos como la UC, la colitis y la obesidad (DiBaise et al., 2008).

La microflora intestinal humana es una comunidad bacteriana compleja en la que predominan especies anaerobias obligadas confinadas principalmente al tracto GI inferior (intestino delgado distal e intestino grueso), inicialmente todo el conocimiento sobre estos grupos bacterianos derivó de estudios basados en las técnicas tradicionales de cultivo, microscopia y determinación de sus capacidades fermentativas o bioquímicas; sin embargo, cerca del 60% de la cuenta microbiana no podía ser cultivada, problema que pudo resolverse gracias al uso de técnicas analíticas basadas en el estudio del DNA (métodos moleculares) para las que un blanco usual dentro del cromosoma bacteriano es el gen que codifica la subunidad pequeña del ribosoma 30S, el gen 16S rRNA (Tannock, 2002a; Tannock, 2002b).

Carl Woese (Olsen et al., 1985) reveló que la secuencia de la subunidad 16S del rRNA bacteriano contenía regiones de nucleótidos altamente conservados y que estas se encontraban intercaladas entre regiones hipervariables conocidas como regiones V que contenían las firmas de grupos filogenéticos e incluso de algunas especies, a partir de entonces el análisis de las secuencias de 16S rRNA ya sean parciales o completas (1550 pares de bases en promedio) fue fundamental en los estudios taxonómicos ya que la secuencia de las regiones conservativas puede ser usada como diana en el diseño de oligonucleótidos iniciadores (primers).

Una combinación de técnicas para el análisis de comunidades microbianas se han desarrollado; gran parte involucran la preparación inicial de copias completas o fragmentos de las regiones variables del gen 16S rRNA por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su acrónimo en inglés), lo que resulta en una mezcla compleja de los genes correspondientes a los microorganismos presentes en la comunidad y para cuyo análisis se han utilizado técnicas como la electroforesis con gradiente químico o de temperatura (DGGE y TGGE respectivamente), la técnica de hibridación fluorescente

in situ (FISH), hibridizaciones DNA-RNA, PCR cuantitativa (qPCR) y el análisis de polimorfismos en fragmentos de restricción (T-RFLP por sus siglas en inglés).

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) es una técnica molecular de fingerprinting en la que se separan productos de PCR obtenidos del DNA de muestras ambientales y que representa a los microorganismos dominantes. Dado que todos los productos de PCR tienen una longitud similar en pares de bases (pb), una electroforesis convencional resulta en una sola banda que no es ampliamente descriptiva, esta limitante puede resolverse mediante DGGE al separar los amplicones basándose en las diferencias en su secuencia de nucleótidos (Muyzer et al., 1993; Bibiloni et al., 2005).

Durante la electroforesis, los amplicones encuentran concentraciones incrementadas de agentes químicos desnaturizantes (urea y formamida) al migrar a través de un gel de poliacrilamida, cuando el fragmento de dsDNA alcanza la concentración desnaturizante en que sus dominios de fusión (melting domains) son más débiles, la doble cadena comienza a desnaturizarse y el tiempo de migración disminuye dramáticamente.

Las diferencias en la secuencia de nucleótidos del DNA produce una desnaturización diferencial que resulta en la visualización de un patrón de bandas que puede interpretarse como la representación de las diferentes especies bacterianas dentro de una comunidad. Muyzer y su grupo describieron que la unión de una pinza rica en guaninas y citocinas (GC's) en el extremo 5' de alguno de los primers previene la desnaturización completa de los fragmentos de DNA haciendo más eficiente el fraccionamiento del patrón de bandas (Muyzer y Smalla, 1998).

El análisis de clusters (conglomerados o grupos) es una técnica de análisis exploratorio de datos para resolver problemas de clasificación que consiste en ordenar objetos (organismos, características, datos, variables, etc.) en grupos de forma que el

grado de asociación/similitud entre miembros del mismo grupo sea más fuerte que el grado de asociación con miembros de diferentes grupos. Cada grupo se describe como la clase a la que sus miembros pertenecen (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967).

El análisis de grupos permite descubrir asociaciones y estructuras en los datos que no son evidentes *a priori* y que pueden ser útiles para describir un fenómeno; por ejemplo, la definición formal de un esquema de clasificación taxonómica para un conjunto de organismos, modelos estadísticos para describir poblaciones o la asignación de individuos a clases de diagnóstico o identificación. Dado que el patrón de bandas obtenido por DGGE representa la comunidad de bacterias propia de un ambiente (o para nuestro interés de un individuo o grupo de individuos) se puede comparar dicha composición por un análisis de conglomerados.

Existen dos tipos fundamentales de métodos de ordenamiento para la clasificación en conglomerados: jerárquicos y no jerárquicos; en el primero, la clasificación resultante tiene un número creciente de clases anidadas mientras que en el segundo esto no sucede. Asimismo, se les puede dividir en métodos aglomerativos si se parte de tantas clases como objetos deban clasificarse obteniendo menos clases de objetos similares en pasos sucesivos de ordenamiento o métodos divisivos si se parte de una única clase formada por todos los objetos y que finalmente se divide en clases diferentes. Todos estos datos de ordenamiento pueden representarse gráficamente mediante un dendograma.

Un dendograma es entonces una representación en forma de árbol que resume el proceso de agrupación de un análisis de clusters. Los objetos similares se conectan mediante enlaces más cortos y su posición en el dendograma (definida por el espacio euclideo dimensional) está determinada por el nivel de similitud/disimilitud entre los objetos calculado en base a un índice de similitud.

Es necesario resaltar, que los distintos algoritmos matemáticos utilizados en el cálculo de las distancias o similitudes entre clusters producen distintas clasificaciones, por lo que no existe una clasificación correcta única y por tanto, su elección depende en gran medida del grado de aproximación que se requiera. Para el caso particular de un patrón de bandas se han agrupado estos índices en dos grupos: los que calculan la similitud basados en curvas densitométricas (correlación de Pearson, coeficiente de cosenos, etc.) y los basados en presencia/ausencia de bandas (índice de Jaccard, coeficientes de Dice, Jeffrey y Ochiai).

El número de variables consideradas para la clasificación de los datos en el análisis de clusters definirá una adaptación al algoritmo seleccionado para la generación de la matriz de distancias conforme a la cual se agruparán los datos en cuanto a cercanía. La elección de los algoritmos para medir las distancias entre conglomerados es generalmente muy subjetiva y depende en gran medida de lo mejor que refleje los propósitos de cada estudio particular.

Una vez obtenida la matriz de similitud (o de distancias) se lleva a cabo la generación del dendograma. Entre los métodos más utilizados se encuentran el método de la media o UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic averages según su acrónimo en inglés) donde la distancia entre los grupos se calcula como la distancia media entre pares de observaciones, una de cada grupo, el método del vecino más próximo (neighbor joining) que representa a la distancia entre dos grupos como el mínimo de las distancias entre dos objetos de conglomerados diferentes y el método de Ward o de varianza mínima en el que la distancia de dos conglomerados se minimiza en base a la matriz de similitud por el ANOVA sumado para todas las variables y de acuerdo a la suma de cuadrados entre grupos (Maths, 1998-2010).

Otra manera de dar seguimiento a comunidades microbianas es en base a la aplicación de diversos índices; estos pueden describir cambios en una comunidad

biológica en términos de **diversidad** si corresponde a la heterogeneidad de especies microbianas presentes o **abundancia** si se observa incremento o disminución de una especie en la comunidad. Cuando no se cuenta con información sobre especies, existen índices que describen en términos de **riqueza** el número de microorganismos diferentes en una comunidad desde un estado inicial a un estado final y puede referirse como diferencia o similitud (Zárate, 2005).

En la tabla 1 se resumen las expresiones matemáticas para el cálculo de los índices de similitud y divergencia para el seguimiento de comunidades microbianas.

Tabla 1. Expresiones matemáticas para el cálculo de los índices de similitud y divergencia.

Tipo de índice	Coficiente	Expresión matemática	Variables
Similitud	Dice	$S_D = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B}$	N_A = Número de bandas en perfil A N_B = Número de bandas en perfil B N_{AB} = Número común de bandas entre los dos perfiles (A y B)
	Jaccard	$S_J = \frac{N_{AB}}{N_A + N_B - N_{AB}}$	
	Jeffrey	$S_X = \frac{1}{2} \left(\frac{N_{AB}}{N_A} + \frac{N_{AB}}{N_B} \right)$	
	Ochiar	$S_D = \frac{N_{AB}}{\sqrt{N_A N_B}}$	
Divergencia	Discreto de Poggi*	$\Delta_{Poggi} = \frac{a + b}{n}$	a =Número de bandas carril i ausentes en j b = Número de bandas carril j ausentes en i n = Total de bandas en j e i

*(Poggi-Varaldo et al., 2005)

1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AGCC

Entre los métodos más habituales para la cuantificación de AGCC se encuentra el uso de la cromatografía. Debido a la volatilidad que exhiben estos compuestos, se ha preferido el uso de la cromatografía de gases (GC) para su análisis (Fernandes et al., 2000; Prieto et al., 2007); sin embargo, la necesidad de la instalación de los gases de arrastre e

ignición, una columna especial para ácidos grasos, un detector adecuado y la conversión o metilación de los ácido a analizar todos estos procesos determinantes para la exactitud y precisión del análisis hacen que el método sea menos accesible en algunos los laboratorios (Shu-Hui y Yen-Jun, 2002).

La expansión en el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a diversas áreas ha permitido su implementación en el análisis de un sin fin de compuestos, inicialmente su uso para el análisis de ácidos grasos se propuso por la preparación de compuestos análogos generados por derivatización, sin embargo, un punto clave es la elección del método de extracción de la matriz biológica en la que se encuentran embebido (Breuer et al., 1997; Falony et al., 2006; Schwiertz et al., 2010b; Schäfer, 1994; Su et al., 2004; Zoran et al., 1997).

Existen diversos métodos reportados para la extracción de AGCC de una muestra biológica, en especial de especímenes fecales; sin embargo, la mayoría de ellos incluye el uso de solventes orgánicos altamente peligrosos como el éter etílico (compuesto altamente neurotóxico) cuya manipulación además es compleja dadas sus características fisicoquímicas. Una alternativa es el empleo de las metodologías de extracción que permitan una eficiencia de recuperación elevada y seguridad en su manejo, un ejemplo de ello es la extracción en fase sólida (EFS) (Berrueta et al., 1995).

La EFS es una técnica simple y potente para la purificación de compuestos que resulta rápida y económica. La columna de extracción consta de un lecho adsorbente de partículas gruesas dentro de un tubo desechable que permite la pre-concentración de la muestra con riesgo mínimo de pérdida o contaminación. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes son eluidos por una serie de lavados.

La EFS se realiza principalmente por el seguimiento de 5 pasos:

1. Activación, en esta se utiliza un solvente orgánico para humectar la fase.
2. Acondicionamiento, la fase sólida se acondiciona con el mismo solvente de la matriz de la muestra lo que permite alinear la fase estacionaria lejos de la superficie de sílice permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria.
3. Retención, las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente; estas interacciones pueden regularse por el caudal de carga.
4. Limpieza, se usa un solvente o serie de solventes para eliminar los contaminantes adsorbidos, al hacerlo esto dejar únicamente al analito lo cual reduce las interferencias en el análisis instrumental.
5. Elución, esta se efectúa utilizando un eluyente adecuado con un caudal bajo, lo cual es determinado por las interacciones entre el analito y el adsorbente.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

2.1. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una epidemia creciente a nivel mundial que de manera particular ha despertado la preocupación de los países en vías de desarrollo que además han lidiado históricamente con elevados índices de desnutrición en su población (Bartosch et al., 2005). En México, el índice de prevalencia combinada de obesidad y sobrepeso rebasa el 50% y se ha observado un incremento mundial alarmante para estos valores en la población infantil.

La obesidad comprende un factor de riesgo importante en padecimientos como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, apnea del sueño, desordenes inmunológicos y una variedad de cánceres complicando un sin número de preocupaciones psicosociales (elevando costos sociales y económicos) que abruman cada vez más a los sistemas de salud ya sobresaturados.

La evidencia sugiere que las bacterias que residen en el tracto gastrointestinal humano (microbiota intestinal) afectan a la adquisición y la regulación energética de un individuo y que la composición de dicha microbiota difiere de manera particular entre individuos obesos y delgados (Segain et al., 2000).

Se considera que los metabolitos producidos por la microbiota intestinal, en particular los AGCC como el butirato desempeñan un papel importante en la regulación del peso y el contenido de masa grasa en algunos individuos; sin embargo, dichas hipótesis no se han confirmado para la población infantil en México. Así también, la necesidad de nuevas herramientas para el diagnóstico y manejo temprano de la obesidad hacen del estudio de la microbiota intestinal y sus metabolitos una alternativa novedosa.

2.2. HIPÓTESIS

En niños obesos mexicanos, los niveles de butirato son bajos y están asociados a la presencia de especies particulares de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

2.3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre los niveles de butirato y la composición de la microbiota en niños obesos contrastando con aquella presente en niños eutróficos.

2.4. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Establecer los métodos analíticos para determinar la composición de la microbiota y la cuantificación de butirato en muestras de copro.
- b) Analizar los niveles de butirato y determinar la composición microbiana en muestras de copro de niños obesos (casos) y niños eutróficos (controles).
- c) Determinar la existencia de una relación entre los niveles de ácido butírico y la composición de la microbiota en niños obesos y eutróficos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BUTIRATO Y LA COMPOSICIÓN MICROBIANA

3.1.1. Elección del método de análisis del butirato en las heces

Para la elección del método de extracción y análisis de butirato, se ensayaron diversos métodos reportados en la literatura, la mayoría de ellos consistieron en la dispersión de la muestra biológica en una fase acuosa seguido de la extracción con solventes orgánicos (en particular éter etílico), un proceso de evaporación y la posterior reconstitución en la fase móvil seleccionada para el análisis cromatográfico (Zoran et al., 1997; Lewis y Heaton, 1997; Spiller et al., 1980; Chen y Lifschitz, 1989; Ruckle et al., 2009; Díaz et al., 2007). El ensayo de estos métodos de extracción se realizó tanto de una solución stock de butirato de concentración conocida como de una muestra biológica con estándar añadido (también de concentración conocida).

Los extractos de ácido butírico obtenidos fueron inyectados tanto en un sistema cromatográfico de gases (Varian 3700) que estuvo implementado con una columna OV17 (no específica para ácidos grasos), como en un sistema de cromatografía líquida por HPLC (Agilent 1120) implementado con una columna empacada con fase reversa C18.

3.1.1.1. Condicionamiento del cartucho para la extracción en fase sólida

Se colocó un cartucho (Altech) empacado con fase reversa C18 con capacidad de 1 ml en la cámara de vacío, se adicionó 1 ml de etanol al 100% y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto para activar el cartucho. Se hizo pasar el etanol a través del cartucho a una velocidad de flujo aproximada de 1 ml/min utilizando vacío. Posterior al lavado con etanol, se adicionó 1 ml de agua miliQ al cartucho y se dejó reposar a temperatura ambiente nuevamente durante 1 minuto. Se dejó pasar el agua a

través del cartucho a la velocidad volumétrica de 1 ml/min utilizando vacío. En este momento, el cartucho está activado para llevar a cabo la extracción.

3.1.1.2. Extracción de butirato de la muestra biológica

A una alícuota de 200 mg de muestra húmeda de heces se adicionó 1 ml de agua miliQ y se homogeneizó en vórtex a máxima velocidad durante 2 minutos. La mezcla fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de ensayo y se le adicionaron 100 μ l de HCl 0.1N, la mezcla se homogeneizó en el vórtex durante 1 minuto. Se colocó la solución ácida de la muestra en el cartucho condicionado con la llave cerrada y se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 minuto.

Transcurrido este tiempo y con vacío se dejó pasar todo el líquido a bajo flujo (2 ml/min) a través del cartucho, se recolectó la fracción líquida en un tubo nuevo, esta fracción es etiquetada como NO RETENIDO para su inyección en el cromatógrafo. Se volvió a colocar 1 ml de etanol 100% en el cartucho y se dejó reposar durante 1 minuto. Se hizo pasar el etanol a través del cartucho a bajo flujo (2 ml/min), se recolectó la fracción líquida etiquetada como ELUÍDO para su inyección en el cromatógrafo.

3.1.1.3. Protocolo de análisis del butirato por HPLC de fase reversa

Para establecer la composición de la fase móvil, se tomó como punto de partida la mezcla Acetonitrilo:Metanol:Agua (30:16:54) reportada por Torii para el análisis por HPLC de AGCC que han sido sometidos a derivatización (Torii et al., 2010), posteriormente esta composición se modificó gradualmente con la intención de mejorar la resolución del pico correspondiente al butirato e incrementar el tiempo de retención para evitar el traslape de picos debido a otros compuestos.

Se purgó el sistema cromatográfico haciendo pasar la fase móvil a 5 ml/min durante 5 minutos para evitar la presencia de burbujas de aire. Posteriormente, se

incrementó de manera gradual el flujo de la fase móvil permitiendo que se estabilizara en 1 ml/min y se puso en funcionamiento el detector del equipo (lámpara UV).

Previo a la inyección de las fracciones extraídas de la muestra biológica (fracción no retenida y eluída) se realizó la inyección de 6 estándares de butirato a partir de los cuales se construyó la curva estándar de concentración.

El cromatógrafo Agilent 1120 estuvo equipado con una columna de fase reversa Agilent eclipse plus C18 4.6 x 150 mm, con tamaño de partícula de 5 µm utilizando como fase móvil acetonitrilo (J. T. Baker grado HPLC) al 90% previamente desgasificado y se permitió que la lectura en cada corrida durara aproximadamente 10 minutos. El tiempo de retención para el butirato en las muestras fue corregido por la curva estándar elaborada con los estándares de ácido butírico inyectados previamente.

Los cromatogramas fueron generados en el programa EZ Chrom Elite provisto con el equipo (Agilent®), la interpretación de los mismos se llevó a cabo considerando la altura, el valor de la intensidad y el área bajo la curva del pico correspondiente al tiempo de retención exhibido por el butirato. El cálculo de la concentración de butirato presente en cada una de las muestras se realizó por sustitución del valor del área bajo la curva (AUC) ó de la altura del pico en la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar (Ecuación No. 1):

$$Y = mX + B \quad [1]$$

Donde; X= concentración de butirato en la muestra

Y= valor del factor de respuesta (AUC o altura de pico)

m= valor de la pendiente de la curva estándar

B= valor de la ordenada al origen de la curva estándar

3.1.1.4. Validación del sistema y del método

La validación del sistema y del método cromatográfico se realizó por inyección de 6 estándares de butirato (Sigma Aldrich, ensayo 99%) por triplicado a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 mM, además de la inyección del estándar adicionado que consistió en una muestra de heces a la que se añadieron las mismas concentraciones de butirato estándar. A partir de los datos anteriores se obtuvo el valor de la linealidad y la precisión del sistema, así como los valores de linealidad, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y selectividad del método de análisis.

3.1.2. Elección del método de extracción del DNA genómico bacteriano

Debido a que la muestra de copro está conformada por productos de desecho que potencialmente inhiben la función de la enzima *Taq* polimerasa, componente principal en la técnica de PCR, se ensayaron diferentes métodos para la extracción de DNA genómico bacteriano con la finalidad de hallar aquel que otorgara el DNA de mejor calidad, rendimiento y pureza.

Las técnicas que se emplearon fueron, la extracción por protocolo de fenol/cloroformo y la extracción por método de columna en la que se pudieron probar los tres kits comerciales siguientes: ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research), PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio) que sirve para la extracción de DNA de muestras de suelo y QIAamp DNA Stool Mini Kit™ (Qiagen).

Para este trabajo, se utilizaron como controles positivos de estandarización el DNA genómico extraído de una cepa de *E. coli* (Top10F') y el DNA bacteriano de muestras de heces de tres adultos sanos que no padecen obesidad (IMC dentro del intervalo de normopeso para cada individuo).

3.1.2.1. Extracción por el protocolo de fenol/cloroformo

Se pesaron dos alícuotas de 50 mg de una muestra de heces húmedas en tubos de propileno de 1.5 ml conteniendo 1 ml de agua desionizada estéril. Se homogenizó en vórtex durante 2 minutos a velocidad máxima. Todos los tubos se procesaron en hielo.

Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 6000 rpm durante 1 minuto a 10°C para clarificar. Se transfirieron entre 500 y 700 µl de sobrenadante (con cuidado de no arrastrar sólidos del fondo) a un tubo de propileno conteniendo 300 mg de perlas de vidrio estériles y 500 µl de buffer de lisis (10 mg/ml Proteinasa K, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS y 50mM NaCl), se mezcló en vórtex a máxima velocidad durante 3 minutos para romper la membrana bacteriana.

Se transfirieron 700 µL de homogenizado a un tubo de propileno, se le adicionaron 700 µL de Fenol estabilizado con Tris-HCl pH 8.0 y se mezcló nuevamente en vórtex a velocidad máxima durante 3 minutos. Se centrifugó a 13200 rpm y 10°C durante 15 minutos. Si se observaba poco sobrenadante se adicionaban 100 µL de agua estéril y se volvía a centrifugar a 13200 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante fue cuidadosamente transferido a un tubo de propileno adicionándole 250 µL de Cloroformo, se homogenizó por inversión del tubo para extraer el fenol residual. Se llevó a centrifugación por 2 minutos a 13200 rpm y 10°C. Se extrajo el sobrenadante y se repitió el lavado con fenol/cloroformo por lo menos dos veces o hasta que el sobrenadante se aclarara de cualquier color. Una vez realizados los lavados, el sobrenadante fue transferido a un tubo de propileno nuevo y se le añadieron 2 volúmenes de alcohol etílico al 70% así como el equivalente a 1/10 del volumen total de sobrenadante de acetato de sodio 3M. Se mezcló por inversión para evitar romper el DNA. Se centrifugó a 13200 rpm durante 30 minutos a 10°C para precipitar la pastilla de DNA.

Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación se decantó el etanol. Se adicionó 1 volumen de etanol al 70% para lavar la pastilla de DNA y se volvió a centrifugar a 10°C durante 5 minutos a 13200 rpm. Se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla por 5 minutos a temperatura ambiente invirtiendo el tubo sobre papel absorbente. A la pastilla de DNA se adicionaron 50 µL de agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C. La integridad del DNA fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.5%.

3.1.2.2. Extracción por el método de columna (kit comercial)

Se llevó a cabo la extracción de DNA bacteriano de dos alícuotas de 200 mg de una muestra fecal de adulto siguiendo el protocolo adjunto al kit de extracción de DNA por columna, para ello se comparó entre tres kits comerciales: ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research), el kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio) que sirve para la extracción de DNA de muestras de suelo y QIAamp DNA Stool Mini Kit™ (Qiagen) que es específico para heces y que elimina los inhibidores de PCR por absorción. Todos los extractos fueron almacenados a -20°C y se analizó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 0.5%.

3.1.3. Evaluación de la integridad del DNA bacteriano por fraccionamiento electroforético

Para comprobar la calidad del DNA extraído se cargaron 2 µl del extracto total con buffer de carga 1X (solución de azul de bromofenol y glicerol 5X) en gel de agarosa al 0.5% teñido con bromuro de etidio (concentración final de 0.5 µg/ml). La electroforesis se realizó en buffer TBE 0.5X con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 45 minutos a 95 V (0.05 A).

El gel se documentó bajo luz ultravioleta en transiluminador con el programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.2 (Kodak Imaging Systems). Se utilizó como marcador de peso molecular Lambda DNA-BstEII Digest (New England).

3.1.4. Cuantificación y pureza del DNA por espectrofotometría UV

Se diluyeron 5 µl de extracto de DNA en 100 µl de agua desionizada (FD= 20), se realizó la lectura de las absorbancias en BioPhotometer (Eppendorf) a 230 nm (Indicador de contaminación por sales), 260 nm (longitud de onda a la cual absorben los ácidos nucleicos), 280 nm (indicador de contaminación por fenol) y 320 nm (indicador de turbidez). Asimismo, se obtuvieron las lecturas de las relaciones $A_{260}/A_{230} > 1.5$ y $A_{260}/A_{280} = 1.7$ a 2.0 como indicadores de la contaminación y de la pureza del extracto respectivamente.

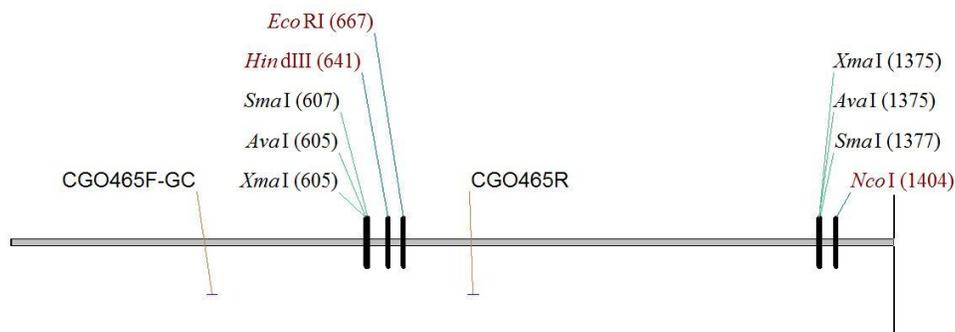
3.1.5. Amplificación de la sección intermedia del gen 16S rRNA bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos (oligos o primers) iniciadores CGO465F (forward o directo) cuya secuencia es CTCCTACGGGAGGCAGCAG y CGO465R (reverse o reverso) cuya secuencia es CTACCAGGGTATCTAATCCTG fueron diseñados con anterioridad por el grupo de trabajo, estos comprenden las regiones hiper-variables V3 y V4 de la sección intermedia del gen 16S rRNA (Neefs et al., 1990) y para cuyo diseño se tomó en cuenta un conjunto de secuencias de 16S rRNA reportadas para una variedad de especies bacterianas en GeneBank (NCBI).

Además, se contó con el oligonucleótido CGO465F-GC que contiene la secuencia del oligonucleótido directo CGO465F unida a una pinza de 40 guaninas y citosinas en el extremo 5' (secuencia de la pinza de GC's: CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG). Este fue utilizado en la obtención de los productos de PCR sometidos a electroforesis desnaturante (DGGE) ya

que según lo reportó Muyzer esta pinza disminuye la velocidad de migración incrementando la eficiencia de resolución de las bandas (Muyzer et al., 1993).

CGO465F y CGO465F-GC se alinean con los nucleótidos 332-350 para el gen de *E. coli* (Fig. 1) mientras que el oligo CGO465R se alinea con los nucleótidos 775-795 del mismo gen para dar un producto de 505 pb incluyendo la pinza.



16S rRNA E coli primers

Figura 1. Unión de los primers CGO465F-GC y CGO465R a la secuencia del gen 16S rRNA de *E. coli*.

Se preparó la mezcla de reacción en un área estéril para un volumen final de 50 μL considerando las concentraciones de los reactivos descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción para amplificar 16S rRNA bacteriano.

Sustancia	[Stock]	[Reacción]	Dilución	μL por Reacción
Agua	pura	La necesaria	Pura	La necesaria
Buffer s/Mg	10 X	1 X	01:10	5
MgCl ₂	25 mM	4 mM	01:25	8
dNTP's	10 mM	0.2 mM	01:50	1
Taq Polimerasa	5 U/ μL	0.025 U/ μL	1 a 200	0.25
CGO465F-GC	10 μM	0.2 μM	01:50	1
CGO465R	10 μM	0.2 μM	01:50	1
DNA	200 ng/uL	100 ng	-	1 – 2
Volumen Final=				50

Se prepararon diluciones de los extractos de DNA de cada muestra (cuando fue necesario) para asegurar la presencia inicial de 100 ng de DNA en cada reacción de PCR. El protocolo de temperaturas para la reacción fue el siguiente:

Tabla 3. Protocolo de temperaturas para amplificación por PCR de fragmentos del gen 16S rRNA con pinza de GC.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	45 s	25 Ciclos
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	10 min	

Una vez completado el protocolo de temperaturas (aproximadamente 2 horas) en el termociclador (Applied BioSystems) se confirmó la amplificación, tamaño y especificidad del producto por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 45 minutos a 100 V (0.05 A), se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y el gel fue documentado. Se utilizó como marcador de peso molecular GeneRuler™ Low Range DNA Ladder 25 a 700 pb (Fermentas) ó GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas).

Por cada una de las muestras se preparó un pool de 10 reacciones de PCR de 50 µl (volumen final de 500 µl) y se cuantificó por espectrofotometría UV para cargar y fijar las condiciones de electroforesis en el gel analítico de DGGE. Posteriormente, se prepararon nuevos lotes de 10 reacciones de las muestras seleccionadas para cargar los geles preparativos de DGGE.

3.1.6. Fraccionamiento electroforético en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) de amplicones obtenidos por PCR

3.1.6.1. Formación del gel de poliacrilamida

Todo el material se limpió con agua y etanol evitando tallar con objetos abrasivos. Se armó el 'sandwich' colocando sobre el cristal más grande y en forma vertical el par de

espaciadores de 1 cm x 1mm de espesor y el cristal pequeño asegurando todo con las pinzas en cada uno de los extremos. Con la tarjeta espaciadora se comprobó la separación y alineamiento correcto de los separadores (las pinzas deben estar correctamente ajustadas para evitar fugas). El sándwich se colocó sobre la esponja y de manera vertical sobre el 'casting stand' asegurando con las llaves a los lados.

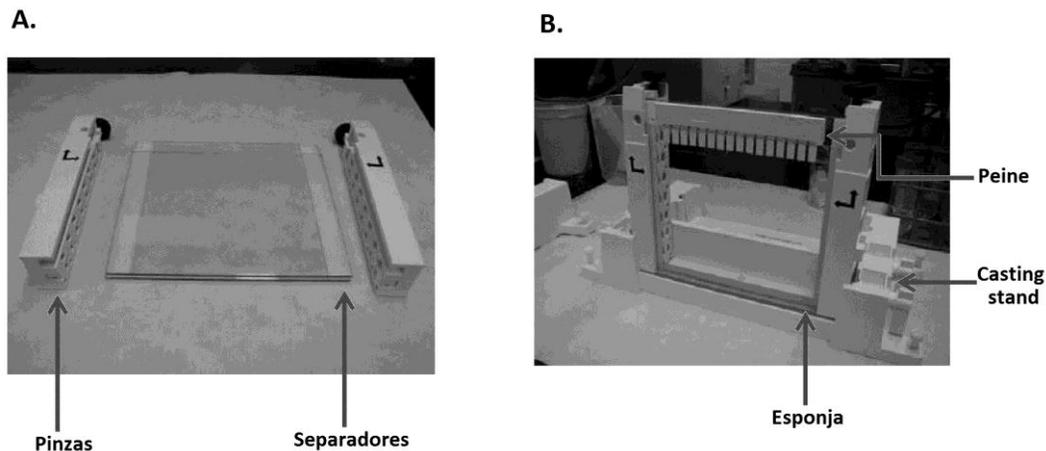


Figura 2. Formación del gel de poliacrilamida. (A) Armado del sándwich, (B) Llenado del gel de poliacrilamida.

Se prepararon 15 ml de la solución de bajo gradiente desnaturizante y 15 ml de la de alto gradiente a partir de un stock de solución desnaturizante al 100% que contiene Bis-Acrilamida 40% (37.5:1, acrilamida:bisacrilamida), Urea 7M y formamida 40%. A las soluciones de bajo y alto gradiente se les adicionó 13.5 μL de TEMED concentrado y 135 μL de Persulfato de amonio al 10% (ambas con una concentración final de 0.09%) como agentes polimerizantes por lo que los pasos siguientes debieron realizarse con absoluta rapidez (5 minutos máximo).

Una vez adicionados los agentes polimerizantes, se colocaron ambas soluciones (bajo y alto gradiente) dentro de una jeringa de 30 ml (una por cada solución) y se montaron sobre la rueda de gradientes ajustada en la marca de 15 ml.

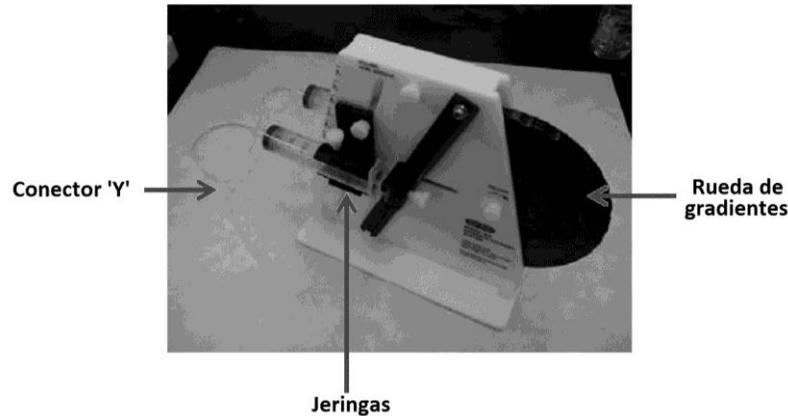


Figura 3. Rueda formadora de gradientes.

En la punta de cada jeringa con el adaptador incluido se colocó 1 trozo de manguera de 15 cm y ambas mangueras se unieron con el conector en forma de 'Y' a otra manguera de 20 cm de longitud, este último llevaba una aguja de jeringa 21G x 32 mm (32 x 8) la cual se introdujo entre los dos cristales del sándwich a la mitad del cristal.

Se formó el gel girando con velocidad constante la rueda para permitir que las soluciones se mezclaran evitando la formación de burbujas. La superficie del gradiente se alineó colocando un poco de TAE 1X y se dejó reposar por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 3 ml de solución 0%, la cual se preparó con los componentes de la solución desnaturante al 100% pero sin urea ni formamida y se colocó el peine para formar los carriles. El gel se dejó polimerizar al menos durante 2 horas.

3.1.6.2. Precalentamiento y preparación del equipo

Se utilizó el sistema DCode Universal Mutation Detection System (Bio Rad®) y se llenó la cámara con 7 litros de buffer TAE 1X (preparado por dilución de TAE 50X: Tris-base 2M, ácido acético 1M, Na-EDTA 0.5 M, pH 7.4) y se inició calentamiento hasta que alcanzó una temperatura de 60°C poniendo a trabajar el sistema de agitación y bombeo para garantizar que el sistema estuviera homogéneo, lo cual tomó aproximadamente 2 horas.

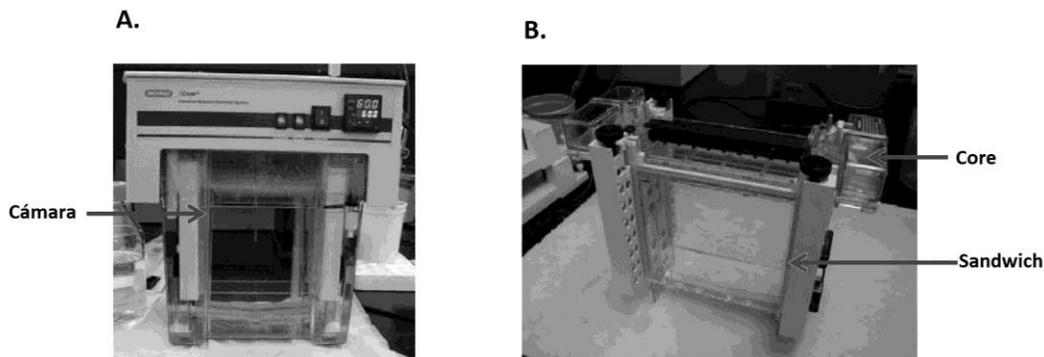


Figura 4. Equipo Dcode. (A) Montaje de la cámara de corrimiento, (B) Ensamble del sándwich y del core.

Una vez polimerizado el gel se retiró el peine y los pozos se lavaron con TAE 1X, el par de 'sandwich' se colocaron en el 'core' el cual se introdujo en la cámara con buffer precalentado y se llenó la cámara superior que se forma con TAE 1X para cerrar el circuito.

3.1.6.3. Preparación de la muestra

Se preparó una mezcla 1:1 (v/v) de amplicón (del pool de producto de PCR de cada muestra) y buffer de carga 2X (70% glicerol, 29.98% TAE 1x el, 0.02% azul de bromofenol), se homogeneizó y se centrifugó brevemente, la mezcla se mantuvo a 4°C hasta ser cargada en el gel.

Una vez que el sistema se mantuvo estable a 60°C, se cargó cada una de las muestras por la parte superior del equipo en los carriles designados utilizando puntas largas. Y se corrió la electroforesis por diferentes tiempos y voltajes hasta establecer las condiciones óptimas.

3.1.6.4. Tinción y documentación de los geles de DGGE

Una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis se sacó con cuidado el gel entre los cristales y se introdujo en un contenedor con 250 ml de la solución de tinción Bromuro de Etidio (10 µg/ml) para los geles analíticos o en solución de Sybr Green (1:10'000) para los geles preparativos. Se realizó la tinción durante 30 min con agitación constante y

posteriormente el gel se destiñó con 250 ml de agua destilada durante 10 min con agitación. El gel fue documentado en un transiluminador de UV utilizando un tiempo de exposición de 6 segundos y se generó el archivo en formato TIFF para ser analizado con el software Gel ComparII versión 6.5 (Applied Maths).

3.1.7. Corrimiento de los geles analíticos de DGGE para establecer las condiciones de fraccionamiento

Debido a que los fragmentos a resolver tuvieron una longitud de 505 pb, la concentración final de poliacrilamida fue de 8% en todos los geles de DGGE. Para confirmar la linealidad del gradiente se tiñó la solución desnaturalizante de concentración alta con solución colorante DCODE (200 μ l por cada 15 ml de solución a teñir, composición descrita anteriormente) y la temperatura de desnaturalización se mantuvo constante a 60°C.

Para establecer las condiciones óptimas del corrimiento de los geles de DGGE inicialmente se utilizó un pool de amplicón preparado de DNA extraído de heces de tres adultos mismos que más adelante se utilizaron como estándares en la normalización de las distancias de migración de las bandas presentes en casos y controles para su análisis en el software GelCompar II. Se partió de las condiciones reportadas por Wang quien utilizó un gradiente lineal desnaturalizante de 40-60% y electroforesis a 80 V durante 15 h para muestras fecales de cerdos pero la electroforesis se realizó durante 16 horas a 60V para evitar el efecto de sonrisa en el gel (Wang et al., 2009).

Posteriormente, el gradiente fue ajustado de manera gradual disminuyendo o aumentando los límites inferior o superior según se observó la mejor resolución de las bandas. Los gradientes ensayados fueron: 20-60%, 30-50%, 35-40%, 35-45%, 35-50% y 40-55%. Asimismo, se ensayaron cantidades entre 5 y 75 μ g de amplicón (DNA) cargado por pozo analítico y se contrastó la purificación de los amplicones por los métodos de

fenol/cloroformo, el método de purificación por columna de productos de PCR (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) y la purificación por corte de una banda en gel preparativo de agarosa seguido de recuperación por columna.

Para el ajuste final del gradiente y las condiciones de electroforesis se cargaron 15 µg de amplicón de las muestras problema por pozo analítico; los fraccionamientos se realizaron a las siguientes condiciones: 38-40% (18h, 60V), 38-43% (20h, 65V), 38-48% (20h, 65V), 38-55% (21h, 65V) y 38-58% (20h, 65V).

3.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE COPRO DE LOS GRUPOS CONTROL Y CASO

3.2.1. Voluntarios

Participaron en el estudio catorce niños entre 3 y 14 años de edad invitados en el Jardín infantil (JIN) del Centro de investigación y estudios avanzados del IPN unidad Zacatenco. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Cinvestav. Todos los padres y tutores firmaron el consentimiento informado, a los cuales se les indicó que cada voluntario debía entregar una muestra de copro y el llenado de dos cuestionarios, uno de consumo nutricional tipo recordatorio de 24 horas y un cuestionario básico de antecedentes familiares e historia clínica personal del niño.

Los datos de somatometría (peso y talla) de cada infante se obtuvieron directamente de la base de datos del consultorio pediátrico del JIN para minimizar el manejo de los infantes. Este conjunto de niños se clasificó dentro de dos grupos: CONTROLES niños eutróficos entre 3 y 14 años cuyo índice de masa corporal (IMC) y edad los ubicó entre el 5to y el 80vo percentil en las cartas de crecimiento del centro de control de enfermedades de Atlanta (CDC) y CASOS aquellos infantes en el mismo intervalo de edad pero cuya caracterización los refiriera como niños obesos o con sobrepeso al ubicarlos sobre el 80vo percentil de las cartas de crecimiento del CDC.

Adicionalmente, se obtuvieron 4 muestras de infantes entre 2 y 14 meses de edad cuyos padres solicitaron se les incluyera en la investigación, este grupo se clasificó como LACTANTES. Para el cálculo de las medidas antropométricas (IMC y percentil) de este conjunto se utilizó el programa de acceso libre Who Anthro v3.2.2 proporcionado en la página de la OMS para el monitoreo del crecimiento y desarrollo de individuos y poblaciones entre 0 y 60 meses de edad, los análisis y resultados para este grupo se muestran al final de cada apartado.

3.2.2. Criterios de inclusión

Para ser incluidos en el estudio, los niños debían ser sanos, menores de 15 años y padecer o no obesidad o sobrepeso según el percentil de su IMC por edad en las cartas de crecimiento del CDC aprobadas por la OMS.

3.2.3. Criterios de exclusión

No se incluyeron en el estudio aquellos niños que sufrieran algún padecimiento crónico inflamatorio, enfermedades debidas a infección o con diagnóstico de trastornos metabólicos, ni aquellos que cursaran con padecimientos del tracto digestivo como diarrea, inflamación del intestino, colitis o úlcera.

Los niños que hubieran sido tratados al menos 2 semanas anteriores al estudio con antibióticos, laxantes, antidiarreicos, antiparasitarios o medicamentos que pudieran modificar la población microbiana propia del individuo, así como niños que estuvieran sometidos a programas dietéticos o físicos de reducción de peso tampoco fueron considerados para el estudio.

3.2.4. Protocolo de recolección de copro

El padre o tutor de cada participante fue el encargado de recolectar la muestra (ninguna persona ajena fue autorizada para realizar dicho procedimiento), a este se le

entregó un paquete que incluyó un frasco estéril con cierre hermético, una bolsa plástica, un abatelenguas y papelería foliada: consentimiento informado del estudio (Anexo 1), cuestionario de antecedentes clínico-familiares (Anexo 2), cuestionario nutricional 24h (Anexo 3), instructivo de recolección de la muestra y una etiqueta (Anexo 4).

Las muestras fueron recibidas el día posterior a la recolección y mantenidas a -20°C hasta su procesamiento. Para su análisis, se obtuvieron 4 alícuotas de 200 mg de muestra húmeda para realizar por duplicado tanto la determinación cromatográfica de butirato como la extracción de DNA genómico para el análisis de la microbiota por técnicas de biología molecular.

3.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA POR PERFILES DE DGGE Y GENERACIÓN DE DENDOGRAMAS

Una vez estandarizadas las condiciones de corrimiento de los geles de DGGE se cargaron dos geles analíticos uno para los casos y otro para los controles con 25 μg de amplicón obtenido de cada una de las muestras, los geles fueron documentados en el transiluminador UV en formato TIFF para su análisis utilizando el software GelCompar II v.6.5 (Applied Maths) para la generación del dendograma y las matrices de similitud e intensidades relativas. Para la normalización de la distancia de migración recorrida se cargó en los extremos amplicón proveniente de la muestra de heces de tres adultos sanos como estándares de migración.

3.4. RECUPERACIÓN DEL DNA (FRAGMENTO DEL GEN 16S rRNA) FRACCIONADO EN GEL DE POLIACRILAMIDA POR EL MÉTODO DE ELECTROELUCIÓN

Se elaboró gel de DGGE preparativo (un solo pozo) con gradiente lineal desnaturalizante de 38-55% como se describió anteriormente, cada uno fue cargado con 300 μg de producto de PCR no purificado (lote completo de 10 reacciones de PCR) de DNA de *E. coli* o bien de las muestras seleccionadas y se realizó la electroforesis. Posteriormente, se tiñó el gel con solución de SybrGreen®. Se colocó el gel bajo luz UV en

un transiluminador y rápidamente se cortaron las bandas seleccionadas con una navaja, cada banda se cortó en pedazos más pequeños y se colocó en un tubo de polipropileno de 1.5 ml. La foto que documenta el corte se muestra en el anexo 8.

La cámara de electroelución se llenó con buffer TBE 1X (45 mM tris-borato y EDTA 1mM) suficiente para cubrir los pozos y se colocaron 200 μ l de solución para electroeluir (acetato de sodio 2.7M con 1 μ l de solución concentrada de azul de bromofenol por cada ml de acetato) en cada conducto posterior evitando la formación de burbujas dentro de la trampa (figura 5).

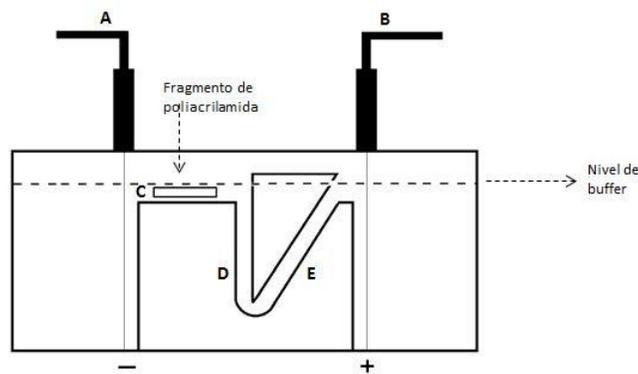


Figura 5. Esquema de una cámara de electroelución. (A) Polo negativo, (B) polo positivo, (C) fragmento de poliacrilamida, (D) Conducto anterior y (E) Conducto posterior.

Cada banda fragmentada se colocó en un pozo del equipo y se conectaron los cables a la fuente de poder y a la cámara asegurando el polo positivo al final de la trampa de acetato. Se permitió la electroelución durante 45 minutos a 100V (0.05A) siguiendo el movimiento del DNA con la lámpara de luz UV portátil.

Se recuperaron 500 μ l de la solución del fondo del conducto anterior y se adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1) homogeneizando la mezcla. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a velocidad máxima y la capa superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo.

El DNA se precipitó adicionando 1 ml de etanol absoluto centrifugando a 11'000 rpm a 4°C durante 30 min. Se decantó el etanol y se lavó la pastilla de DNA con 500 µL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 11'000 rpm a 4°C durante 15 min. Se decantó el etanol del segundo lavado y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente invirtiendo el tubo sobre papel absorbente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 20 µL de agua estéril grado PCR y se cargaron 2 µl en gel de agarosa al 2% para corroborar la presencia de DNA. Se almacenó a -20°C.

3.5. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL FRAGMENTO DE 16S RRNA RECUPERADO POR ELECTROELUCIÓN DE UN GEL PREPARATIVO DE DGGE

Se realizó la reacción de secuenciación por PCR utilizando el kit big dye terminator cycle sequencing v.1.1 para un volumen final de 20 µl. Por cada muestra de DNA se prepararon dos reacciones, cada una con uno de los oligonucleótidos iniciadores (reverso y directo, de este último se utilizó la versión sin pinza de GC's). El mix para secuenciar contiene: dNTPs marcados, *Taq* polimerasa, Buffer y MgCl₂; los componentes de la mezcla total se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción para secuenciar.

Sustancia	[Stock]	[Reacción]	µL por Reacción
Agua	Pura	La necesaria	La necesaria
Buffer de secuenciación	5 X	0.5 X	2
Mix para secuenciar	20 X	1 X	1
CGO465F ó CGO465R	10 µM	0.2 µM	1
DNA	variable	100 ng	1 – 2
Volumen Final=			20 µl

El protocolo de temperaturas para la reacción de secuenciación fue el siguiente:

Tabla 5. Protocolo de temperaturas para la reacción de secuenciación de amplicones recuperados de DGGE.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96°C	1 min	25 Ciclos
Desnaturalización	96°C	10 s	
Alineamiento	50°C	5 s	
Extensión	60°C	4 min	

3.6. PRECIPITACIÓN CON EDTA-ETOH PARA LIMPIAR REACCIONES DE SECUENCIACIÓN

Se centrifugó brevemente la reacción de secuenciación y se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml. Se adicionaron 5 μ l de EDTA (125 mM, pH 8) y 60 μ l de etanol absoluto, después de mezclar se centrifugó nuevamente y se mantuvo por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 20 min a velocidad máxima de 13200 rpm, inmediatamente después se removió el sobrenadante con una pipeta eliminando todo el líquido posible. La pastilla se lavó con 250 μ l de etanol al 70%.

Se centrifugó por 5 minutos a velocidad máxima y se repitió el lavado con etanol al 70% una vez más. Finalmente se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todas las reacciones de secuenciación se procesaron en la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, unidad Zacatenco por el método de electroforesis capilar con el sistema ABI PRISM 310 de Applied Biosystems.

3.7. CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN 16S rRNA EN VECTOR pJET1.2/BLUNT RECUPERADO DE UN GEL DE DGGE POR ELECTROELUCIÓN

Se utilizó el plásmido pJET1.2 para clonar productos de PCR recuperados de un gel preparativo de DGGE que cuenta con un método de selección positiva al recircularizarse, que acepta insertos hasta de 10 kilobases y que contiene un gen de resistencia a ampicilina para la selección de pos-transformantes. A continuación se muestra el mapa del vector (Fig. 6).

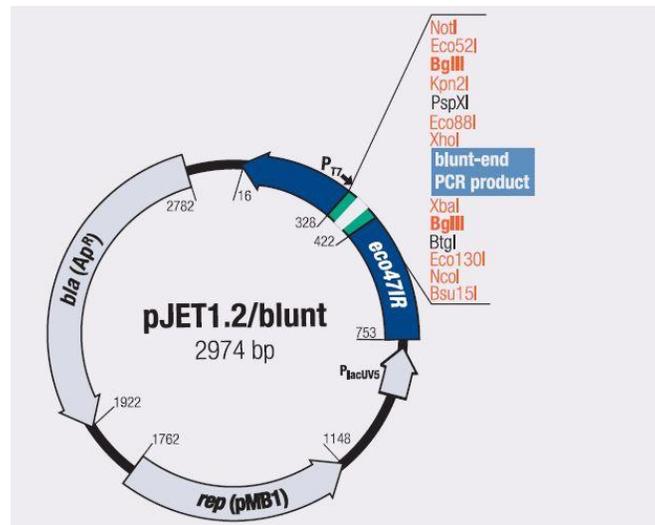


Figura 6. Mapa del vector pJET1.2/blunt.

3.7.1. Preparación de las células competentes

Se tomó una colonia de cultivo joven de *E. coli* Top10F' crecida en medio sólido LB con tetraciclina a 37°C durante toda la noche, con la cual se inocularon 50 ml de medio LB con 125 µl de tetraciclina en un matraz de 250 ml. Se incubó a 37°C con agitación a 120 rpm y se dejó crecer hasta que la densidad óptica (OD) se encontró entre 0.2 y 0.4.

Una vez alcanzado el crecimiento se transfirió el cultivo a un tubo estéril de plástico (tipo falcon) de 50 ml que se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min a 4°C para empastillar las células, se eliminó el medio y se adicionaron 5 ml de CaCl₂ estéril 0.1 N, se homogeneizó y mantuvo en hielo durante 10 minutos. Nuevamente, se centrifugó durante 5 min a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Por último, se resuspendió la pastilla en 1 ml de CaCl₂ estéril y se homogeneizó. Se hicieron alícuotas de 200 µl de células competentes en tubos de propileno de 1.5 ml y se mantuvieron a 4°C durante 30 min.

3.7.2. Ligación

Para el plásmido pJET 1.2/blunt, la proporción de inserto/vector debe ser 3:1 molar por lo que cada reacción de ligación de 20 µl contuvo:

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción de ligación.

Componente	Concentración	Cantidad
Buffer de reacción	2X	10 μ l
Producto de PCR recuperado de gel DGGE (Inserto)	Variable	4 μ l
Agua libre de nucleasas	Pura	4 μ l
pJET 1.2/ blunt cloning vector	50 ng/ μ l	1 μ l
T4 DNA ligase	5 U/ μ l	1 μ l
Volumen total=		20 μ l

La reacción de ligación se mezcló brevemente en vórtex y se centrifugó por 5 segundos para bajar el líquido. Se incubó a temperatura ambiente (22°C) por 15 min y se mantuvo a -20°C hasta ser utilizada directamente en la transformación.

3.7.3. Transformación

Se agregaron los 20 μ l de reacción de ligación a 200 μ l de células competentes y se incubaron por 30 minutos en hielo. Se aplicó shock térmico exactamente por 90 segundos a 42°C y se volvió a incubar en hielo durante 2 minutos para permitir la recuperación. Se adicionaron 800 μ l de LB sin antibiótico precalentado a 37°C y se incubó por 45 minutos a 37°C en agitación.

Se distribuyeron 200 μ l de la mezcla anterior en cajas de medio sólido LB selectivo con doble antibiótico tetraciclina/ampicilina (125/250 μ l, respectivamente) y se dejaron crecer a 37°C durante 16 horas. Se aislaron por el método de estría entre 3 y 6 colonias de cada banda clonada y posteriormente se procedió a la extracción del DNA plasmídico.

3.8. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA

En 5 ml de LB con ampicilina a concentración final de 50 μ g/ml (Stock 10 mg/ml) se inoculó un loop de bacteria transformada aislada y se dejó crecer por 3 horas (OD= 0.3).

Se centrifugó todo el cultivo en un tubo de propileno de 1.5 ml para empastillar y se desechó el sobrenadante. Se le adicionaron 200 µl de Solución I [Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25mM (pH 8.0), EDTA 10mM (pH 8.0)] y se mezcló vigorosamente en vórtex. Se agregaron 400 µl de Solución II [NaOH 0.2 N, SDS 1% preparada en fresco] y se mezcló por inversión 5 veces, se mantuvo brevemente en hielo. Se adicionaron 300 µl de Solución III [60 ml de Acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético glacial, 28.5 ml agua] y se incubó por 5 minutos en hielo.

La mezcla fue centrifugada durante 2 min y posteriormente se transfirieron 600 µl del sobrenadante a un nuevo tubo, se adicionó 1 µl de RNAsa A (10mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se purificó la mezcla adicionando 600 µl de Fenol, se mantuvo a 65°C durante 1 min hasta que la solución se aclaró. Se agregaron 300 µl de cloroformo, se mezcló y centrifugó por 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se le adicionaron 900 µl de etanol absoluto, se mezcló y se centrifugó durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se centrifugó por 15 minutos. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de agua desionizada y se corrió en gel de agarosa al 0.7% para observar la integridad del plásmido, se cuantificó por espectrofotometría UV.

3.8.1. Cálculo de la eficiencia de transformación

Se calculó la eficiencia de transformación de los plásmidos clonados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{5000 \times A}{B} [=] \text{UFC} / \text{mg DNA} \quad [2]$$

Donde;

A= colonias contadas (postransformantes exitosas)

B= cantidad de plásmido adicionado (µg)

5000= constante de ajuste cuando se plaquean 200 µl de células transformadas

3.8.2. Confirmación por PCR de inserto en el plásmido pJET 1.2/blunt

Se realizó PCR confirmatoria para el producto de ligación en el vector pJET1.2, fue necesario hacer una dilución 2:50 para no saturar la reacción con DNA, los componentes de la mezcla de reacción de 20 μ l se describen en la tabla 7 mientras que el protocolo de temperaturas se muestra en la tabla 8.

Tabla 7. Composición de la mezcla de reacción para amplificar 16S rRNA bacteriano.

Sustancia	[Stock]	[Reacción]	Dilución	μ L por Reacción
Agua	pura	La necesaria	--	La necesaria
Buffer s/Mg	10 X	1 X	01:10	2
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	01:25	1.2
dNTP's	10 mM	0.2 mM	01:50	0.4
Taq Polimerasa	5 U/ μ L	0.025 U/ μ L	1 a 200	0.1
pJET1.2F	10 μ M	0.2 μ M	01:50	0.4
pJET1.2R	10 μ M	0.2 μ M	01:50	0.4
DNA plasmídico	variable	100 ng	--	1-2
Volumen Final=				20

Tabla 8. Protocolo de temperaturas para la amplificación por PCR del fragmento de 16S rRNA clonado en pJET1.2/blunt.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	25 Ciclos
Desnaturalización	94°C	30 s	
Alineamiento	60°C	30 s	
Extensión	72°C	45 s	
Extensión final	72°C	10 min	

Una vez completado el protocolo de temperaturas se confirmó la amplificación, tamaño y especificidad del producto por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % durante 45 minutos a 95V (0.05A), se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y se documentó el gel bajo luz ultravioleta. Se utilizó como marcador de peso molecular 1 μ l de GeneRuler™ 100 bp DNA ladder que equivalen a 100 ng de DNA (Fermentas).

3.9. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO DE 16S rRNA CLONADO EN EL VECTOR pJET1.2/BLUNT

Se realizó la reacción de secuenciación por PCR utilizando el kit big dye terminator cycle sequencing v.1.1 para un volumen final de 20 μ l como se describió anteriormente. Por cada muestra de DNA se prepararon dos reacciones, cada una con uno de los oligos iniciadores para pJET1.2/blunt. Para la reacción se requiere que el DNA plasmídico esté puro y libre de RNA. Los componentes de la mezcla y el protocolo de temperaturas para la reacción de secuenciación se describen en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Composición de la mezcla de reacción para secuenciar.

Sustancia	[Stock]	[Reacción]	μ L por Reacción
Agua	pura	La necesaria	La necesaria
Buffer de secuenciación	5 X	0.5 X	2
Mix para secuenciar	20 X	1 X	1
pJET1.2F ó pJET1.2R	10 μ M	0.2 μ M	1
DNA plasmídico	variable	1 μ g	1 – 2
Volumen Final=			20 μ l

Tabla 10. Protocolo de temperaturas para la reacción de la secuenciación de inserto en pJET1.2/blunt.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96°C	1 min	25 Ciclos
Desnaturalización	96°C	10 s	
Alineamiento	50°C	5 s	
Extensión	60°C	4 min	

Se llevó a cabo la precipitación con EDTA-ETOH para al limpieza de las reacciones de secuenciación por el protocolo descrito con anterioridad. Todas las reacciones de secuenciación se procesaron en la unidad de ácidos nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, unidad Zacatenco por el método de electroforesis capilar con el sistema ABI PRISM 310 de Applied Biosystems.

3.10. ANÁLISIS DE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y ASIGNACIÓN DE FILOGENIA

Los electroferogramas obtenidos en el formato AB1 se depuraron con ayuda del programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 de acceso libre. Se llevó a cabo la inspección de las secuencias y un alineamiento local con el programa vector NTI 6 (InforMax, Inc. 1994-2000). Cada secuencia obtenida se comparó con la base de datos del NCBI a través de su herramienta en línea BLAST para ácidos nucleicos en el apartado de 16S rRNA para las bacterias reportadas. Los números de acceso de los organismos con mayor índice de identidad para cada secuencia se adjuntan en el anexo correspondiente. La construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el software de acceso libre Mega 5 por el método de UPGMA (Tamura et al., 2004).

3.11. MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El tratamiento de los datos se realizó por cálculo de los promedios, las desviaciones y los errores estándar; asimismo, se aplicaron las pruebas estadísticas de t- student y t- pareada para la comparación de la diferencia entre los dos grupos principales de estudio (control y caso), donde se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se utilizó el método de correlación de Pearson y un análisis multivariado de componentes principales para establecer las correlaciones entre los datos obtenidos de los niveles de butirato, la composición microbiana y las demás variables cuantificadas en el presente trabajo. Se utilizaron los programas estadísticos Minitab 16 professional v.16.1.0.0 y la paquetería estadística IBM SPSS Statistics v.19.0.0

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección se encuentra dividida en dos apartados principales. El primero de ellos se integra por la elección, la estandarización y las discusiones sobre las técnicas de análisis para la cuantificación del butirato y el seguimiento de la composición microbiana, mientras que el segundo, incluye los resultados obtenidos del análisis de las muestras de copro de los grupos CONTROL y CASO, así como las discusiones a dichos datos y los análisis estadísticos de correlación entre los niveles de butirato y la composición microbiana de dichas muestras.

4.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BUTIRATO Y LA COMPOSICIÓN MICROBIANA.

4.1.1. Elección del método de análisis del butirato en las heces

De los métodos ensayados, se observó que los protocolos de extracción con solventes orgánicos presentaron una recuperación inadecuada que no pudo ser analizable tanto en el equipo de gases como en el de HPLC debió a la co-purificación de otras sustancias extraídas por estos métodos; dado lo anterior, se implementó una técnica de extracción en fase sólida utilizando cartuchos empacados con fase reversa C18 que inicialmente mostró resultados aceptables en la extracción de una solución estándar de butirato.

El análisis por cromatografía de gases fue descartado ya que los cromatogramas presentaron picos saturados con tiempos de retención muy cortos y un intenso ruido de fondo, esto se debió muy probablemente a la interacción de los componentes de la muestra con la columna del equipo ya que esta última no fue específica para ácidos grasos; debido a lo anterior se decidió continuar los análisis con el equipo de HPLC ya que se observó una mejora en la resolución de los picos y en el tiempo de retención que

aunque fue corto también presentó mayor constancia en comparación con el equipo de gases.

4.1.1.1. Extracción de butirato en la muestra biológica

Dado que el primer paso de la extracción consistió en la retención del analito dentro de la fase sólida seguida de un lavado (la fracción no retenida); esta fracción se inyectó en el cromatógrafo y se calculó la merma promedio restando la concentración de esta a la concentración teórica inicial. Debido a que la merma calculada fue del 27% de la cantidad total inyectada de butirato, para el cálculo final de las concentraciones de butirato en las muestras biológicas se sumó el valor de butirato de la fracción no retenida y del eluido final.

4.1.1.2. Validación del sistema y del método

La técnica se estandarizó por extracción repetida de al menos cinco diluciones de concentración conocida de ácido butírico (0.1 a 50 mM) durante tres días diferentes, además de la extracción por triplicado de una mezcla de muestra biológica con estándar añadido a concentración conocida, con estos datos se construyeron las curvas estándar (ejemplo en la Fig. 7) en las que se graficaron los valores de los factores de respuesta altura o intensidad de pico y el área bajo la curva (AUC) contra la concentración teórica de los estándares. Se mostró que la linealidad del método de análisis para el estándar fue buena con un factor de correlación $R^2 > 0.998$. La repetibilidad se conservó y el error relativo dado por la ecuación 3 fue menor al 2%.

$$\text{Error relativo} = \frac{\text{error absoluto}}{\text{concentración teórica}} \quad [3]$$

$$\text{error absoluto} = \frac{\text{concentración calculada}}{\text{concentración teórica}} \quad [4]$$

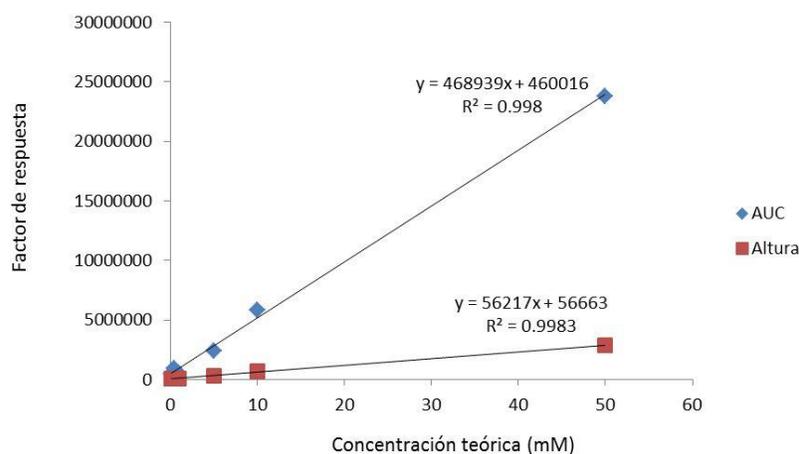


Figura 7. Curva patrón de estándares de butirato para la cuantificación de AGCC.

4.1.2. Elección del método de extracción del DNA genómico bacteriano

Se ensayaron diferentes técnicas para la extracción del DNA genómico bacteriano de muestras de copro con la finalidad de obtener extractos de mayor calidad para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con el método tradicional de fenol/cloroformo se obtuvo un rendimiento elevado y la calidad del DNA extraído fue aceptable; sin embargo, algunos extractos mostraron interferencia en las lecturas de espectrofotometría UV sugiriendo contaminación con trazas de fenol. Al fraccionar los extractos en gel de agarosa se observó presencia importante de RNA y degradación de DNA en algunas muestras.

Con los kits de Zymo Research y MoBio se presentaron una serie de dificultades técnicas debidas a la naturaleza de la muestra de copro y el diseño de los kits; por ejemplo, con el kit ZR (Zymo Research) la saturación constante de las columnas evitó las filtraciones consecutivas requeridas en el protocolo observándose baja eficiencia de recuperación, se sugiere que esto se debió a una baja interacción entre el material de soporte de la columna y el DNA. Asimismo, con el kit MoBio se obtuvo una eficiencia de recuperación aún menor aunque la calidad fue aceptable, por lo cual ambos kits fueron descartados.

A continuación se muestra la tabla comparativa de los valores de pureza y concentración del DNA extraído de una muestra fecal de adulto con cada uno de los métodos.

Tabla 11. Pureza y concentración del DNA genómico bacteriano extraído por diferentes métodos de una muestra fecal.

Método	Pureza	Error estándar	Concentración (ng/μL)	Error estándar
Kit ZymoResearch	1.35	0.15	19.68	4.70
Kit MoBio	1.71	0.28	11.37	4.81
Kit QIAamp	1.97	0	73.29	21.99
Fenol/Cloroformo	1.77	0.07	311.35	51.08

Para la extracción del DNA de las muestras problema se seleccionó el kit QIAamp de Qiagen ya que fue el método que otorgó el mejor índice de pureza ($A_{260}/A_{280} = 1.97$) y un rendimiento aceptable; además de que el fraccionamiento de los extractos en gel de agarosa mostró poca degradación del DNA y estuvo libre de RNA.

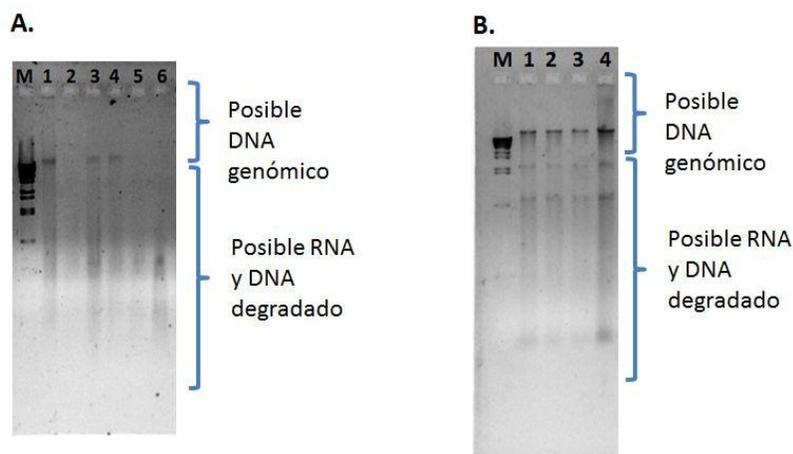


Figura 8. Integridad de los extractos de DNA obtenidos por diferentes técnicas. (M) Marcador de peso molecular λ . DNA extraído con el kit MoBio (A1-2), DNA extraído con el kit QIAamp (A3-4), DNA extraído con el kit ZymoResearch (A5-6), DNA extraído por el método fenol/cloroformo (B1-4).

Todos los extractos fueron sometidos a amplificación por PCR, de aquellos obtenidos por los métodos de fenol, el kit ZR y MoBio la amplificación fue variable probablemente debido al bajo rendimiento y la presencia de contaminantes o inhibidores; por otro lado, con el kit QiaAmp se confirmó la calidad del DNA al observarse

amplificación de todos o la mayoría de los extractos así como especificidad al obtener un producto único del peso esperado.

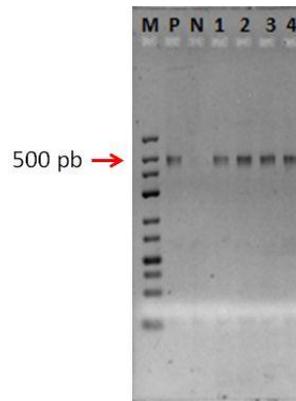


Figura 9. Amplificación de los extractos de DNA de muestras fecales con el kit QiaAmp. (M) marcador de peso molecular, (P) DNA *E. coli* control positivo, (N) control negativo, Amplificación 16S rRNA heces de adulto (1 - 2) , Amplificación 16S rRNA heces de niño (3 - 4).

El segundo mejor protocolo de extracción fue el método de fenol/cloroformo con mayor rendimiento que el método de columna y con un índice de pureza aceptable de 1.77; debido a la falta de columnas, sólo tres muestras (una del grupo control y dos de lactantes) fueron procesadas por este método asegurándose la calidad e integridad del DNA obtenido por electroforesis en agarosa, cuantificación UV y amplificación por PCR.

4.2. FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE) DE AMPLICONES OBTENIDOS POR PCR.

Las condiciones iniciales se ensayaron con amplicones de 16S rRNA obtenidos de muestras de heces de adultos sanos, no se obtuvo un buen fraccionamiento con el gradiente desnaturalizante inicial de 40-60% (Wang et al., 2009) ni tampoco la intensidad en las bandas fue suficiente para su análisis al cargar 5 µg de DNA (Fig. 10).

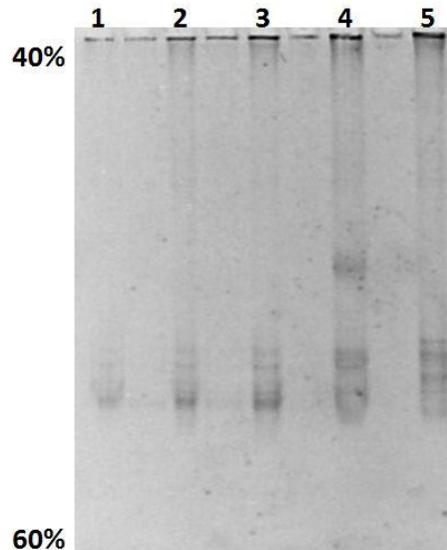


Figura 10. Fraccionamiento DGGE de amplicón de 16S rRNA proveniente de heces de 3 adultos sanos. (1-3 corresponden a la misma muestra), el gradiente desnaturalizante se indica en el extremo izquierdo.

Posteriormente se ensayaron diferentes gradientes lineales de desnaturalización para cerrar el rango en el que el fraccionamiento fuera mejor. Los gradientes fueron 15-60%, 20-60%, 30-50%, 35-45% y 35-40%, se ilustran un par de estos ensayos en la figura 11, en la que se observa que un gradiente inadecuado muestra menor número de bandas a pesar de tratarse de la misma muestra (11B con respecto a 11A).

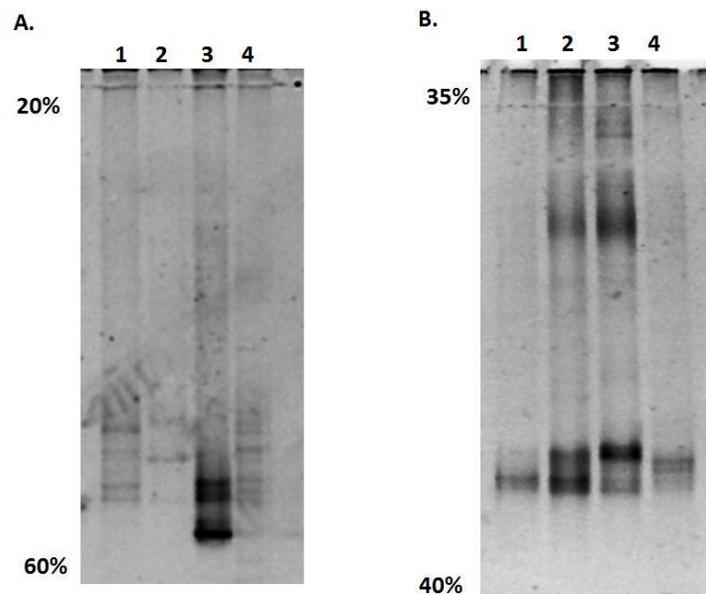


Figura 11. Ajuste del intervalo de gradiente desnaturalizante para estandarización de fraccionamiento DGGE. (A) 20 μ g de amplicón de tres muestras de heces de adulto (1-3) y de un infante (4), (B) Fraccionamiento de 20 μ g de amplicón de las mismas muestras.

De todos ellos se observó que el mejor fraccionamiento se obtuvo en los intervalos correspondientes a una concentración desnaturalizante entre 40 y 50%. Asimismo, se ensayó la cantidad necesaria para observar una intensidad de banda aceptable que permitiera su análisis cargando cantidades entre 1 y 75 μg de DNA (figura 12).

Para los geles analíticos se observó que una carga entre 15 y 25 μg de DNA fue suficiente para el análisis de las bandas fraccionadas. La carga utilizada de DNA en adelante fue de 20 μg de DNA por carril de gel analítico de DGGE.

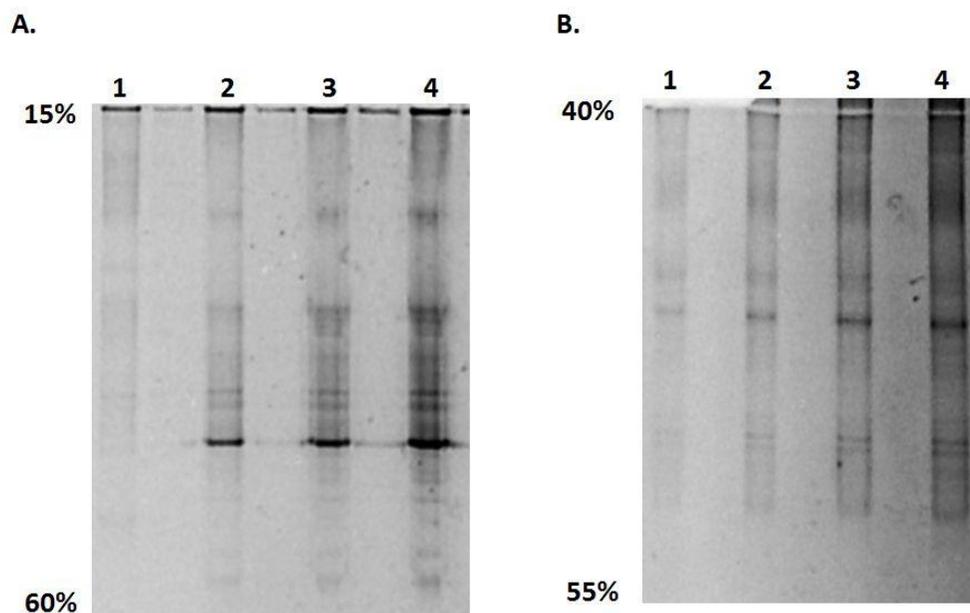


Figura 12. Ajuste de la cantidad de amplicón (DNA) de una muestra de adulto. (A) Carga de 1, 5, 25 y 75 μg DNA (1-4), (B) Carga de 12, 18, 24 y 30 μg DNA (1-4).

Dada la presencia de sombras de fondo que interferían al evaluar la presencia o ausencia de bandas en el software, se ensayó si la purificación de los amplicones mejoraba la resolución de las bandas. Los métodos ensayados de purificación fueron fenol/cloroformo, precipitación con acetato, método de columna y recuperación de la banda en gel preparativo de agarosa-columna; sin embargo, de este ensayo no se observó un cambio significativo en el fraccionamiento de las bandas por lo que la purificación de los amplicones no se consideró necesaria (figura 13).

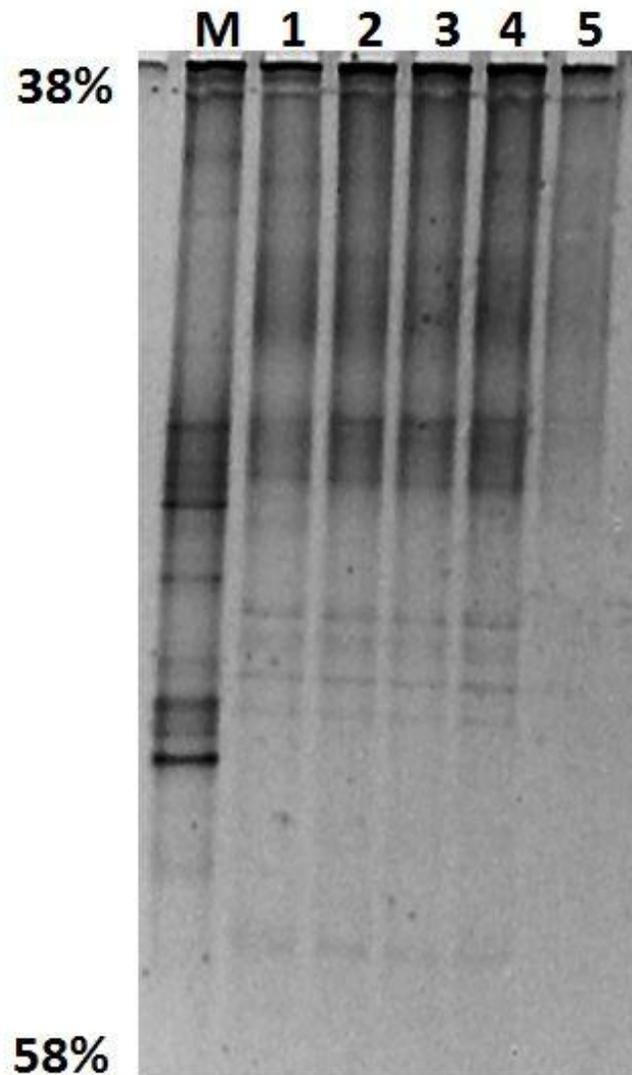


Figura 13. Fraccionamiento DGGE de productos de PCR purificados. (M) Estándar de migración, Amplicón no purificado (1), Purificado por fenol/cloroformo (2), Precipitación con acetato (3), purificación por columna (4) y Preparativo agarosa-columna (5). Las condiciones de la electroforesis fueron 20h a 65V (0.03A).

De los lotes de amplificación obtenidos por PCR de todas las muestras, se cargaron una serie de geles de DGGE con los gradientes 38-40%, 38-43%, 38-48%, 38-55%, 38-58% y 38-60% (ejemplos en la figura 14A-C) para realizar un ajuste final más fino del fraccionamiento de las bandas y de aquí se determinó que la concentración del gradiente desnaturizante óptimo para el fraccionamiento de amplicones provenientes de las especies bacterianas presentes en heces de niños fue 38-55%.

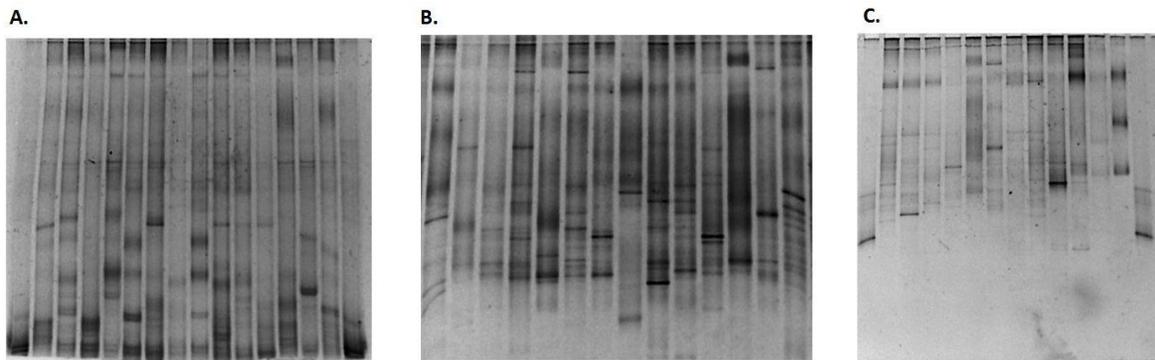


Figura 14. Ajuste final de condiciones de electroforesis (DGGE) para las muestras problema. (A) Gradiente 38-43%, (B) Gradiente desnaturizante de 38 - 55% y (C) Gradiente 38 a 60%. Los geles A - C fueron cargados con 20 μg de amplicón de las muestras problema.

De la figura 14 en A no se observó una buena separación de las bandas en la concentración desnaturizante alta (43%), las bandas no fraccionaron adecuadamente (difusas) e incluso algunas salieron del gel. En la figura B se observa que el fraccionamiento es aceptable, la intensidad de las bandas es bueno para el análisis y aunque en el gradiente cercano a 55% sólo se observan pocas bandas resueltas al incrementar el tiempo de electroforesis por 2 horas no se incrementó el número de estas, lo que sugirió la disminución en la velocidad de migración (cercana a cero) en este gradiente para la mayoría de los amplicones.

En la figura 14C se observó que la velocidad de migración cercana a cero se alcanzó demasiado pronto (aproximadamente a un gradiente de 52%) y que al inspeccionar minuciosamente algunas de las bandas más intensas se conformaban por otras bandas que no lograron separarse completamente debido al gradiente tan concentrado que les impidió migrar. De aquí que las condiciones estándar para el corrimiento de geles analíticos de DGGE de amplicones obtenidos de las muestras fueron: gradiente lineal desnaturizante de 38 a 55% (urea/ formamida), electroforesis por 20 horas a 65V (0.03A) y carga de 20 μg de DNA por carril.

4.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE COPRO DE LOS GRUPOS CONTROL Y CASO

4.3.1. Voluntarios

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Cinvestav (Anexo 5). De los participantes (n= 14) se obtuvo el percentil de su IMC y se comparó con las cartas de crecimiento de la CDC por edad y género. Cuatro varones y dos niñas (n= 6) fueron clasificados dentro del grupo de CASOS mientras que cinco varones y tres niñas (n= 8) correspondieron al grupo CONTROL.

Para el grupo de LACTANTES (n= 4, todos de género masculino) se obtuvo un Z score menor a 1 en cada individuo considerándose que se encontraban dentro del normopeso para su edad.

4.3.2. Antecedentes familiares

Se evaluó la presencia o ausencia de casos diagnosticados de sobrepeso u obesidad, diabetes, trastornos cardiovasculares, cáncer y otros padecimientos relacionados en familiares de hasta la tercera línea generacional (hermanos, padres o abuelos) como una estimación relativa del factor de riesgo al desarrollo de obesidad por trasfondo genético (Anexo 2). Se preguntó si algún familiar exhibía alguno de los padecimientos y por cada respuesta positiva se asignó un valor de 1 unidad, la suma total de respuestas positivas se normalizó a un equivalente porcentual.

Para el grupo CONTROL se obtuvo un 20% de respuestas positivas mientras que para el grupo de CASOS se obtuvo 17%; ambos valores se compararon por prueba de t-student cuyo valor de 0.77 (F= 0.79, p>0.05) indicó que no existía diferencia significativa entre los grupos. Se sugiere que el trasfondo genético debido a antecedentes familiares no indica tendencia en la predisposición a la enfermedad en ninguno de los grupos bajo estudio, sin embargo, la evaluación por cuestionario no es una prueba definitiva y debería hacerse una evaluación más profunda si se requiere establecer una asociación.

Sólo el 10% de las respuestas fueron positivas para el grupo de LACTANTES, siendo que un valor de respuestas positivas más cercano a 100 indicaría prevalencia mayor a las enfermedades asociadas con obesidad dentro de la familia en relación a un individuo particular, se sugiere que los tres grupos no exhiben una probabilidad alta a desarrollar la enfermedad por antecedentes familiares al mostrar un índice bajo con esta prueba.

4.3.3. Análisis de recordatorio 24h

Se evaluó la ingesta calórica de cada individuo a lo largo del día utilizando el recordatorio 24 horas, un tipo de cuestionario de consumo que es representativo de la dieta habitual. Del análisis porcentual de aportación calórica por tipo de nutrimento se obtuvieron los valores de la tabla 12.

Tabla 12. Aportación calórica porcentual diaria por grupo.

Grupo	Carbohidratos (40-60%)*	SD	Lípidos (30-45%)*	SD	Proteínas (7-15%)*	SD	Consumo calórico diario (Kcal)	SD
Controles	55.5	14.5	26.9	12.2	16.7	4.2	1720	351.1
Casos	55.8	16.0	27.7	13.9	15.9	4.1	1250	263.7
Lactantes	59.8	16.6	21.5	13.6	18.5	4.4	1166	401.7

* Rango porcentual de aporte energético diario recomendado por nutrimento a la dieta.

En la tabla anterior se remarcan los valores porcentuales recomendados que cada nutrimento debe cubrir como parte de la dieta, se observa que únicamente el consumo de proteínas sobrepasa el intervalo recomendado, mientras que un consumo menor de lípidos es reportado por los tres grupos. El valor mayor de consumo calórico diario calculado fue el mostrado por los niños que conforman el grupo control lo que inicialmente sugiere diferencia en la calidad de los alimentos ingeridos por este grupo, sin embargo, no se observó una variación significativa en cuanto a la composición porcentual por nutrimento comparado con la dieta del grupo caso.

La ingesta promedio calculada por grupo fue de 94.4 y 45.8 kcal/kg/día para controles y casos, respectivamente. Un contraste por la prueba estadística de t-pareada indicó una diferencia mayor en el grupo de casos con respecto a su valor de ingesta recomendada ($t= 8.858$, $p<0.05$, $R^2= 0.839$); por otra parte, el grupo control no exhibió una diferencia significativa en su consumo energético ($t= -1.307$, $p>0.05$, $R^2=0.795$) aunque excedieron su consumo recomendado en al menos 17 kcal/kg diarias.

En los gráficos 15 y 16 se puede observar el contraste directo entre los valores de ingesta de cada grupo en relación a su valor de ingesta promedio recomendado.

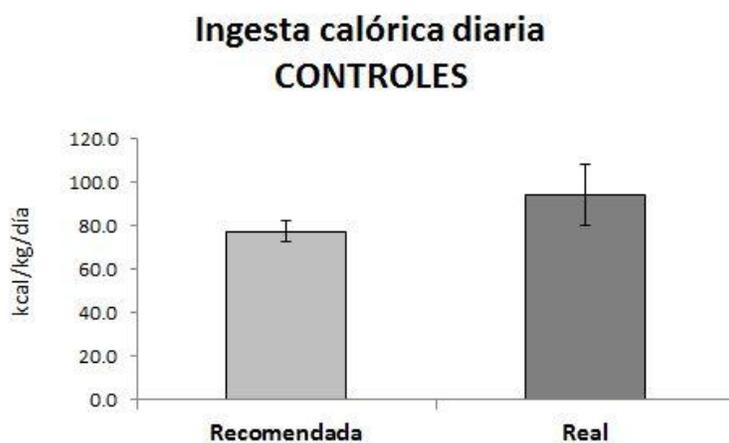


Figura 15. Valores de la ingesta calórica recomendada y real para el grupo control.

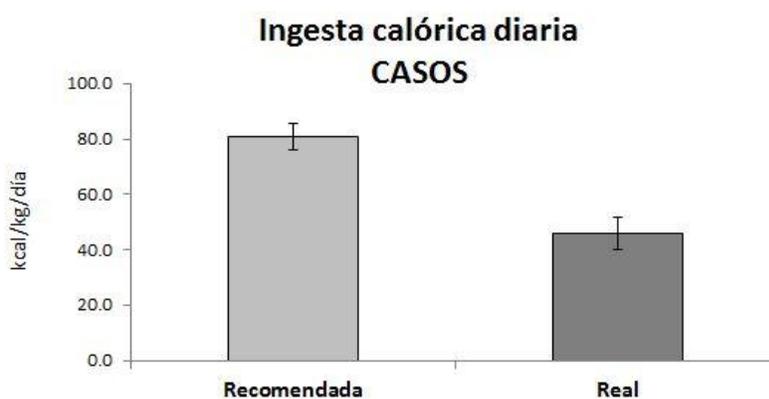


Figura 16. Valores de la ingesta calórica recomendada y real para el grupo caso.

A pesar de no estar sometidos a un programa de reducción de peso, el consumo calórico del grupo caso fue menor de manera significativa a la ingesta media recomendada

y a la ingesta del grupo control (figura 17, $t = -4.747$, $p < 0.05$, $R^2 = 0.976$) sugiriendo que el componente de la dieta calculado por un protocolo de recordatorio 24h no explica de manera directa el padecimiento en el primer grupo.

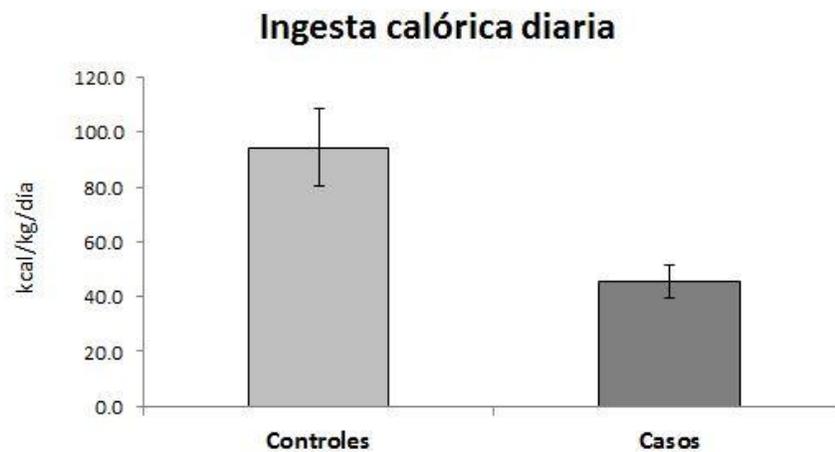


Figura 17. Comparación de la ingesta calórica media entre el grupo control y caso.

Para el grupo de niños lactantes se obtuvo un consumo energético promedio de 98 kcal/kg/día valor que no difiere de manera significativa con 105 kcal/kg/día que corresponde al consumo recomendado para esta población ($t = 0.249$, $p > 0.05$, $R^2 = -0.564$) y que concuerda con el valor Z-score que los ubica dentro de su normopeso.

4.3.4. Niveles de ácido butírico en muestras de copro de los grupos control y caso

Los niveles de butirato en cada una de las muestras de copro fue altamente variable de manera interindividual independientemente del grupo al que pertenecía cada muestra con valores que oscilaron entre 0 y 100 mmol/kg. Las concentraciones promedio de butirato fueron 51 y 49 mmol/kg para casos y controles, respectivamente como se observa en la figura 18, por lo que comparativamente no hubo diferencia significativa entre dichos valores y por ello no fue posible observar un intervalo o un valor específico dominante para alguno de los grupos dada la variabilidad tan amplia.

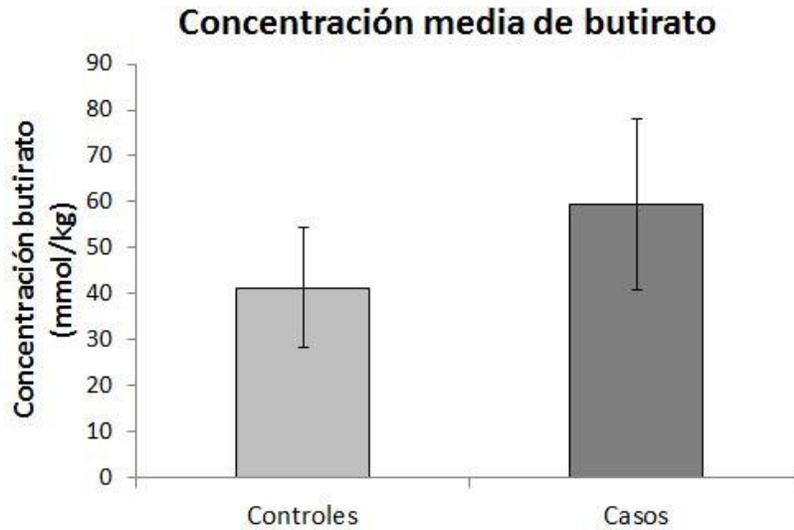


Figura 18. Comparación de la concentración media de butirato en las heces de los grupos control y caso.

Por otra parte, al analizar los valores de butirato de manera individual se observó que una agrupación de individuos (tanto casos como controles) podía realizarse en base al nivel de butirato que estos exhibieron; aquellos donde la concentración fue menor a 50 mmol/kg (nivel bajo) y aquellos individuos que exhibieron valores de butirato por encima de 50 mmol/kg (nivel alto) como se muestra en las figuras 19 y 20, donde se grafica el valor de butirato en heces de cada individuo.

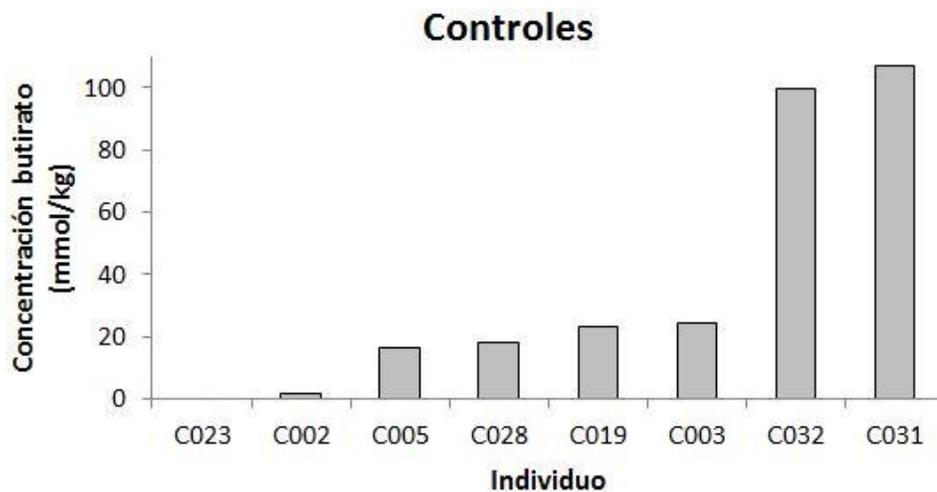


Figura 19. Niveles promedio de butirato en las muestras del grupo control.

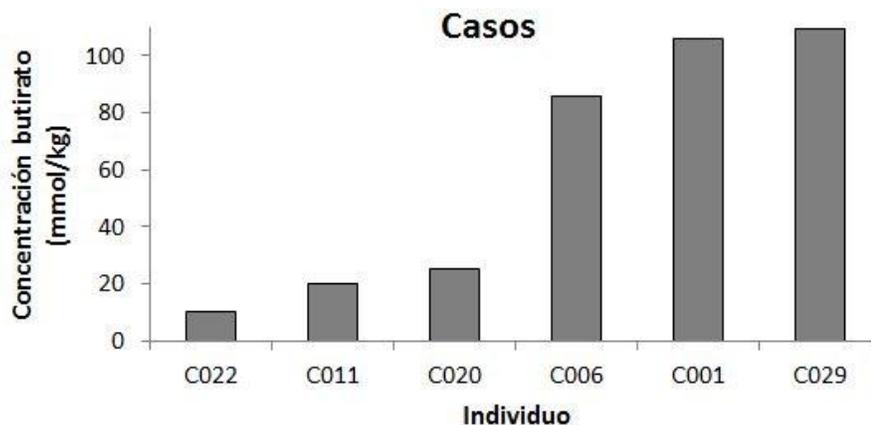


Figura 20. Niveles promedio de butirato en muestras del grupo caso.

En ambos grupos, la diferencia entre los individuos con nivel bajo de butirato fue significativa con respecto a aquellos con nivel alto; sin embargo, no se reportó diferencia entre sí en los individuos con nivel bajo o entre los individuos con nivel alto independientemente del grupo de estudio al que pertenecieron (Fig. 21).

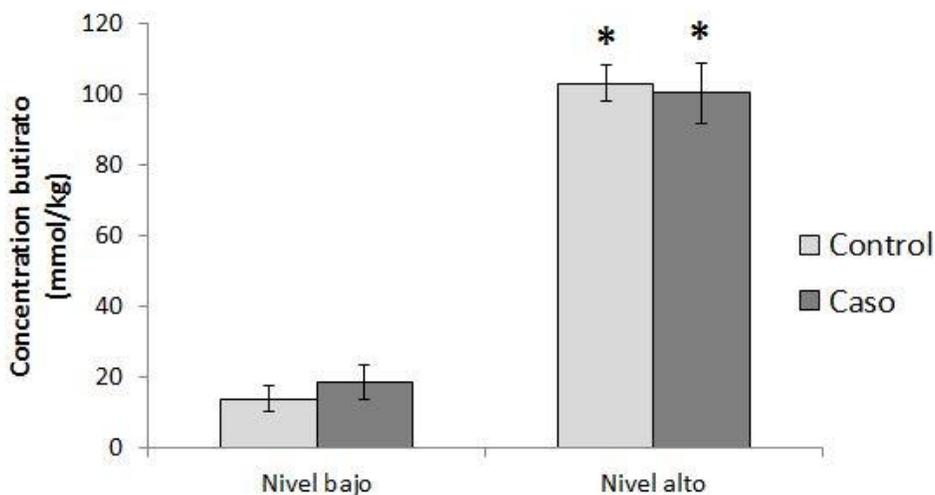


Figura 21. Comparación de la concentración media de butirato en las heces de individuos caso y control.

McOrist et al., reportaron que el nivel de butirato para un grupo de adultos se encontró en el intervalo de 2 a 48.5 mmol/kg confirmando una amplia variabilidad en los niveles individuales (McOrist et al., 2008), además de que un par de individuos fueron considerados con niveles bajos de butirato en contraste con los demás en aquel estudio con valores medios de 10 mmol/kg. Un dato interesante fue observar que los valores de

butirato en la población infantil aquí estudiada fueron más elevados que los reportados en la población adulta; dos enfoques principales que podrían explicar estos niveles serían: el primero en cuanto a la biogénesis microbiana del butirato y que estaría directamente relacionado con la actividad y presencia de especies productoras y consumidoras del mismo; el segundo, el metabolismo del hospedero que involucraría el funcionamiento de los sistemas de absorción local en las células epiteliales del colon; sin embargo, estudios más exhaustivos sobre el metabolismo del hospedero y la actividad microbiana son necesarios para apoyar estas hipótesis.

Payne et al., por su parte reportaron que los niveles de butirato y propionato se encontraban significativamente más elevados en 15 niños que padecían obesidad sin mostrar un cambio importante en su composición microbiana (Payne et al., 2011), evaluaron además la cantidad de carbohidratos disponibles para ser utilizados por las especies bacterianas en la fermentación y observaron que la cantidad de carbohidratos fue significativamente menor en el grupo caso sugiriendo que su microbiota poseía una capacidad incrementada para metabolizar estos compuestos.

Una buena propuesta para el estudio hubiera sido dicha evaluación energética de los especímenes estudiados en este trabajo y aunque no se observó una tendencia en los niveles de butirato para alguno de los grupos (caso o control) como se esperaba, esta hubiera significado una buena aproximación a la dinámica metabólica *in situ* de los individuos de bajo y alto butirato.

Se realizó una prueba de Bartlett y el cálculo de la medida de la adecuación muestral KMO (anexo 6) en la que una significancia nula mostró que era factible realizar un análisis multivariado para la reducción de los datos entre los valores de los componentes de la dieta, los niveles de butirato y la composición somatométrica de los individuos bajo estudio. Tanto en la gráfica de sedimentación, como la tabla de varianzas total explicada mostraron que los valores de todas las variables podían englobarse en base

a los primeros cuatro componentes (varianza acumulada= 84.7%, anexo 6), entre los dos primeros componentes se acumuló un 61% de la varianza total de los datos.

En la gráfica de carga (Fig. 22) se muestra que los valores nutricionales de ingesta (carbohidratos, lípidos y proteínas), así como la somatometría del individuo (peso, talla e IMC) se cargaron hacia la primer componente, la cual representó el 36% de la variabilidad de los datos y que fue denominada CARACTERÍSTICAS DEL INDIVIDUO, mostrando valores positivos mayores a 0.5 según la matriz de componentes (anexo 6). Estas mismas variables no mostraron relación con el butirato por cálculo de la correlación de Pearson ($r < 1$ y $p > 0.05$) en base al grupo de clasificación (obesidad o eutrofia).

Por otra parte, se observa que los valores de butirato, así como el número de bandas presentes en los geles de DGGE se cargaron de manera positiva hacia la segunda componente a la cual se denominó MICROBIOTA y que representó el 25% de la variabilidad de los datos.

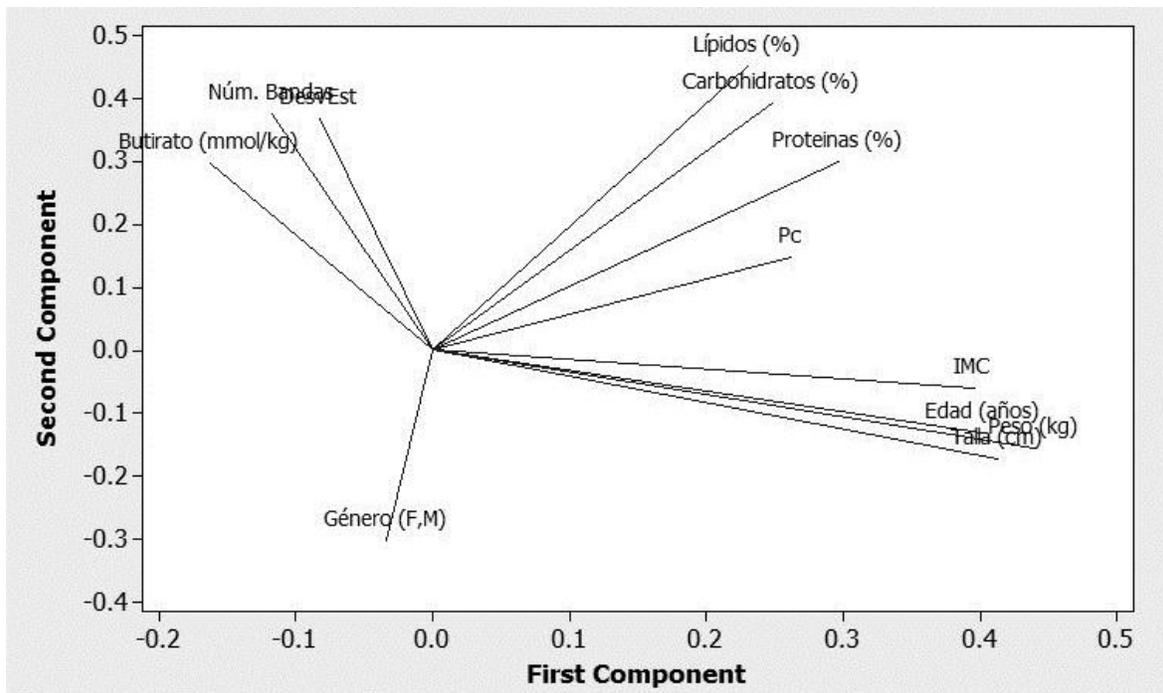


Figura 22. Análisis de componentes principales. Carga de las diferentes variables medidas en el análisis de muestras de copro de los grupos control y caso.

Del análisis por componentes principales, se puede mencionar que la composición corporal de un individuo reflejada como la presencia o ausencia de la obesidad, no se agrupa de manera cercana a la composición microbiana en el intestino valorada como la abundancia de especies representada aquí por bandas en un gel de DGGE ni con los niveles de butirato. El género mostró estar más relacionado un tercer componente principal mismo en el cual se observó mayor carga del percentil del IMC y lo cual resulta razonable puesto que para calcular este último, es necesario tomar en cuenta el género del individuo según las cartas de crecimiento del CDC.

Por otra parte, el grupo de los lactantes exhibió niveles muy variables de butirato entre sí y estos no se relacionaron con la edad, por ello, se estableció que se requiere un diseño especial para el estudio de esta comunidad ya que los datos otorgados por los cuatro individuos que conformaron este grupo no fueron concluyentes.

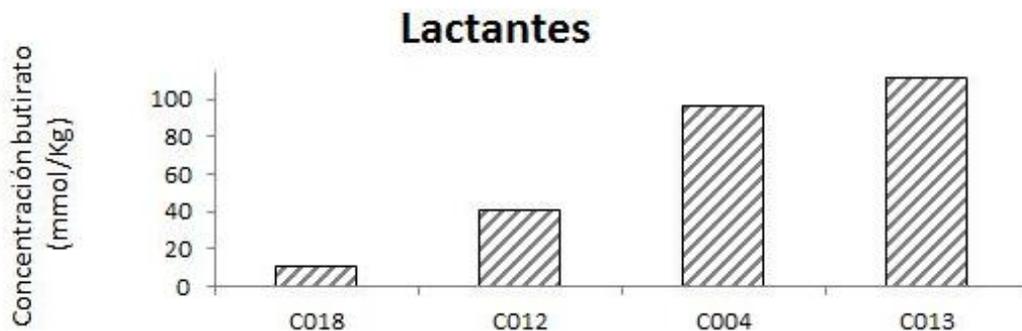


Figura 23. Niveles de butirato en las muestras del grupo de lactantes.

4.3.5. Extracción del DNA bacteriano de las muestras y evaluación de la integridad

Se llevó a cabo la extracción del DNA de las 18 muestras a partir de 2 alícuotas de 200 mg cada una y una buena integridad se observó al fraccionar en gel de agarosa al 0.5% (en la figura 24 se muestra la fotografía de los geles).

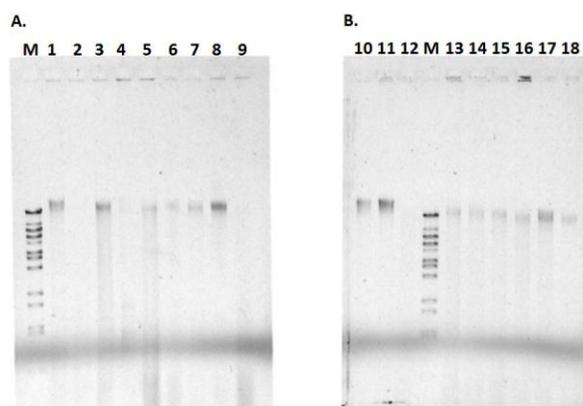


Figura 24. Integridad de los extractos del DNA de las muestras. (M) Marcador de peso molecular λ , DNA grupo control (A1-8), DNA grupo Lactantes (A9-B12), DNA grupo caso (B13-18).

4.3.5.1. Cuantificación y pureza del DNA por espectrofotometría UV

La concentración y la pureza del DNA extraído de las 18 muestras de copro se muestran en la tabla 13. Se obtuvo un valor de pureza aceptable para todos los extractos cuya relación de absorbancia se encontró en el intervalo recomendado de 1.7 – 2; la concentración promedio de todos ellos se encontró entre 17 y 300 ng DNA/ μ L.

Tabla 13. Cuantificación y pureza del DNA de muestras de copro.

Grupo	Folio	pureza	Error estándar	C (ng/ μ L)	Error estándar
Controles	C002	2.1	0.1	37.5	11.8
	C003	1.9	0.1	41.5	9.1
	C005	1.7	0.0	111.0	71.0
	C019	2.0	0.0	73.5	9.5
	C023	1.9	0.0	32.0	4.0
	C028	2.0	0.1	56.0	19.0
	C031	2.0	0.1	26.7	3.2
	C032	2.1	0.0	40.7	13.6
Casos	C001	2.0	0.0	66.8	22.0
	C006	2.1	0.1	60.5	0.0
	C011	2.2	0.2	17.2	6.3
	C020	2.0	0.2	31.0	9.0
	C022	2.0	0.0	57.8	23.3
	C029	2.0	0.1	45.3	2.8
Lactantes	C004	2.2	0.1	61.0	6.1
	C012	1.8	0.3	378.0	358.5
	C013	1.6	0.1	82.0	24.0
	C018	2.2	0.1	36.3	6.8

Una reacción de PCR de 20 μ l para cada una de las muestras utilizando 2 μ l de extracto en cada reacción confirmó la buena calidad del DNA por amplificación específica de un sólo producto de PCR del peso molecular esperado (505 pb).

4.3.5.2. Amplificación de la sección intermedia del gen 16S rRNA bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez confirmada la calidad del DNA se amplificó por PCR un fragmento de 505 pb correspondiente a la sección intermedia de 16S rRNA (regiones V3 y V4) utilizando los oligonucleótidos unidos a la pinza de GC's. De cada uno de los extractos de DNA se completó un lote de 10 reacciones de 50 μ l (volumen final 500 μ l). En todos los lotes de amplificación también se observó especificidad de un sólo producto de 505 pb (figura 25).

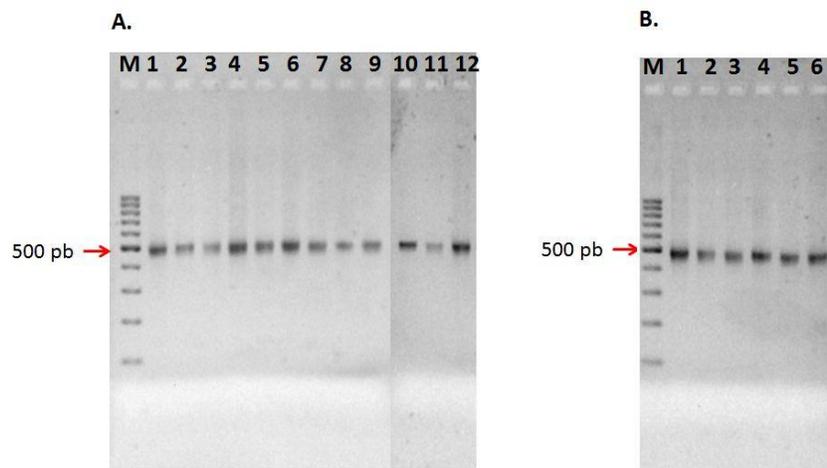


Figura 25. Especificidad de la amplificación por PCR de 16S rRNA. Amplicón del grupo Control (A1-8), Amplicón grupo Lactantes (A9-12), Amplicón grupo caso (B1-6).

Tabla 14. Cuantificación de lotes de amplificación 16S rRNA.

Grupo	Folio	Pureza	Error estándar	C (ng/μL)
Controles	C002A	1.61	0.01	672.5
	C003A	1.57	0.01	621.3
	C005A	0.86	1.00	467.5
	C019A	1.59	0.00	502.5
	C023A	1.57	0.01	736.3
	C028A	1.54	0.01	486.3
	C031A	1.68	0.01	513.8
	C032A	1.59	0.00	542.5
Casos	C001A	1.56	0.01	813.8
	C006A	1.53	0.01	473.8
	C011A	1.50	0.01	598.8
	C020A	1.45	0.01	336.3
	C022A	1.44	0.01	367.5
	C029A	1.55	0.00	626.3
Lactantes	C004A	1.51	0.01	549.4
	C012A	1.45	0.01	455.0
	C013A	1.46	0.01	386.9
	C018A	1.55	0.01	458.1

4.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA POR PERFILES DE DGGE Y GENERACIÓN DE DENDOGRAMAS

Se corrieron dos geles de DGGE a las condiciones estándar, uno para el grupo control y el otro para casos y lactantes de los cuales se obtuvieron los geles de las figuras 26 y 27, las fotografías en formato TIFF fueron procesadas en el programa para el análisis de geles en la modalidad de fingerprinting. La normalización de la distancia recorrida en la migración (estándar de migración) se realizó cargando en los extremos de cada gel un par de amplicones obtenidos de la amplificación de 16S rRNA presente en heces de un adulto sano y la deformación de los geles y el contraste de fondo se corrigió en el mismo programa.

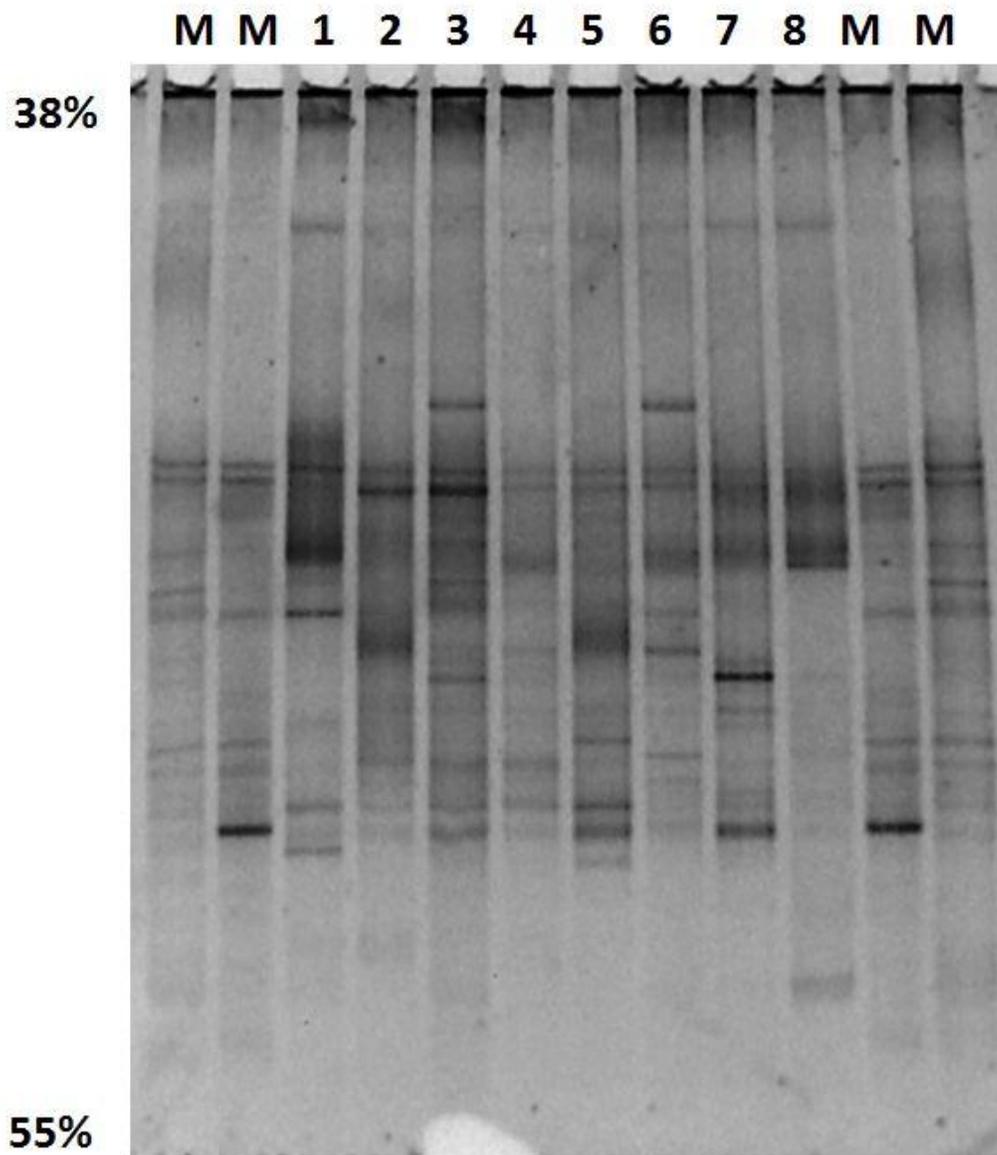


Figura 26. Fraccionamiento DGGE de los amplicones de 8 muestras control. (M) Estándar de migración, De izquierda a derecha folios C023, C002, C028, C005, C019, C003, C032, C031 (1-8).

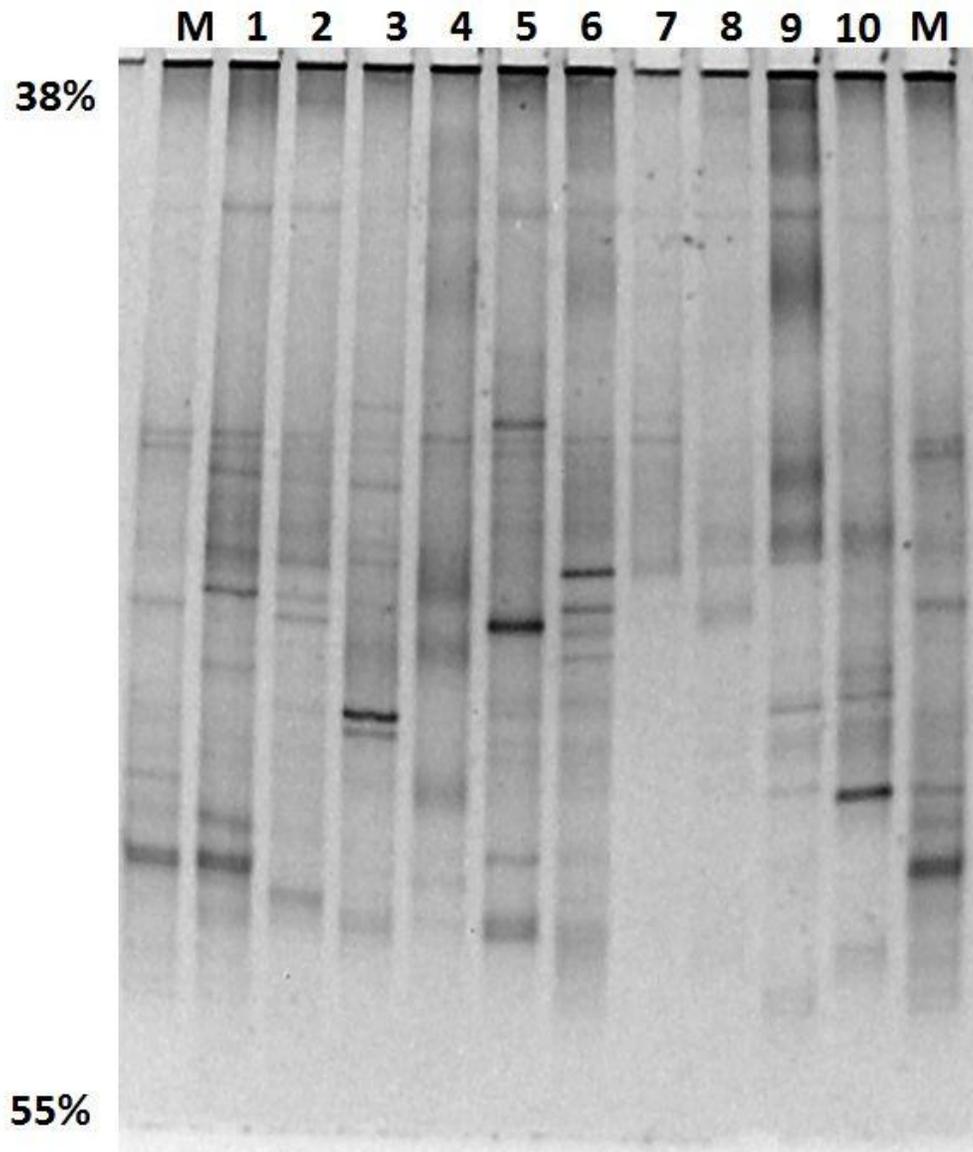


Figura 27. Fraccionamiento DGGE de los amplicones de 6 muestras caso y 4 lactantes. (M) Estándar de migración, De izquierda a derecha folios del grupo caso C001, C020, C029, C022, C006, C011 (1-6), Folios de lactantes C004, C012, C013, C018 (7-10).

Se obtuvo el dendograma en base a la ausencia o presencia de bandas en cada carril en la modalidad de comparación compuesta (composite comparison) del programa GelCompar II. Se utilizó el coeficiente de Dice como índice para el cálculo de la matriz de similitud y el método de Ward para la formación del dendograma con el cual cada nodo se genera en base a las desviaciones estándar (Maths, 1998-2010).

La figura 28 corresponde al dendograma formado por comparación de la presencia de bandas en cada muestra y en el que se distinguen dos conglomerados o grupos principales que a su vez se subdividen en 2 conjuntos cada uno. Cada subconjunto formado está indicado por una letra (A-D).

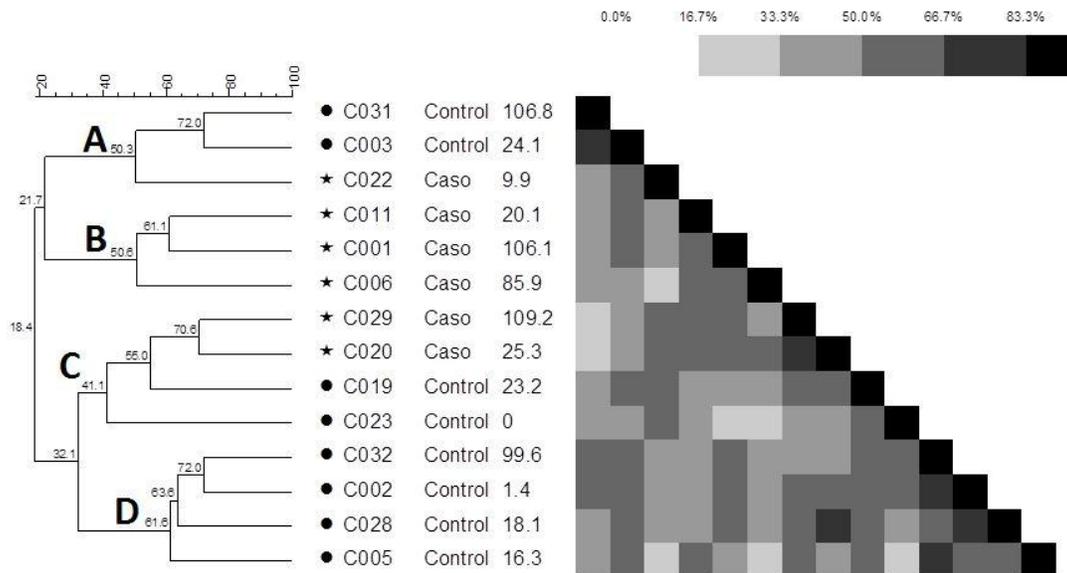


Figura 28. Dendograma generado en el programa GelCompar II v.6.5. El valor de cada nodo corresponde al índice de similitud de acuerdo a la escala superior. Los círculos y las estrellas denotan a los integrantes de cada grupo (verde para controles y rojo para casos). En las columnas centrales se indica el folio, la agrupación y el valor de butirato para cada muestra y en la extrema derecha se grafica la matriz de similitud en un patrón de intensidad (escala superior).

El conglomerado de mayor tamaño por el número de individuos que se agruparon exhibe un índice de similitud de 32.1% entre sus dos subconjuntos. El subconjunto con mayor índice de similitud en este conglomerado (D) se conformó por cuatro individuos que pertenecen al grupo control (folios C032, C002, C028, C005), ninguno de los cuales mostró relación o parentesco consanguíneo, sin embargo, los valores de butirato de estos individuos fueron notablemente diferentes entre sí y de todo el conjunto, sólo C032 correspondió al grupo de individuos con nivel alto de butirato.

El subconjunto (C) exhibió un índice de similitud de 41.1% entre sus componentes, dos de ellos clasificados dentro del grupo caso (mismos individuos que mostraron índice de similitud mayor dentro del grupo) y los dos restantes pertenecientes al grupo control;

Entre ellos no existió relación consanguínea y los valores de butirato para estos individuos difieren significativamente entre sí.

Un segundo conglomerado formado por un menor número de individuos ($n= 6$) exhibió un índice de similitud de tan sólo 21.7% entre los dos subconjuntos que lo formaron, los cuales tuvieron índices de similitud de 50.6% y 50.3%, respectivamente; el primero de ellos (B) agrupó a tres individuos del grupo caso donde la similitud más fuerte se encontró entre los folios C011 y C001 (índice de similitud de 61.1%) sin embargo, los valores de butirato de estos individuos también fueron significativamente diferentes mostrando una amplia variabilidad. Por otra parte, en el subconjunto (A) se agruparon dos individuos control y un caso, la relación de similitud fue mayor entre los dos primeros y no exhibieron niveles de butirato similares.

En contraste a lo esperado, no se observó mayor similitud entre los individuos que padecen obesidad en función de la composición de su microbiota intestinal o bien en función de sus concentraciones de butirato; tampoco se encontró la dominancia de una banda específica que sugiriera la presencia exclusiva de una especie o especies de acuerdo al grupo de clasificación (caso o control). En base al grado de similitud de cada subconjunto se realizó el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson (r), Spearman (ρ) y Kendall (τ) para visualizar si existía dependencia con la concentración promedio de butirato; sin embargo, no se encontró correlación pues los valores fueron menores a la unidad ($r= -0.168$ ($p > 0.05$), $\rho= -0.2$ ($p > 0.05$) y $\tau= 0$ ($p > 0.05$)).

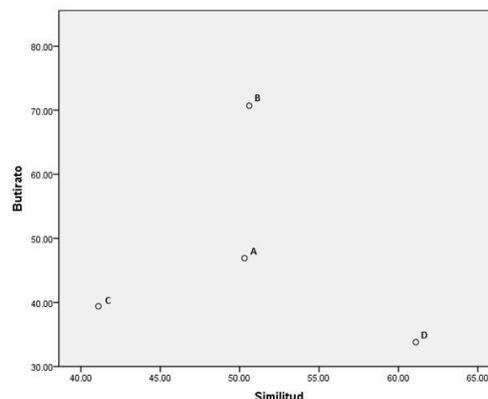


Figura 29. Gráfico de la correlación entre el índice de similitud y la concentración de butirato en los cuatro clusters obtenidos al agrupar las muestras por la composición microbiana usando la técnica de DGGE.

Mientras que los individuos del cluster C cuyo índice de similitud en función de las bandas que exhibieron por DGGE fue bajo, sus niveles de butirato fueron mayores que los individuos del grupo D con un patrón de bandeo con mayor similitud entre sí. Por otra parte, los subconjuntos A y B que compartieron un índice de similitud medio mostraron concentraciones de butirato notablemente diferentes de 50 y 70 mmol/kg respectivamente, lo que sugiere, que las concentraciones de butirato pueden depender de especies microbianas específicas o bien de la actividad metabólica del hospedero pero no de la composición microbiana total de un individuo.

Una observación a resaltar, es que el subconjunto D fue el que exhibió mayor grado de similitud y en promedio fue también el que presentó la menor concentración de butirato; es notable mencionar que D se formó únicamente por muestras del grupo control y forma parte del conglomerado con mayor número de individuos agrupados en que sólo dos muestras caso están presentes (folios C020 y C029). Sin embargo, un estudio más exhaustivo debe realizarse dada la amplia variabilidad en los valores de butirato y la composición microbiana así como el desconocimiento de la actividad metabólica para este ácido graso en el hospedero.

Del grupo de Lactantes, no se pudo observar un perfil de bandeo específico para todo el grupo debido a la variabilidad interindividual; en promedio, los perfiles de todos los integrantes de este grupo exhibieron un menor número de bandas (o especies teóricas) en comparación con los perfiles de los niños mayores a 3 años (tanto casos como controles). Una mayor similitud se observó entre los dos niños menores a 6 meses de edad (C004 y C0012) mientras que los dos niños menores de 15 meses (C013 y C018) exhibieron mayor similitud entre sí, los dos primeros fueron los que mostraron menor número de bandas que podría explicarse por la temporalidad en el establecimiento de la microbiota según su edad y dieta.

4.4.1. Análisis de los índices de similitud por presencia/ausencia de bandas en base al grupo

Con la ayuda del análisis de bandas, se realizó el cálculo de los diferentes coeficientes de similitud y divergencia para cada grupo (caso o control) aplicando las expresiones matemáticas de la tabla 1 y para lo cual se designó al grupo de casos como a ó A dependiendo del coeficiente a calcular y como b ó B al grupo control.

Un total de 45 bandas diferentes (de acuerdo a su posición por migración en DGGE) se identificaron para todo el conjunto de muestras, 12 de ellas fueron exclusivas del grupo de los casos y 9 del grupo control aunque no necesariamente estuvieron presentes en todos los individuos del grupo. En promedio, 36 estuvieron presentes en todos los casos, 32 en el grupo control y 23 bandas se observaron en muestras de ambos grupos. En la tabla 15 se muestra el valor calculado de cada coeficiente.

Tabla 15. Cálculo de los índices de similitud o divergencia de los grupo caso y control por perfil de bandeo en DGGE.

Tipo	Similitud				Divergencia
Coefficiente	Dice	Jaccard	Jeffrey's	Ochiar	Poggi
Valor	0.68	0.51	0.68	0.040	0.47

Un valor cercano a la unidad para los índices de similitud, indican menor diferencia mientras que para el índice de divergencia de Poggi un valor más cercano a la unidad representa menor similitud entre las muestras. Todos los índices tuvieron valores próximos a 0.5 lo que indica que los grados de similitud y divergencia entre ambos grupos no son diferentes y por tanto no fue posible establecer una comparación en base a estos índices con respecto a la presencia de la enfermedad.

Lo anterior puede reforzarse en base al cálculo de los coeficientes de correlación para el número de bandas promedio encontradas en cada uno de los subconjuntos A – D

que ya están agrupados en base a la similitud de su perfil de bandeo y como una medida relativa de la abundancia de especies con respecto a las concentraciones promedio de butirato. Ninguna correlación pudo observarse siendo los valores de $r= 0.48$, $\rho= 0.40$ y $\tau= 0.33$, además ninguna fue significativa con $p > 0.05$ como se observa en la figura 30.

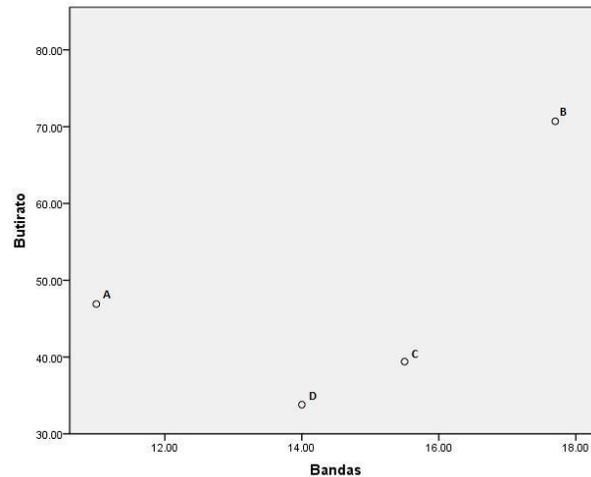


Figura 30. Ausencia de correlación entre el número de bandas (diversidad relativa) y la concentración de butirato en cada subconjunto de muestras (A-D).

4.4.2. Análisis de similitud de la composición microbiana por DGGE en base al nivel de butirato

Debido a que ninguna correlación se pudo encontrar entre los niveles de butirato, los perfiles de bandeo en el DGGE y la presencia de la patología, se generaron los dendogramas de similitud por separado para los individuos que conformaban tanto el grupo con nivel de butirato alto como los de nivel bajo.

El grupo con nivel de butirato bajo (menos de 50 mmol/kg) fue el que se formó con mayor número de individuos, este dendograma (figura 31) muestra la formación de dos conglomerados con índice de similitud de 38.2% entre sí, observándose valores de similitud de los perfiles de bandeo entre individuos mayores al 50% en todos los casos.

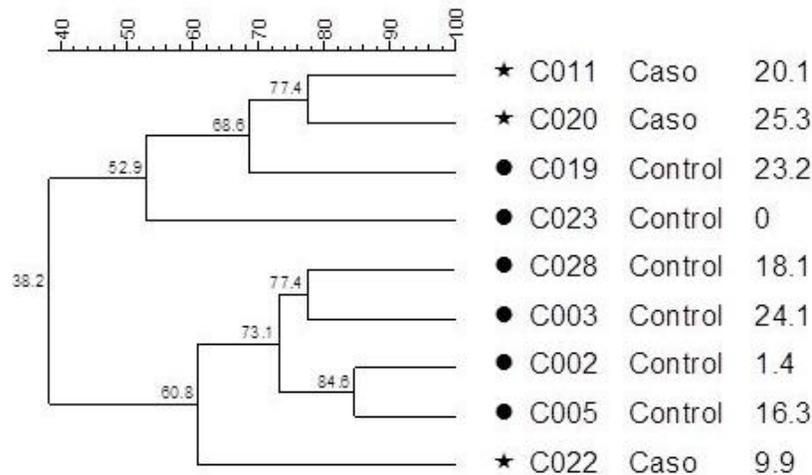


Figura 31. Dendrograma de similitud en base al perfil de bandeo DGGE del grupo con nivel bajo de butirato. Primera columna: folio de la muestra, segunda columna: tipo de muestra y tercera columna: nivel de butirato (mmol/kg).

Se puede destacar que el cluster de mayor tamaño (y mayor similitud) se conformó casi en su totalidad por individuos del grupo control (aquellos que no padecen obesidad), únicamente el caso C022 se integró a este grupo con índice de similitud de 60.8%, los cuatro perfiles de los individuos control en este cluster mostraron una similitud más fuerte (73.1%).

Con una diferencia mayor al 60% con respecto al cluster anterior, se formó otro cluster con dos muestras de individuos caso (C011 y C020) y dos muestras del grupo control (C019 y C023), una mayor similitud se encontró entre los dos primeros (77.4%) con respecto a los demás (52.9 – 68.6%). Lo anterior sugiere que la composición microbiana intestinal total de individuos con niveles bajos de butirato que no padecen obesidad difiere notablemente a la de aquellos que si la padecen y que exhiben valores de butirato bajos.

Por otro lado, en el dendrograma formado entre los individuos del grupo con nivel alto de butirato (figura 32) el índice de similitud entre sus miembros agrupados en dos clusters fue únicamente de 33%, nuevamente la diferencia en la composición microbiana

fue elevada entre los dos clusters; sin embargo, la similitud entre individuos fue mayor al 60% en todos los casos.

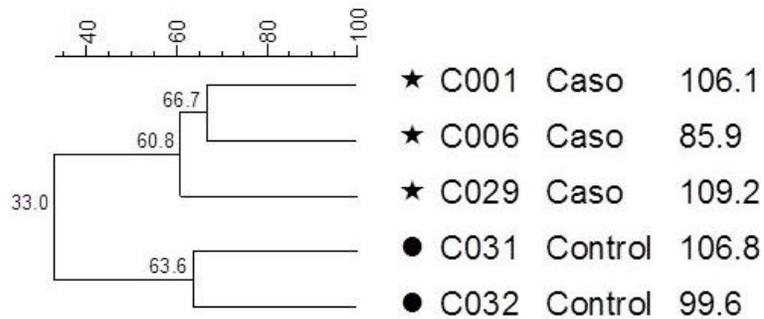


Figura 32. Dendrograma de similitud en base al perfil de bandeo DGGE del grupo con nivel alto de butirato. Primera columna: folio de la muestra, segunda columna: tipo de muestra y tercera columna: nivel de butirato (mmol/kg).

Una observación interesante fue la clara diferencia entre los dos clusters formados (33% similitud) y que cada uno de ellos se integró exclusivamente por individuos de alguno de los dos grupos en estudio (caso o control) sugiriendo que aquellos individuos con niveles de butirato elevados que padecen obesidad o sobrepeso son notablemente más similares entre sí que con respecto a individuos eutróficos con niveles de butirato similares, sin embargo, una muestra más grande de individuos se requiere para observar si este comportamiento se conserva.

Nueve de los catorce individuos que participaron en el estudio presentaron niveles bajos de butirato independientemente de haber sido clasificados como casos o controles por lo que no se observó que dichos niveles bajos de butirato se relacionaran con la presencia de la patología como se reporta en bibliografía. Por otro lado, la mayoría de los individuos en este grupo pertenecieron al grupo control y se asociaron por similitud de su composición microbiana intestinal con mayor fuerza que aquellos en el mismo grupo pero del grupo caso.

4.4.3. Análisis semi-cuantitativo por intensidad de banda

Zhang et al., mostraron que un análisis semi-cuantitativo puede lograrse de los geles digitalizados de DGGE al normalizar las intensidades de cada banda y calculando a partir de ellas las concentraciones relativas (Zhang et al., 2005). Esto se llevó a cabo para los geles analíticos cargados con las muestras del grupo caso y control.

De los valores de intensidad basándose en el mapa de píxeles de la imagen se calculó la concentración relativa de cada banda en las muestras normalizando porcentualmente la suma de todas las intensidades de las bandas presentes en cada muestra (carril) con el valor de la concentración de amplicón cargado que correspondió a 25 µg de DNA. La matriz de intensidades y concentraciones relativas correspondientes a las bandas de cada muestra se muestra en el Anexo 7.

Las bandas se nombraron de acuerdo a la distancia recorrida dentro del gel con valores de migración de 0 -100 siendo 0 la posición inmediata al fondo del pozo de carga donde el gradiente desnaturizante correspondió a 38% mientras que el valor de 100 se asignó al extremo final del gel donde el gradiente desnaturizante fue de 55%.

Del análisis se obtuvo que el valor de la concentración relativa (Cr) para cada banda se encontró entre 0.015 - 0.17 µg DNA/µl amplicón siendo apreciables bajo la luz UV sólo aquellas bandas que exhibieron un valor de Cr > 0.12 µg/µl. Se sugirió que la predominancia de la(s) especie(s) en una muestra pueden correlacionarse con un valor alto de Cr y de este modo explicar la abundancia de cierta especie (banda) en base a un valor de intensidad.

Tabla 16. Matriz de la concentración relativa (Cr) de las bandas con mayor intensidad en todas las muestras.

Banda	Muestra													
	C031	C003	C022	C011	C001	C006	C029	C020	C019	C023	C032	C002	C028	C005
14.1	0.08	0.03	0.17	0.11	0.06	0.09	0.00	0.07	0.00	0.09	0.06	0.06	0.05	0.00
35.2	0.11	0.11	0.15	0.07	0.06	0.07	0.04	0.08	0.06	0.13	0.08	0.12	0.08	0.08
37.0	0.14	0.10	0.00	0.07	0.05	0.06	0.05	0.08	0.06	0.11	0.10	0.16	0.11	0.10
45.8	0.15	0.12	0.13	0.00	0.07	0.00	0.05	0.00	0.05	0.15	0.10	0.10	0.07	0.00
47.5	0.14	0.10	0.00	0.14	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12
50.5	0.00	0.07	0.15	0.10	0.07	0.00	0.05	0.06	0.06	0.10	0.00	0.09	0.06	0.05
52.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
55.0	0.00	0.11	0.14	0.00	0.01	0.00	0.06	0.02	0.08	0.00	0.00	0.13	0.03	0.00
59.2	0.03	0.04	0.00	0.04	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	0.05	0.04
60.7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.17	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
90.8	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

En la tabla 16, se enumeran las once bandas que exhibieron un valor elevado de intensidad en algunas de las muestras con concentraciones relativamente mayores a 0.12 $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l amplicón}$. Las bandas 14.1, 35.2, 37, 45.8 y 50.5 se encontraron en casi todas las muestras con valores de Cr muy variables entre si, lo que puede sugerir que estas bandas podrían corresponder a bacterias pertenecientes a la denominada ‘microbiota conservada’ o ‘core’, y que fue definida por Turnbaugh como la permanencia de ciertas especies entre individuos distintos (Turnbaugh et al., 2009).

Dado que del análisis de clusters no se encontró una banda o grupo de bandas exclusivas para alguno de los grupos como se esperaba, se determinó el corte de las bandas en base al valor de mayor intensidad relativa ($\text{Cr} > 0.12$) y además que pudieran ser detectables bajo luz UV; de esta manera se exploró si el enriquecimiento de las bandas determinadas por su valor de intensidad se relacionaba con alguna especie bacteriana particular involucrada en el proceso patológico o bien con el metabolismo de butirato.

4.4.4. Elección de bandas sujetas a corte para secuenciación

En la tabla 16 se resaltan aquellas bandas con Cr mayor a 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pero que no fueron fácilmente detectables para corte bajo luz ultravioleta destacando en un gris más oscuro las bandas con Cr > 0.12 que fueron seleccionadas para corte ya que pudieron ser detectables bajo luz UV, mismas que se concentran en la tabla 17.

Tabla 17. Bandas seleccionadas para el corte y la secuenciación.

Muestra	Banda	Designación de secuenciación	Grupo
C006	52.5	M3	caso
C029	60.7	M4	caso
C011	47.5	M7	caso
C023	50.5	M8	control
C032	59.2	M9	control

4.5. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL FRAGMENTO DE 16S rRNA RECUPERADO POR ELECTROELUCIÓN DE UN GEL PREPARATIVO DE DGGE

Previo al corrimiento de los geles preparativos de DGGE cargados con las muestras seleccionadas para corte de las bandas más intensas, se corrieron geles preparativos de amplicón 16S rRNA del DNA de *E. coli*, con la finalidad de probar si se obtenían secuencias de buena calidad para realizar la reacción de secuenciación directa del fragmento de 16S rRNA recuperado por electroelución de la banda cortada; sin embargo, se obtuvieron secuencias cortas (aproximadamente 100 a 200 bases) de baja calidad que no permitieron un buen resultado (valores de identidad menores al 93%) al compararlas con la base de datos BLAST para la identificación de la especie control (*E. coli*), debido a lo anterior se decidió seguir un protocolo de clonación en vector comercial pJET1.2 de las bandas en la tabla 17.

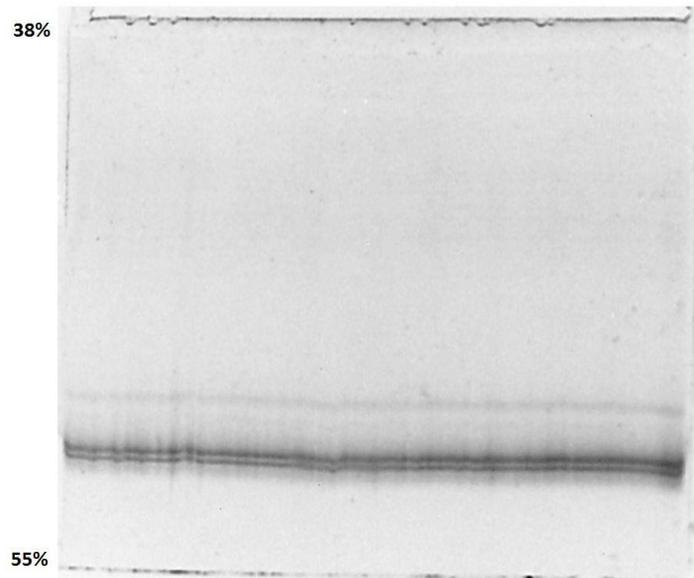


Figura 33. Gel preparativo con 200 μg de fragmento del gen 16S rRNA de *E. coli* (cepa Top 10 F') para corte de banda y recuperación del DNA por electroelución.

4.6. CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN 16S rRNA EN VECTOR PJET1.2/BLUNT RECUPERADO DE UN GEL DE DGGE POR ELECTROELUCIÓN

De los geles preparativos de DGGE de las cinco muestras seleccionadas (C006, C011, C023, C029 y C032) se cortaron las bandas antes mencionadas (Anexo 8) y el DNA recuperado por electroelución se cargó en un gel de agarosa como se muestra en la figura 34.

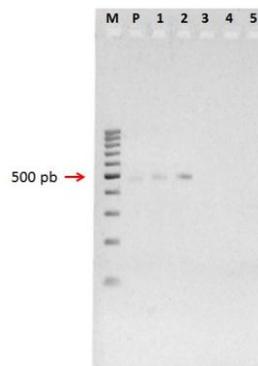


Figura 34. Confirmación de la recuperación de DNA de los geles de poliacrilamida por electroelución. (M) Marcador de peso molecular, (P) Control positivo (*E. coli*), (1) Banda M3 (muestra C006), (2) Banda M4 (C029), (3) Banda M7 (C011), (4) Banda M8 (C023) y (5) Banda M9 (C032).

Dada la baja eficiencia de recuperación como se observa en la figura anterior, se utilizaron 4 μl de electroeluido para cada reacción de ligación de 20 μl . Se obtuvo la

siguiente cuenta de post-transformantes para cada banda clonada (tabla 18). Como control positivo (J) se utilizó un plásmido pJET1.2 ligado con el fragmento de 16S rRNA de *E. coli* recuperado de los geles preparativos de DGGE utilizados en la secuenciación directa (figuras 33 y 34) y como control negativo (C) se utilizó el vector vacío.

Tabla 18. Cuenta de colonias post-transformantes viables.

Muestra	Plásmido	Descripción	Cuenta en 200 μ l	Cuenta en 800 μ l
Control V (+)	N/A	Viabilidad de competentes crecidas en medio LB sin antibiótico	Confluente	
Control S (-)	N/A	Confirmación de no resistencia de competentes crecidas en LB con Amp	Sin crecimiento	
Control C (-)	C	Competentes transformadas con vector vacío (control de selección positiva)	83	245
Control J (+)	J	Competentes transformadas con pJET1.2 ligado a fragmento de 16S rRNA de <i>E. coli</i>	98	Incontables
C006 (caso)	M3	Post-transformantes pJET1.2 ligado con la banda 52.5	82	237
C029 (caso)	M4	Post-transformantes pJET1.2 ligado con la banda 60.7	44	123
C011 (caso)	M7	Post-transformantes pJET1.2 ligado con la banda 47.5	63	249
C023 (control)	M8	Post-transformantes pJET1.2 ligado con la banda 50.5	7	10
C032 (control)	M9	Post-transformantes pJET1.2 ligado con la banda 59.2	17	33

Una eficiencia de transformación de 5.9×10^5 UFC/ μ g DNA se obtuvo para el plásmido control J, lo cual indicó una buena calidad de las competentes para la transformación. Como se puede observar en la tabla anterior, el control C que contenía al vector vacío y que corresponde a un control negativo para la selección de clonas positivas exhibió crecimiento sugiriendo la presencia de un inserto desconocido, mutaciones o bien algún mecanismo que evitó la expresión del gen de selección *eco471R* del vector.

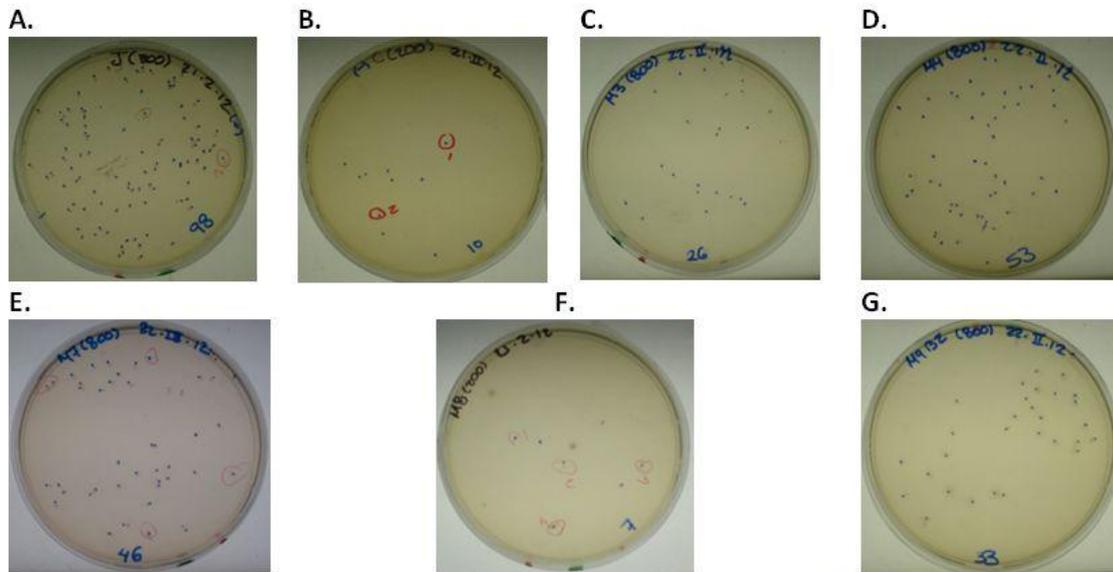


Figura 35. Plaqueo de post-transformantes resultantes de la clonación del fragmento de 16S recuperado de DGGE. (A) Control J, (B) Control C, Postrtransformantes de clonación de bandas M3, M4, M7, M8 y M9 (C-G).

De cada placa de post-transformantes se seleccionaron 6 colonias que después de sembrarse por estría simple en cajas de LB con doble antibiótico (figura 36) se crecieron en medio líquido para extracción de plásmido por método de lisis alcalina.

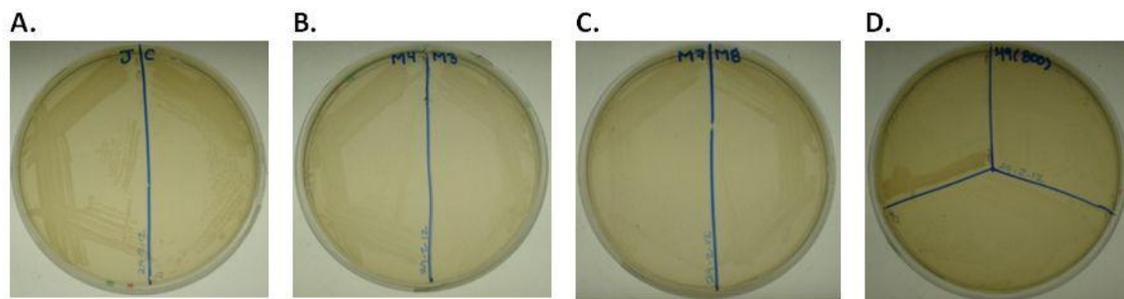


Figura 36. Aislamiento por estría simple de post-transformantes. (A) Siembra de una colonia de los controles J y C. (B-D) Siembra de una colonia de las clonas transformadas con una banda de DGGE.

Sólo se pudo obtener un buen aislamiento de las post-transformantes M3 y M4 ya que en las cajas M7, M8 y M9 se observó el crecimiento de una mezcla de dos colonias de bacterias con morfología muy parecida a *E. coli* pero transparente; de esta mezcla se intentó aislar *E. coli* por estría; sin embargo, esto no fue posible, se repitió la clonación de los 5 fragmentos y se obtuvo el mismo resultado.

Cabe mencionar que las colonias que habían sido transformadas con el vector pJET1.2 vacío no expresaron el gen de selección positiva, control en el cual se observó crecimiento, no obstante, de la extracción del plásmido y posterior amplificación por PCR no se observó producto ligado sugiriendo una mutación en el vector o bien una capacidad de la bacteria de resistencia a la acción de este gen o su producto.

4.7. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA

En la figura 37 se observan los plásmidos extraídos por lisis alcalina de las post-transformantes J, M3, M4, M7, M8 y M9, todos ellos libres de RNA. La presencia de varias bandas se explica por las diferentes conformaciones tridimensionales que adquiere el plásmido ya que este no fue tratado con endonucleasa para linealizarlo.

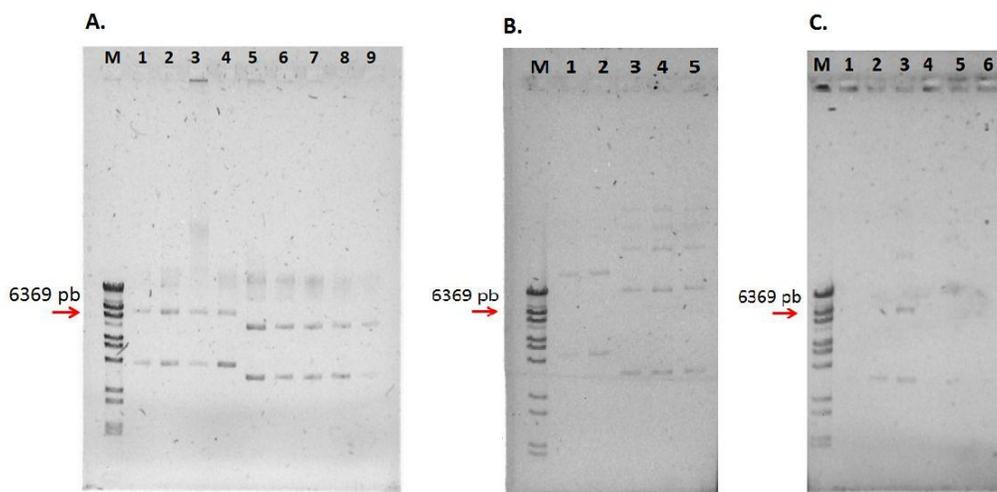


Figura 37. Plásmidos obtenidos de la clonación de 5 fragmentos de 16S rRNA recuperados de DGGE. (M) marcador de peso molecular λ , Plásmido control J (A1-2 y B1-2), Plásmido M3 (A3-4), Plásmido M4 (A5-7), Plásmido M7 (A8-9), Plásmido M8 (B3-5), Plásmido M9 (C1-3). Plásmido C (C4-6).

Tabla 19. Cuantificación del DNA plasmídico.

Plásmido	Pureza	Error estándar	C (ng/ μ L)
M3	1.795	0.007	267.5
M4	1.84	0.014	342.5
M8	1.83	0.000	278.75
J	1.74	0.028	80

A pesar de repetir la extracción de los plásmidos M7, M9 y C no se observó mejora en la eficiencia de recuperación, aun así estos extractos se sometieron a la reacción de confirmación del inserto por PCR cuyo tamaño esperado fue de aproximadamente 600 pb (figura 38).

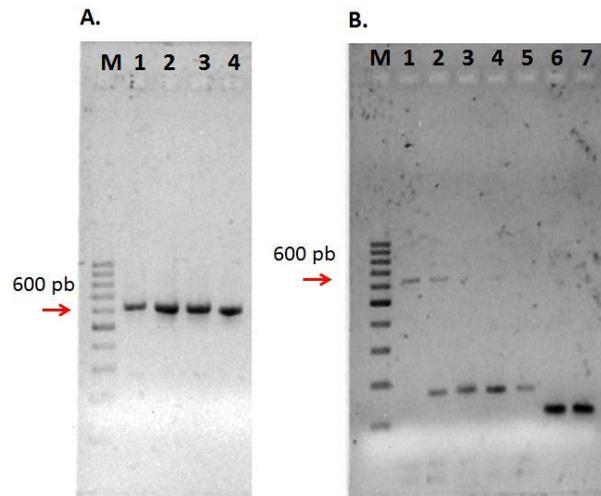


Figura 38. Amplificación por PCR para la confirmación de la inserción del fragmento de 16S rRNA en pJET1.2/blunt. (M) marcador de peso molecular, Plásmido M3 (A1-2), Plásmido M4 (A3-4), Plásmido M8 (B1-2), Plásmido M9 (B3-5) y Plásmido M7 (B6-7).

De la figura 38 se observa que únicamente se logró la inserción del fragmento correspondiente en los plásmidos M3 y M4. Aunque se observó amplificación tenue del plásmido M8, pudo apreciarse una mezcla de dos productos (Fig. 38B carril2) en una de las reacciones donde una de las bandas exhibió el tamaño esperado para el inserto, por ello únicamente se utilizó el DNA plasmídico del carril 1 (Fig. 38B) para la preparación de esta secuencia.

A pesar de repetir la clonación, no se llevó a cabo la inserción de los fragmentos M7 y M9 (carriles 3-7 de la Fig. 38B), lo anterior podría explicarse por la insuficiencia de recuperación del DNA por electroelución ya que este no pudo observarse en el gel de agarosa (fig. 34), una pérdida importante se tuvo utilizando el método de electroelución por lo que una baja concentración del mismo en la reacción de ligación explicaría la ineficiencia durante la inserción en el plásmido.

4.8. ANÁLISIS DE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y ASIGNACIÓN DE FILOGENIA

Únicamente se pudieron obtener las secuencias de los plásmidos M3 y M4; en el caso de M8 el electroferograma obtenido se mostró mezclado o interpuesto y por ello no fue posible interpretarlo. Las secuencias M3 y M4 se visualizaron en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9.0 y posteriormente fueron depuradas con el programa Vector NTI suite 6 mismo en el que se llevó a cabo la construcción de la secuencia reversa complementaria en base a la secuencia reversa (Anexo 9); las moléculas finales fueron contrastadas con la base de datos de secuencias reportadas para el gen 16S rRNA bacteriano utilizando la herramienta BLAST (NCBI) y de cuyo resultado se tomaron las secuencias de las 10 especies que mostraron un índice máximo de identidad mayor a 90% y nivel de expectación (E-value) más cercano a cero (Anexo 10).

Las secuencias obtenidas de las moléculas M3 y M4 fueron embebidas dentro de un árbol filogenético construido con el programa Mega 5 utilizando el método UPGMA y las 10 secuencias reportadas de los diez organismos con mayor similitud que reportó el BLAST (Fig. 39) con respecto a la secuencia problema (M3 o M4).

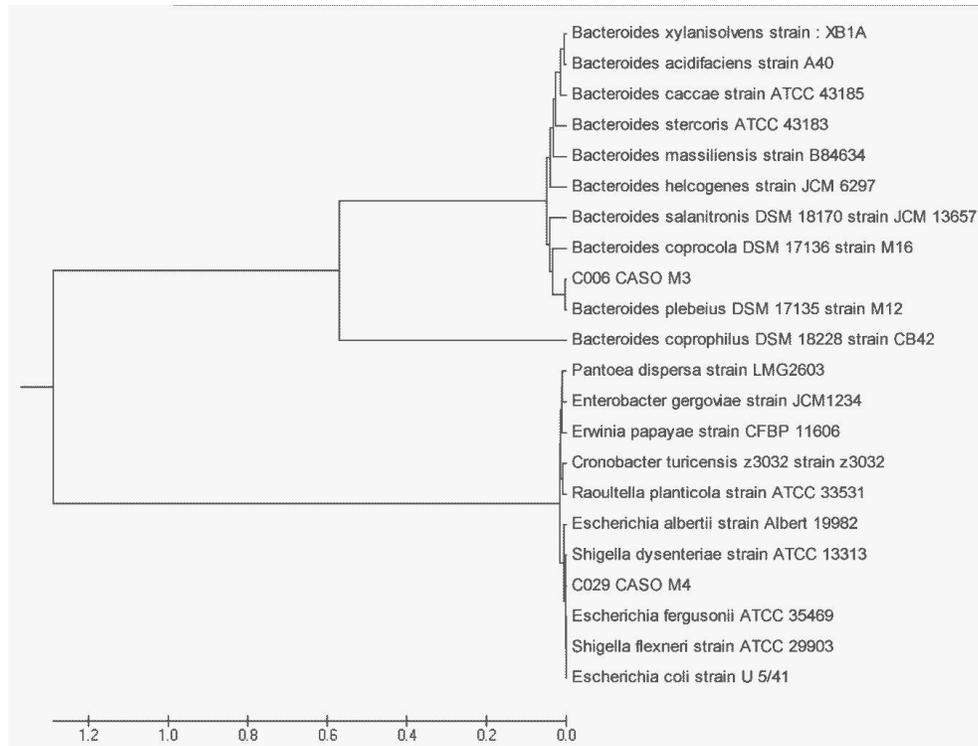


Figura 39. Relaciones taxonómicas evolutivas. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método UPGMA (Jones et al., 1973). Se muestra el árbol optimizado con la suma de la longitud de nodos= 3.45961074. El árbol está a escala con la suma de las longitudes de nodo en las mismas unidades como aquellas de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método de parentesco compuesto máximo (maximum composite likelihood) y está en unidades del número de sustituciones de base por sitio (Tamura et al., 2004). El análisis involucró 22 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de los codones incluidos fueron 1ro,+2do+3ro+ no codificante. Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas. Hubo un total de 414 posiciones en el set de datos final. El análisis fue conducido en MEGA5 (Tamura et al., 2011).

La secuencia designada como M3 que correspondió a la banda clonada de una muestra del grupo caso (C006), individuo clasificado en el grupo con nivel alto de butirato, fue exclusiva de esta muestra de acuerdo a su posición en el gel por la distancia migrada.

El análisis de la secuencia la ubicó más relacionada con las especies dentro del género de los *Bacteroides* pertenecientes al *phyla Bacteroidetes* caracterizado por estar conformado de bacterias anaerobias, gram-negativas capaces de metabolizar moléculas complejas y que se han asociado tanto con efectos benéficos como patológicos específicos (Wexler, 2007); en niños, la presencia de *Bacteroides* se ha confirmado en infecciones de origen estomacal, infecciones en articulaciones y bacteremias incluso de manera especie específica.

Del análisis de la secuencia M4 que se encontró de manera exclusiva en el individuo C029 y que fue clasificado en el grupo caso con nivel alto de butirato, se sugirió con 99% de identidad máxima que se relacionaba de manera fuerte con especies patogénicas de *Escherichia* y *Shigella*, ubicándose de manera más cercana a los organismos *E. fergusonii* ATCC 35469, *E. coli* U 5/41, *S. flexneri* ATCC 29903 y *S. dysenteriae* ATCC 13313; la mayoría de estas especies (a excepción de *E. coli* U 5/41) han sido reportadas como patógenas oportunistas en humanos y han sido aisladas principalmente de las heces, del tracto gastrointestinal y de heridas infectadas.

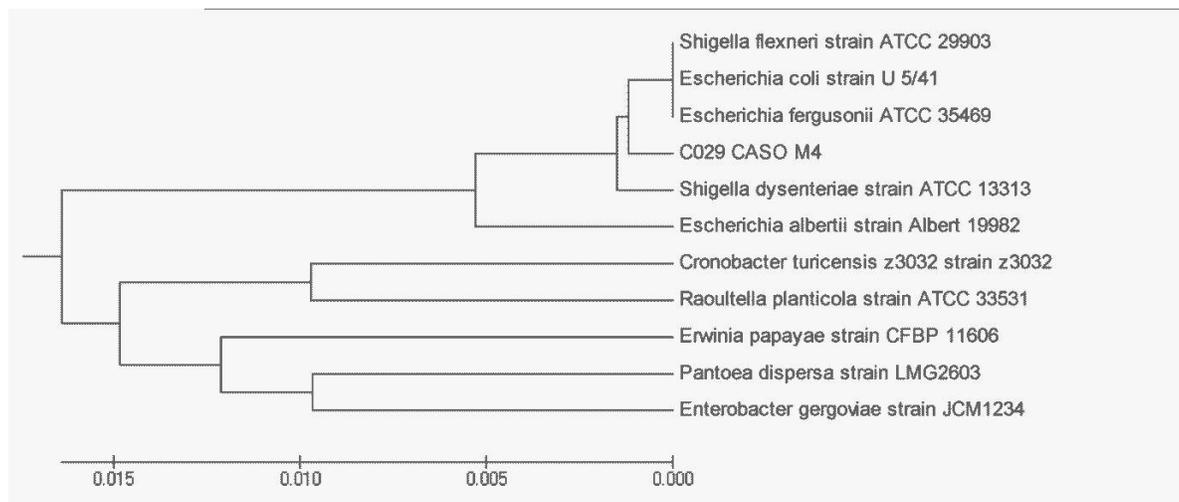


Figura 41. Árbol filogenético para la secuencia de la banda 60.7 proveniente de la muestra caso C029 con nivel de butirato alto (109.2 mmol/kg).

Tanto *S. flexneri*, *S. dysenteriae* y *E. fergusonii* se relacionan con procesos patológicos como diarrea y dolor abdominal agudo que puede estar acompañado de vómito, las cuales en el caso más grave pueden llevar al desarrollo de enfermedades como la *shigellosis* y la enteritis, integrando a estos microorganismos como factores etiológicos potenciales de trastornos agudos del tracto gastrointestinal. Adicionalmente *E. fergusonii* se ha reportada implicada en procesos inflamatorios tales como la cistitis.

De acuerdo al estudio, ambas secuencias pertenecientes a bandas intensas recuperadas de dos muestras de niños del grupo caso con niveles de butirato mayores a 50 mmol/kg exhibieron el enriquecimiento de especies microbianas patogénicas particulares; la primera de ellas (M3, C006) mostró mayor cercanía con especies del phyla de los *Bacteroidetes*, a los que se ha asociado con capacidades incrementadas para la extracción energética de los componentes complejos de la dieta y que en casos de obesidad en adultos han mostrado un incremento en su proporción con respecto a la encontrada en individuos delgados.

La segunda secuencia (M4, C029) correspondió a una especie relacionada con las altamente patógenas *Shigella* y *Escherichia* que a pesar de no involucrarse de manera inmediata con la obesidad o con la dinámica microbiana del butirato se sabe que participan activamente en trastornos del sistema GI e incluso han sido encontradas en especial *E. fergusonii* en algunos procesos inflamatorios. Hasta este momento, no se puede realizar una conclusión determinante del hallazgo de estas especies en ambos casos; sin embargo, el enriquecimiento de especies microbianas particulares pudo observarse de manera interindividual.

5. CONCLUSIONES

Se estableció un método de extracción por fase sólida y el método analítico por HPLC de fase reversa para la cuantificación de butirato presente en muestras de heces; la sensibilidad, exactitud y precisión de ambos métodos fueron aceptables pero un análisis por estándar externo y la optimización de condiciones podría favorecer la cuantificación y el análisis de otras sustancias o metabolitos de interés presentes en la muestra biológica.

Se establecieron los métodos de biología molecular para llevar a cabo el análisis de comunidades microbianas en muestras de copro. Se obtuvo DNA de buena calidad y amplificable por PCR. La técnica de DGGE otorgó un panorama general de la diversidad de especies presentes en una muestra ambiental y aunque es una técnica laboriosa, es accesible en cuanto a costo y permite la visualización de especies predominantes en la muestra. Para determinar la afiliación filogenética del DNA recuperado de DGGE fue necesaria la clonación en vector previo a la secuenciación.

La evaluación de antecedentes familiares por cuestionario no indicó predisposición a la obesidad en ambos grupos de estudio, la genotipificación de genes marcadores de riesgo o protección no se llevó a cabo en este trabajo.

La ingesta calórica que fue evaluada por un recordatorio de 24 horas el cual mostró que el grupo control tuvo una ingesta mayor a la recomendada para sus características, mientras que el grupo caso tuvo una ingesta significativamente menor a la recomendada para su grupo. Así también, la ingesta del grupo caso fue menor que la ingesta del grupo control de manera significativa.

El análisis de los niveles de butirato mostró una variabilidad interindividual amplia. Los valores promedio no difirieron entre los grupos caso y control; sin embargo, se

observó una tendencia de pertenecer al grupo de individuos con niveles altos o bajos de butirato y esto no se asoció directamente con la presencia de obesidad. Asimismo, los niveles de butirato no se asociaron con la ingesta calórica ni con la somatometría del individuo por un análisis de componentes principales.

Un análisis de conglomerados para determinar el grado de similitud en la composición microbiana entre muestras (perfil de bandeo por DGGE) no mostró agrupamiento con respecto al grupo de clasificación (caso o control), del mismo modo no se pudo observar una asociación o formación de grupos con respecto a los niveles de butirato exhibidos por los individuos.

Un análisis de conglomerados llevado a cabo únicamente entre individuos de nivel bajo de butirato independientemente de la presencia de obesidad mostró que los individuos sanos con estos niveles de butirato compartían mayor similitud entre sí que con aquellos con la patología; el mismo análisis pero para los individuos con niveles altos de butirato mostró mayor similitud entre los individuos del grupo caso.

Una comparación entre la presencia y ausencia de bandas en los perfiles de casos y controles en base al cálculo de los coeficientes de similitud y divergencia no mostró diferencia entre los grupos debido a una amplia variabilidad. Un total de 11 bandas diferentes de concentración relativa elevada ($Cr > 0.10$) que se interpretó como enriquecimiento específico de especies pudieron observarse a lo largo de todas las muestras y de las que sólo 5 pudieron ser susceptibles a corte debido a las limitantes del método.

De las 5 bandas cortadas, únicamente dos fragmentos de DNA correspondientes a 16S rRNA se lograron clonar en vector dado que se tuvo un rendimiento bajo de la recuperación por electroelución. La secuenciación de los dos fragmentos de DNA (M3 y M4) ambos correspondientes a las muestras problema con niveles de butirato elevados

mostró una fuerte asociación de la primera de ellas con la especie *B. plebeius* del phyla *Bacteroidetes* mientras que la segunda se relacionó más fuertemente con las especies *S. flexneri* y *E. fergusonii* del phyla *Enterobacteriaceae*.

Debido a que existieron variaciones sustanciales a nivel interindividual, fue difícil establecer relaciones precisas entre la salud, la presencia y la abundancia relativa de comunidades microbianas específicas; por otra parte, cinco bandas de Cr elevada se encontraron en la mayoría de las muestras, estas fueron consideradas como parte de la reportada microbiota 'core'; sin embargo, su identidad y funciones se desconocen.

Una disbiosis en la composición de la microbiota puede ser identificada en un padecimiento dado pero para ello debe definirse primero la composición 'normal' de la microbiota del individuo antes de la patología para lo cual un estudio de seguimiento sería más adecuado que estudios de punto final como el presente.

La población de infantes Lactantes que participaron de este estudio mostraron que difiere la composición de la microbiota en estas edades tempranas con respecto a los niños de mayor edad (aquellos en los grupos caso y control). Los niveles de butirato en este conjunto pequeño de individuos fueron muy variables.

Schwartz y su grupo, observaron que la cantidad de AGCC producidos por la microbiota era aun más importante en el desarrollo de la obesidad en adultos que cambios en la composición de la microbiota misma (Schwartz et al., 2010a), lo anterior pudo observarse en el presente estudio ya que ninguna relación se pudo encontrar entre los perfiles de la composición microbiana y los niveles butirato, por lo que este no permite concluir de manera contundente la función que ejecuta la dinámica metabólica y terapéutica *in situ* de dicho metabolito.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [CDC] 2002. Centers for Disease Control and Prevention
- [OMS] 2010. Organización Mundial de la Salud.
- ACHOR, M., BENÍTEZ, N., BRAC, E. & BARSLUND, S. 2007. Obesidad Infantil. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*, 168, 34-38.
- AL-LAHHAM, S. H., PEPPELENBOSCH, M. P., ROELOFSEN, H., VONK, R. J. & VENEMA, K. 2010. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1801, 1175-83.
- AZCONA, C., ROMERO, A., BASTERO, P. & SANTAMARÍA, E. 2005. Obesidad infantil. *Revista Española de Obesidad*, 3, 26-39.
- BÄCKHED, F. 2009. Changes in Intestinal Microflora in Obesity: Cause or Consequence? *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 48, S56-S57.
- BÄCKHED, F., DING, H., WANG, T., HOOPER, L. V., KOH, G. Y., NAGY, A., SEMENKOVICH, C. F. & GORDON, J. I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15718-23.
- BARBARA, G., STANGHELLINI, V., BRANDI, G., CREMON, C., DI NARDO, G., DE GIORGIO, R. & CORINALDESI, R. 2005. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *The American journal of gastroenterology*, 100, 2560-8.
- BARTOSCH, S., WOODMANSEY, E. J., PATERSON, J. C., MCMURDO, M. E. & MACFARLANE, G. T. 2005. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40, 28-37.
- BERRUETA, L. A., GALLO, B. & VICENTE, F. 1995. A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia*, 40, 474 - 483.
- BIBILONI, R., MANGOLD, M., MADSEN, K. L., FEDORAK, R. N. & TANNOCK, G. W. 2006. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of medical microbiology*, 55, 1141-9.
- BIBILONI, R., SIMON, M. A., ALBRIGHT, C., SARTOR, B. & TANNOCK, G. W. 2005. Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE. *Letters in applied microbiology*, 41, 45-51.
- BLAUT, M. & CLAVEL, T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *The Journal of nutrition*, 137, 751S-5S.
- BOOIJINK, C. C., ZOETENDAL, E. G., KLEEREBEZEM, M. & DE VOS, W. M. 2007. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future microbiology*, 2, 285-95.
- BOZON, E. 1991. Acidos Grasos de Cadena Corta. *Rev. Col. CIRUGIA*, 6, 157 - 163.
- BREUER, R. I., SOERGEL, K. H., LASHNER, B. A., CHRIST, M. L., HANAUER, S. B., VANAGUNAS, A., HARIG, J. M., KESHAVARZIAN, A., ROBINSON, M., SELLIN, J. H., WEINBERG, D., VIDICAN, D. E., FLEMAL, K. L. & RADEMAKER, A. W. 1997. Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial. *Gut*, 40, 485-91.
- CANI, P. D. & DELZENNE, N. M. 2009. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current pharmaceutical design*, 15, 1546-58.

- CAVALLI-SFORZA, L. L. & EDWARDS, A. W. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics*, 19, 233-57.
- CERF-BENSUSSAN, N. & GABORIAU-ROUTHIAU, V. 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature reviews. Immunology*, 10, 735-44.
- COLLADO, M. C., CALABUIG, M. & SANZ, Y. 2007. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Current issues in intestinal microbiology*, 8, 9-14.
- CONTERNO, L., FAVA, F., VIOLA, R. & TUOHY, K. M. 2011. Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease? *Genes & nutrition*, 6, 241-60.
- COOK, S. I. & SELLIN, J. H. 1998. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 12, 499-507.
- CROCKER, M. K. & YANOVSKI, J. A. 2009. Pediatric obesity: etiology and treatment. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 38, 525-48.
- CHEN, H. M. & LIFSCHITZ, C. H. 1989. Preparation of fecal samples for assay of volatile fatty acids by gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Clinical chemistry*, 35, 74-6.
- DE ONIS, M., BLOSSNER, M. & BORGHI, E. 2010. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *The American journal of clinical nutrition*, 92, 1257-64.
- DELZENNE, N. M., CANI, P. D. & NEYRINCK, A. M. 2007. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *The Journal of nutrition*, 137, 2547S-2551S.
- DEN HOND, E., HIELE, M., EVENEPOEL, P., PEETERS, M., GHOOS, Y. & RUTGEERTS, P. 1998. In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 115, 584-90.
- DÍAZ, D., PEDRAZA, G. & REYNOSO, R. 2007. *Estandarización de un método de cromatografía de gases para la determinación de ácidos grasos de cadena corta en heces de rata.*
- DIBASE, J. K., ZHANG, H., CROWELL, M. D., KRAJMALNIK-BROWN, R., DECKER, G. A. & RITTMANN, B. E. 2008. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 83, 460-9.
- DICKSVED, J. 2008. Exploring the Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *Doctoral Thesis*, 75.
- DUNCAN, S. H., BARCENILLA, A., STEWART, C. S., PRYDE, S. E. & FLINT, H. J. 2002. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and environmental microbiology*, 68, 5186-90.
- DUNCAN, S. H., LOBLEY, G. E., HOLTROP, G., INCE, J., JOHNSTONE, A. M., LOUIS, P. & FLINT, H. J. 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity (Londres)*, 32, 1720-4.
- FALONY, G., VLACHOU, A., VERBRUGGHE, K. & DE VUYST, L. 2006. Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Applied and environmental microbiology*, 72, 7835-41.
- FERNANDES, J., RAO, A. V. & WOLEVER, T. M. 2000. Different substrates and methane producing status affect short-chain fatty acid profiles produced by In vitro fermentation of human feces. *The Journal of nutrition*, 130, 1932-6.
- GERRITSEN, J., SMIDT, H., RIJKERS, G. T. & DE VOS, W. M. 2011. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & nutrition*, 6, 209-40.

- GILL, S. R., POP, M., DEBOY, R. T., ECKBURG, P. B., TURNBAUGH, P. J., SAMUEL, B. S., GORDON, J. I., RELMAN, D. A., FRASER-LIGGETT, C. M. & NELSON, K. E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312, 1355-9.
- GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., ZABIELSKI, R. & VAN IMMERSEEL, F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition research reviews*, 23, 366-84.
- GUPTA, N., GOEL, K., SHAH, P. & MISRA, A. 2012. Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. *Endocrine reviews*, 33, 48-70.
- HAGUE, A., MANNING, A. M., HANLON, K. A., HUSCHTSCHA, L. I., HART, D. & PARASKEVA, C. 1993. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 55, 498-505.
- HAMER, H. M., JONKERS, D., VENEMA, K., VANHOUTVIN, S., TROOST, F. J. & BRUMMER, R. J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27, 104-19.
- HAMER, H. M., JONKERS, D. M., BAST, A., VANHOUTVIN, S. A., FISCHER, M. A., KODDE, A., TROOST, F. J., VENEMA, K. & BRUMMER, R. J. 2009. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clinical Nutrition*, 28, 88-93.
- HAMER, H. M., JONKERS, D. M., VANHOUTVIN, S. A., TROOST, F. J., RIJKERS, G., DE BRUINE, A., BAST, A., VENEMA, K. & BRUMMER, R. J. 2010. Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. *Clinical Nutrition*, 29, 738-44.
- HEHEMANN, J. H., CORREC, G., BARBEYRON, T., HELBERT, W., CZJZEK, M. & MICHEL, G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464, 908-12.
- HILDEBRANDT, M. A., HOFFMANN, C., SHERRILL-MIX, S. A., KEILBAUGH, S. A., HAMADY, M., CHEN, Y. Y., KNIGHT, R., AHIMA, R. S., BUSHMAN, F. & WU, G. D. 2009. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137, 1716-24 e1-2.
- INSP 2010. Crecen sobrepeso y obesidad infantil en México 1.1% al año.
- JONES, J. H., LENNARD-JONES, J. E., MORSON, B. C., CHAPMAN, M., SACKIN, M. J., SNEATH, P. H., SPICER, C. C. & CARD, W. I. 1973. Numerical taxonomy and discriminant analysis applied to non-specific colitis. *The Quarterly journal of medicine*, 42, 715-32.
- KALLIOMAKI, M., COLLADO, M. C., SALMINEN, S. & ISOLAURI, E. 2008. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American journal of clinical nutrition*, 87, 534-8.
- KALLIOMAKI, M., KIRJAVAINEN, P., EEROLA, E., KERO, P., SALMINEN, S. & ISOLAURI, E. 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 107, 129-34.
- KTSOYAN, Z., BELOBRODOVA, N., SEDRAKYAN, A., OSIPOV, G., KHACHATRYAN, Z., KELLY, D., MANUKYAN, G., ARAKELOVA, K., HOVHANNISYAN, A., OLENIN, A., ARAKELYAN, A., GHAZARYAN, K. & AMINOV, R. 2011. Profiles of microbial fatty acids in the human metabolome are disease-specific. *Frontiers in microbiology*, 1, 1-9.
- LEWIS, S. J. & HEATON, K. W. 1997. Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut*, 41, 245-51.

- LEY, R. E., BACKHED, F., TURNBAUGH, P., LOZUPONE, C. A., KNIGHT, R. D. & GORDON, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 11070-5.
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S. & GORDON, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022-3.
- LUHRS, H., GERKE, T., MULLER, J. G., MELCHER, R., SCHAUBER, J., BOXBERGE, F., SCHEPPACH, W. & MENZEL, T. 2002a. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 37, 458-66.
- LUHRS, H., KUDLICH, T., NEUMANN, M., SCHAUBER, J., MELCHER, R., GOSTNER, A., SCHEPPACH, W. & MENZEL, T. P. 2002b. Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB. *Anticancer research*, 22, 1561-8.
- MARIAT, D., FIRMESE, O., LEVENEZ, F., GUIMARAES, V., SOKOL, H., DORE, J., CORTIER, G. & FURET, J. P. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 9, 123.
- MATHS, A. 1998-2010. Gel Compar II: Today's foremost software for the analysis of banding patterns and fingerprints. Manual Version 6.5. *Gel Compar II Manual*.
- MCORIST, A. L., ABELL, G. C., COOKE, C. & NYLAND, K. 2008. Bacterial population dynamics and faecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in healthy humans. *The British journal of nutrition*, 100, 138-46.
- MILLION, M., MARANINCHI, M., HENRY, M., ARMOUGOM, F., RICHET, H., CARRIERI, P., VALERO, R., RACCAH, D., VIALETES, B. & RAOULT, D. 2011. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International Journal of Obesity (Londres)*.
- MORAES, S. A., BELTRAN ROSAS, J., MONDINI, L. & FREITAS, I. C. 2006. [Prevalence of overweight and obesity, and associated factors in school children from urban area in Chilpancingo, Guerrero, Mexico, 2004]. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 22, 1289-301.
- MURPHY, E. F., COTTER, P. D., HEALY, S., MARQUES, T. M., O'SULLIVAN, O., FOUHY, F., CLARKE, S. F., O'TOOLE, P. W., QUIGLEY, E. M., STANTON, C., ROSS, P. R., O'DOHERTY, R. M. & SHANAHAN, F. 2010. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*, 59, 1635-42.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C. & UITTERLINDEN, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59, 695-700.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127-41.
- NADAL, I., SANTACRUZ, A., MARCOS, A., WARNBERG, J., GARAGORRI, M., MORENO, L. A., MARTIN-MATILLAS, M., CAMPOY, C., MARTI, A., MOLERES, A., DELGADO, M., VEIGA, O. L., GARCIA-FUENTES, M., REDONDO, C. G. & SANZ, Y. 2009. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *International Journal of Obesity (Londres)*, 33, 758-67.
- NEEFS, J. M., VAN DE PEER, Y., HENDRIKS, L. & DE WACHTER, R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic acids research*, 18 Suppl, 2237-317.
- NEISH, A. S. 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136, 65-80.
- O'HARA, A. M. & SHANAHAN, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7, 688-93.

- OLAIZ-FERNÁNDEZ, G., RIVERA-DOMMARCO, J., SHAMAH-LEVY, T., ROJAS, R., VILLALPANDO-HERNÁNDEZ, S., HERNÁNDEZ-AVILA, M. & SEPÚLVEDA-AMOR, J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. *Instituto Nacional de Salud Pública*.
- OLSEN, G. J., PACE, N. R., NUEL, M., KAINE, B. P., GUPTA, R. & WOESE, C. R. 1985. Sequence of the 16S rRNA gene from the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus* and its evolutionary implications. *Journal of molecular evolution*, 22, 301-7.
- OSORIO, H. 2010. Aumenta el índice de sobrepeso en población infantil de México. *Instituto Nacional de Salud Pública*.
- PAYNE, A. N., CHASSARD, C., ZIMMERMANN, M., MÜLLER, P., STINCA, S. & LACROIX, C. 2011. The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization. *Nutrition and Diabetes*, 1, 1-8.
- PENDERS, J., THIJSS, C., VINK, C., STELMA, F. F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT, P. A. & STOBBERINGH, E. E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118, 511-21.
- POGGI-VARALDO, H. M., GARIBAY-ORIJEL, C., ZARATE-SEGURA, P. B., HERRERA-LOPEZ, D., RINDERKNECHT-SEIJAS, N. & GARCIA-MENA, J. Treatment of hazardous effluents: Research and development in México on simultaneous methanogenic-denitrification and methanogenic-aerobic bioreactor. Congreso Mundial ISWA 2005: Hacia un Sistema Integral de Gestión de Residuos Sólidos Urbanos, 2005 Buenos Aires, Argentina. 1-18.
- PRIETO, J. A., ANDRADE, F., ALADÁMIZ-ECHEVARRÍA, L. & SANJURJO, P. 2007. Análisis de ácidos grasos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. *Química Clínica*, 26, 66-72.
- QIN, J., LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K. S., MANICHANH, C., NIELSEN, T., PONS, N., LEVENEZ, F., YAMADA, T., MENDE, D. R., LI, J., XU, J., LI, S., LI, D., CAO, J., WANG, B., LIANG, H., ZHENG, H., XIE, Y., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J. M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H. B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, C., JIAN, M., ZHOU, Y., LI, Y., ZHANG, X., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORE, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN, K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBACH, J., BORK, P. & EHRlich, S. D. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59-65.
- REINHARDT, C., REIGSTAD, C. S. & BÄCKHED, F. 2009. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 48, 249-56.
- RENOM, G., BULOIS, P., HAFRAOUI, S., COLOMBEL, J. F. & DEGAND, P. M. 2001. Simple gas chromatography analysis of faecal butyrate: application to patients at risk of pouchitis. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 39, 15-9.
- ROEDIGER, W. E. 1980a. Anaerobic bacteria, the colon and colitis. *The Australian and New Zealand journal of surgery*, 50, 73-5.
- ROEDIGER, W. E. 1980b. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet*, 2, 712-5.
- ROEDIGER, W. E. 1980c. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21, 793-8.
- RUCKLE, J., JACOBS, M., KRAMER, W., PEARSALL, A. E., KUMAR, R., UNDERWOOD, K. W., SEEHRA, J., YANG, Y., CONDON, C. H. & SHERMAN, M. L. 2009. Single-dose, randomized, double-blind, placebo-controlled study of ACE-011 (ActRIIA-IgG1) in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24, 744-52.

- RUIZ, V., PUIG, Y. & ACOSTA, M. 2010. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 29, 364-397.
- SAMUEL, B. S., SHAITO, A., MOTOIKE, T., REY, F. E., BACKHED, F., MANCHESTER, J. K., HAMMER, R. E., WILLIAMS, S. C., CROWLEY, J., YANAGISAWA, M. & GORDON, J. I. 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 16767-72.
- SANTACRUZ, A., MARCOS, A., WARNBERG, J., MARTI, A., MARTIN-MATILLAS, M., CAMPOY, C., MORENO, L. A., VEIGA, O., REDONDO-FIGUERO, C., GARAGORRI, J. M., AZCONA, C., DELGADO, M., GARCIA-FUENTES, M., COLLADO, M. C. & SANZ, Y. 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 1906-15.
- SANZ, Y., SANTACRUZ, A. & DE PALMA, G. 2008. Insights into the roles of gut microbes in obesity. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008, 829101.
- SCARPELLINI, E., CAMPANALE, M., LEONE, D., PURCHIARONI, F., VITALE, G., LAURITANO, E. C. & GASBARRINI, A. 2010. Gut microbiota and obesity. *Internal and emergency medicine*, 5 Suppl 1, S53-6.
- SCHÄFER, K. 1994. Analysis of Short Chain Fatty Acids from Different Intestinal Samples. I. By Packed Column Gas Chromatography. *Chromatographia*, 39, 706-712.
- SCHWIERTZ, A., JACOBI, M., FRICK, J. S., RICHTER, M., RUSCH, K. & KOHLER, H. 2010a. Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *The Journal of pediatrics*, 157, 240-244 e1.
- SCHWIERTZ, A., TARAS, D., SCHAFFER, K., BEIJER, S., BOS, N. A., DONUS, C. & HARDT, P. D. 2010b. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*, 18, 190-5.
- SEGAIN, J. P., RAINGEARD DE LA BLETIERE, D., BOURREILLE, A., LERAY, V., GERVOIS, N., ROSALES, C., FERRIER, L., BONNET, C., BLOTTIERE, H. M. & GALMICHE, J. P. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47, 397-403.
- SHAH, P., MISRA, A., GUPTA, N., HAZRA, D. K., GUPTA, R., SETH, P., AGARWAL, A., GUPTA, A. K., JAIN, A., KULSHRESHTA, A., HAZRA, N., KHANNA, P., GANGWAR, P. K., BANSAL, S., TALLIKOTI, P., MOHAN, I., BHARGAVA, R., SHARMA, R., GULATI, S., BHARADWAJ, S., PANDEY, R. M. & GOEL, K. 2010. Improvement in nutrition-related knowledge and behaviour of urban Asian Indian school children: findings from the 'Medical education for children/Adolescents for Realistic prevention of obesity and diabetes and for healthy aGeing' (MARG) intervention study. *The British journal of nutrition*, 104, 427-36.
- SHU-HUI, C. & YEN-JUN, C. 2002. Analysis of fatty acids by column liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 465, 145-155.
- SJOGREN, Y. M., JENMALM, M. C., BOTTCHER, M. F., BJORKSTEN, B. & SVERREMARK-EKSTROM, E. 2009. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39, 518-26.
- SPILLER, G. A., CHERNOFF, M. C., HILL, R. A., GATES, J. E., NASSAR, J. J. & SHIPLEY, E. A. 1980. Effect of purified cellulose, pectin, and a low-residue diet on fecal volatile fatty acids, transit time, and fecal weight in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 33, 754-9.
- SSA 2010. Acuerdo Nacional para la salud alimentaria.
- SU, J., ZHANG, N. & HO, P. C. 2004. Determination of tributyrin and its metabolite butyrate in Wistar rat plasma samples by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 18, 2217-22.

- TAMURA, K., NEI, M. & KUMAR, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 1103-11035.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*, in press.
- TANNOCK, G. W. 2002a. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *European journal of clinical nutrition*, 56 Suppl 4, S44-9.
- TANNOCK, G. W. 2002b. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *The British journal of nutrition*, 87 Suppl 2, S199-201.
- TOPPING, D. L. & CLIFTON, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, 81, 1031-64.
- TORII, T., KANEMITSU, K., WADA, T., ITOH, S., KINUGAWA, K. & HAGIWARA, A. 2010. Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability. *Annals of clinical biochemistry*, 47, 447-52.
- TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOURTIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-4.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R. & GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-31.
- VAN VLIET, M. J., HARMSSEN, H. J., DE BONT, E. S. & TISSING, W. J. 2010. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS pathogens*, 6, e1000879.
- VRIEZE, A., HOLLEMAN, F., ZOETENDAL, E. G., DE VOS, W. M., HOEKSTRA, J. B. & NIEUWDORP, M. 2010. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, 53, 606-13.
- WANG, M., AHRNE, S., JEPPSSON, B. & MOLIN, G. 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS microbiology ecology*, 54, 219-31.
- WANG, Y., HOENIG, J. D., MALIN, K. J., QAMAR, S., PETROF, E. O., SUN, J., ANTONOPOULOS, D. A., CHANG, E. B. & CLAUD, E. C. 2009. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *The ISME journal*, 3, 944-54.
- WEIGEL, C., KOKOCINSKI, K., LEDERER, P., DOTSCHE, J., RASCHER, W. & KNERR, I. 2008. Childhood obesity: concept, feasibility, and interim results of a local group-based, long-term treatment program. *Journal of nutrition education and behavior*, 40, 369-73.
- WEISS, R., DZIURA, J., BURGERT, T. S., TAMBORLANE, W. V., TAKSALI, S. E., YECKEL, C. W., ALLEN, K., LOPES, M., SAVOYE, M., MORRISON, J., SHERWIN, R. S. & CAPRIO, S. 2004. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *The New England journal of medicine*, 350, 2362-74.
- WEXLER, H. M. 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical microbiology reviews*, 20, 593-621.
- WOLLOWSKI, I., RECKEMMER, G. & POOL-ZOBEL, L. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *The American journal of clinical nutrition*, 73, 451S-455S.
- WONG, J. M., DE SOUZA, R., KENDALL, C. W., EMAM, A. & JENKINS, D. J. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 40, 235-43.

- YUN, J. W. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature - A review. *Phytochemistry*, 71, 1625-1641.
- ZÁRATE, P. 2005. Comparación del desempeño de dos reactores anaerobios en la remoción de PCE. *Cinvestav*, Tesis de maestría, 25-27.
- ZHANG, H., DIBASE, J. K., ZUCCOLO, A., KUDRNA, D., BRAIDOTTI, M., YU, Y., PARAMESWARAN, P., CROWELL, M. D., WING, R., RITTMANN, B. E. & KRAJMALNIK-BROWN, R. 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 2365-70.
- ZHANG, X., YAN, X., GAO, P., WANG, L., ZHOU, Z. & ZHAO, L. 2005. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *Journal of microbiological methods*, 60, 1-11.
- ZORAN, D. L., TURNER, N. D., TADDEO, S. S., CHAPKIN, R. S. & LUPTON, J. R. 1997. Wheat bran diet reduces tumor incidence in a rat model of colon cancer independent of effects on distal luminal butyrate concentrations. *The Journal of nutrition*, 127, 2217-25.

7. ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

México, D.F. a ____ de _____ de 20__

Por medio de la presente autorizo que mi hijo (a) o tutorado (a) _____
 _____ participe en el protocolo de investigación titulado:

‘ASOCIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL CON LOS NIVELES DE BUTIRATO EN LA OBESIDAD INFANTIL’.

El objetivo del estudio es Determinar una asociación entre los niveles de butirato y la composición de la microbiota en presencia o ausencia de obesidad infantil.

Y se me ha explicado que su participación consistirá en otorgar una muestra de excremento recolectada máximo un día anterior al estudio y mantenerla en refrigeración. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de la participación del niño en el estudio, y que son los siguientes: incomodidad con el manejo y recolección de heces.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento que pudiera ser ventajoso, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservamos el derecho de retirarnos del estudio en cualquier momento en que lo consideremos conveniente.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se le identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a la permanencia de mi representado (a) en el mismo.

 Nombre y firma de ambos padres o tutores o del representante legal

 Dr. Carlos Hoyo Vadillo

 Dr. Jaime García Mena

Números telefónicos a los cuales se puede comunicar en caso de emergencia, dudas y/o preguntas relacionadas con el estudio: 57473800 Ext. 5327.

ANEXO 2. CUESTIONARIO DE ANTECEDENTES CLÍNICO-FAMILIARES

Folio No. _____

Datos clínicos	
<i>Dejar esta sección en blanco</i>	
Peso _____	Talla _____
IMC _____	Pc _____
IMG _____	Pc _____

Datos generales del niño (a)			
Nombre (s) _____			
Apellido Materno _____			
Apellido Paterno _____			
Edad _____	Género: Femenino		Masculino
Estatus escolar: Alumno	Ex alumno	Externo	

Historia Clínica y clínico familiar		
El menor padece alguna enfermedad:	Sí	No
¿Cuál? _____		
Actualmente está medicado:	Sí	No
¿Medicamento (s) administrado (s)? _____		
El menor padece alguna alergia:	Sí	No
Seleccione la opción correcta si alguno de los padres o hermanos padece alguna de las siguientes enfermedades:		
Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Obesidad, sobrepeso
Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Diabetes, síndrome metabólico
Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Hipertensión arterial
Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Cáncer
Otra, ¿Cuál? _____		

 Nombre y firma del padre o tutor que autoriza

ANEXO 3. RECORDATORIO NUTRICIONAL DE 24 HORAS DE PASOS MÚLTIPLES

Nombre: _____

Fecha: _____

1.- Lista rápida

	Alimentos consumidos	Horario y lugar
Desayuno		
Media mañana		
Comida		
Media Tarde		
Cena		

2.- Lista de alimentos olvidados

De la siguiente lista diga si consumió alguno de los alimentos mencionados:

Cantidad

Café con azúcar

Té con azúcar

Leche

Yogur

Chocolate en barra

Caramelos

Galletas

Frituras

Mermelada

Cajeta

Cacahuates

Nueces

Jugos industrializados

Refrescos

Agua de fruta o sabor

Agua natural

Bebidas alcohólicas

¿Lo anterior refleja su modo habitual de alimentación? Si No

¿Por qué?

3.- Descripción detallada de los alimentos

	Alimento	Ingredientes	Cantidad	Modo de preparación
Desayuno				
Media mañana				
Comida				
Media tarde				
Cena				

ANEXO 4. PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR PARA LA RECOLECCIÓN DE LAS HECES

1. La muestra será recolectada por la MADRE del niño (a) un día anterior al análisis o en su defecto el mismo día por la mañana.
2. Es necesario que la recolección se haga en el día especificado (29 de MAYO de 2011 ó 30 mayo por la mañana).
3. El padre o madre debe etiquetar debidamente el recipiente de recolección con el NÚMERO DE FOLIO otorgado y llenar los formatos anexos.
4. Durante al menos tres días previos a la prueba, el niño deberá evitar tomar medicamentos o si esto no es posible se debe INDICAR en el formato, el TIPO de medicamento utilizado principalmente si se trata de antiparasitarios, antibióticos, antidiarreicos, laxantes o purgantes.
5. Una vez recolectadas las heces en el recipiente, este deberá guardarse dentro de una bolsa plástica bien cerrada dentro del refrigerador.

Recipiente de recolección

6. Se otorgará un recipiente de recolección especial para heces, el cual consiste en un vaso estéril de boca ancha y tapa hermética.
7. También se entregará a los padres una bolsa plástica, una etiqueta FOLIADA y un abatelenguas.

Recolección de la muestra

8. El niño debe defecar sobre un pedacito de plástico u hoja de papel para poder tomar la muestra, por NINGÚN motivo deben recolectarse heces del inodoro o mezcladas con orina, papel higiénico, agua o jabón.
9. La muestra de heces debe ser del tamaño aproximado de una NUEZ, por lo que NO es necesario llenar el frasco, una porción adecuada puede obtenerse con el abatelenguas proporcionado.
10. Una vez recolectada la muestra, tapar el recipiente y checar que éste quede completamente cerrado.
11. Colocar los datos requeridos en la ETIQUETA proporcionada y pegarla sobre el vaso, NO la pegue en la tapa del recipiente. Guarde en bolsa plástica bien cerrada y REFRIGERE.

No. de Folio: **COXX**

Fecha de Recolección: _____

Hora de Recolección: _____

ANEXO 5. APROBACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA DEL CINVESTAV



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**COMITÉ DE BIOÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS
(COBISH)-CINVESTAV**

DICTAMEN

Director del Proyecto: Dr. Carlos Hoyo Vadillo

Departamento: Departamento de Farmacología

Título Del Proyecto: *“Asociación de la composición de la microbiota intestinal con los niveles de butirato en la obesidad infantil”.*

El Comité de Bioética para la Investigación en Seres Humanos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, después de revisar su proyecto y en cumplimiento con las reglas de la Ley General de Salud en materia de Investigación y la Declaración Internacional de Helsinki dictamina:

APROBAR EL PROYECTO *“Asociación de la composición de la microbiota intestinal con los niveles de butirato en la obesidad infantil”*, pues el mismo cumple con los lineamientos bioéticos establecidos para la investigación en seres humanos o sus tejidos.

Se firma la presente a los 20 días del mes de Septiembre de 2011, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

pa. Raúl Mena López
Dr. Raúl Mena López
Presidente del COBISH

ANEXO 6. MATRICES DE DATOS OBTENIDOS POR ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N del análisis
Peso	25.4500	14.66449	14
Talla	114.2857	20.52177	14
IMC	18.0236	3.77214	14
Pc	66.3571	31.25234	14
Edad	6.2500	3.32097	14
Género	1.3571	.49725	14
Butírico	46.1321	43.78780	14
Des	34.0857	36.15658	14
Proteínas	13.9643	6.75478	14
Lípidos	23.4143	10.20888	14
Carbohidratos	47.7029	20.61084	14
Bandas	14.5714	3.34467	14

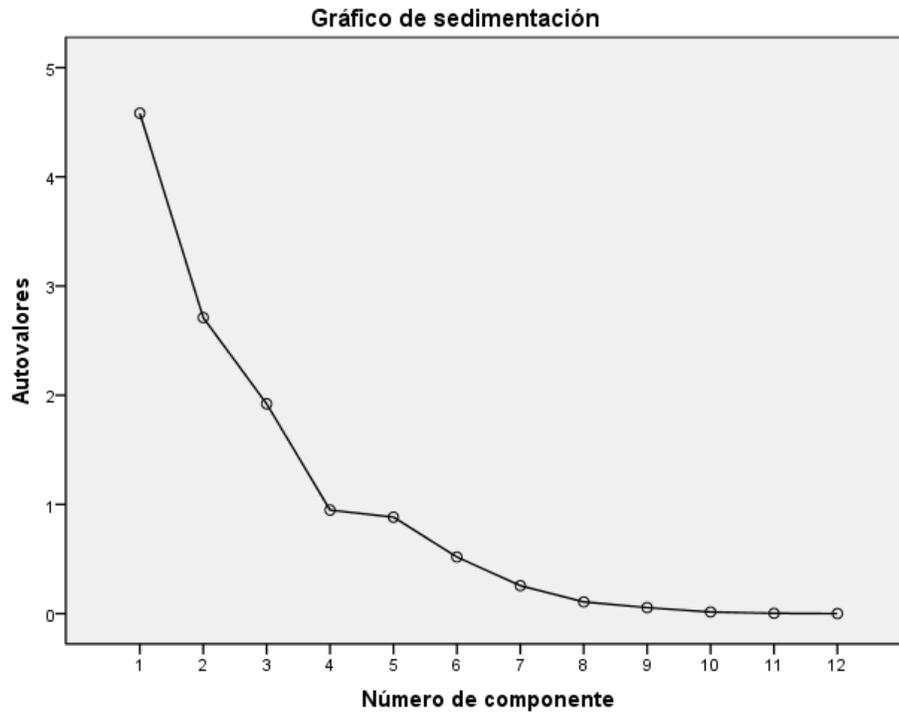
KMO y prueba de Bartlett

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.	.367
Prueba de esfericidad de Chi-cuadrado aproximado	175.453
Bartlett	gl
	66
	Sig.
	.000

Comunalidades

	Inicial	Extracción
Peso	1.000	.984
Talla	1.000	.878
IMC	1.000	.803
Pc	1.000	.780
Edad	1.000	.812
Género	1.000	.501
Butírico	1.000	.735
Des	1.000	.400
Proteínas	1.000	.884
Lípidos	1.000	.953
Carbohidratos	1.000	.884
Bandas	1.000	.601

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.



Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	4.583	38.190	38.190	4.583	38.190	38.190
2	2.710	22.587	60.777	2.710	22.587	60.777
3	1.921	16.008	76.784	1.921	16.008	76.784
4	.948	7.898	84.683			
5	.883	7.360	92.043			
6	.518	4.321	96.363			
7	.256	2.132	98.495			
8	.107	.893	99.388			
9	.055	.457	99.845			
10	.015	.126	99.971			
11	.003	.023	99.994			
12	.001	.006	100.000			

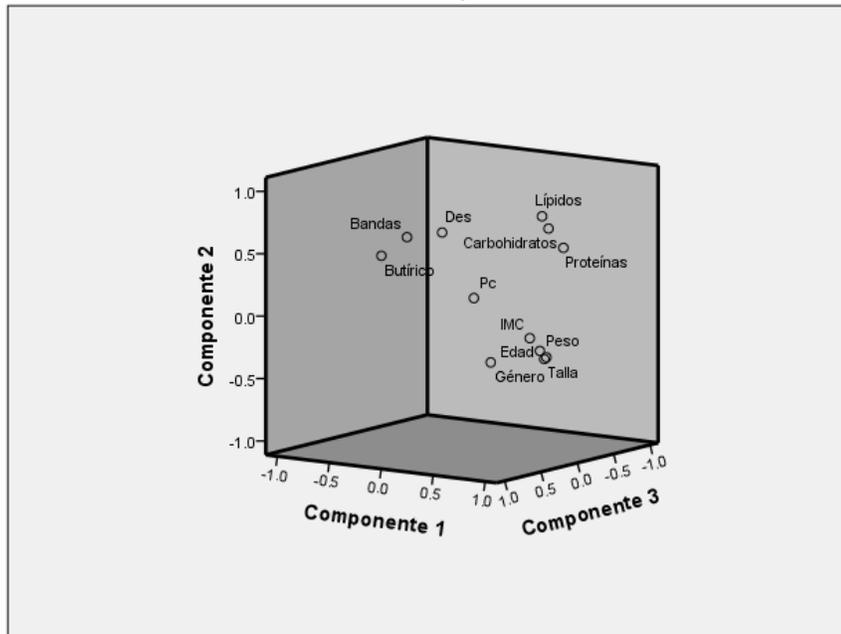
Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Matriz de componentes^a

	Componente		
	1	2	3
Peso	.941	-.256	.184
Talla	.883	-.284	.131
IMC	.846	-.099	.277
Pc	.560	.245	.637
Edad	.860	-.217	.158
Género	-.072	-.498	-.498
Butírico	-.348	.489	.612
Des	-.176	.607	.021
Proteínas	.635	.493	-.488
Lípidos	.492	.744	-.398
Carbohidratos	.531	.645	-.431
Bandas	-.252	.617	.397

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

a. 3 componentes extraídos

Gráfico de componentes

Matriz de correlaciones^a

		Peso	Talla	IMC	Pc	Edad	Género	Butírico	Desv Est	Proteínas	Lípidos	Carbs	Bandas
Correlación	Peso	1.000	.953	.851	.536	.929	-.053	-.336	-.253	.376	.197	.233	-.332
	Talla	.953	1.000	.676	.367	.987	-.048	-.377	-.239	.313	.159	.227	-.267
	IMC	.851	.676	1.000	.781	.632	.023	-.100	-.227	.416	.253	.236	-.263
	Pc	.536	.367	.781	1.000	.359	-.311	.338	-.056	.194	.214	.224	.212
	Edad	.929	.987	.632	.359	1.000	-.105	-.340	-.119	.300	.169	.245	-.201
	Género	-.053	-.048	.023	-.311	-.105	1.000	-.329	-.237	-.074	-.172	-.113	-.456
	Butírico	-.336	-.377	-.100	.338	-.340	-.329	1.000	.442	-.231	-.005	-.176	.448
	Des	-.253	-.239	-.227	-.056	-.119	-.237	.442	1.000	.222	.269	.124	.240
	Proteínas	.376	.313	.416	.194	.300	-.074	-.231	.222	1.000	.853	.780	-.176
	Lípidos	.197	.159	.253	.214	.169	-.172	-.005	.269	.853	1.000	.929	.180
	Carbs	.233	.227	.236	.224	.245	-.113	-.176	.124	.780	.929	1.000	.208
	Bandas	-.332	-.267	-.263	.212	-.201	-.456	.448	.240	-.176	.180	.208	1.000
	Sig. (Unilateral)	Peso		.000	.000	.024	.000	.428	.120	.192	.092	.250	.211
Talla		.000		.004	.098	.000	.435	.092	.206	.138	.293	.218	.178
IMC		.000	.004		.000	.008	.469	.366	.218	.070	.191	.208	.182
Pc		.024	.098	.000		.104	.140	.119	.425	.253	.231	.221	.233
Edad		.000	.000	.008	.104		.361	.117	.343	.149	.282	.199	.246
Género		.428	.435	.469	.140	.361		.125	.207	.401	.278	.350	.051
Butírico		.120	.092	.366	.119	.117	.125		.057	.214	.493	.274	.054
Des		.192	.206	.218	.425	.343	.207	.057		.223	.176	.337	.205
Proteínas		.092	.138	.070	.253	.149	.401	.214	.223		.000	.001	.274
Lípidos		.250	.293	.191	.231	.282	.278	.493	.176	.000		.000	.269
Carbs		.211	.218	.208	.221	.199	.350	.274	.337	.001	.000		.238
Bandas		.123	.178	.182	.233	.246	.051	.054	.205	.274	.269	.238	

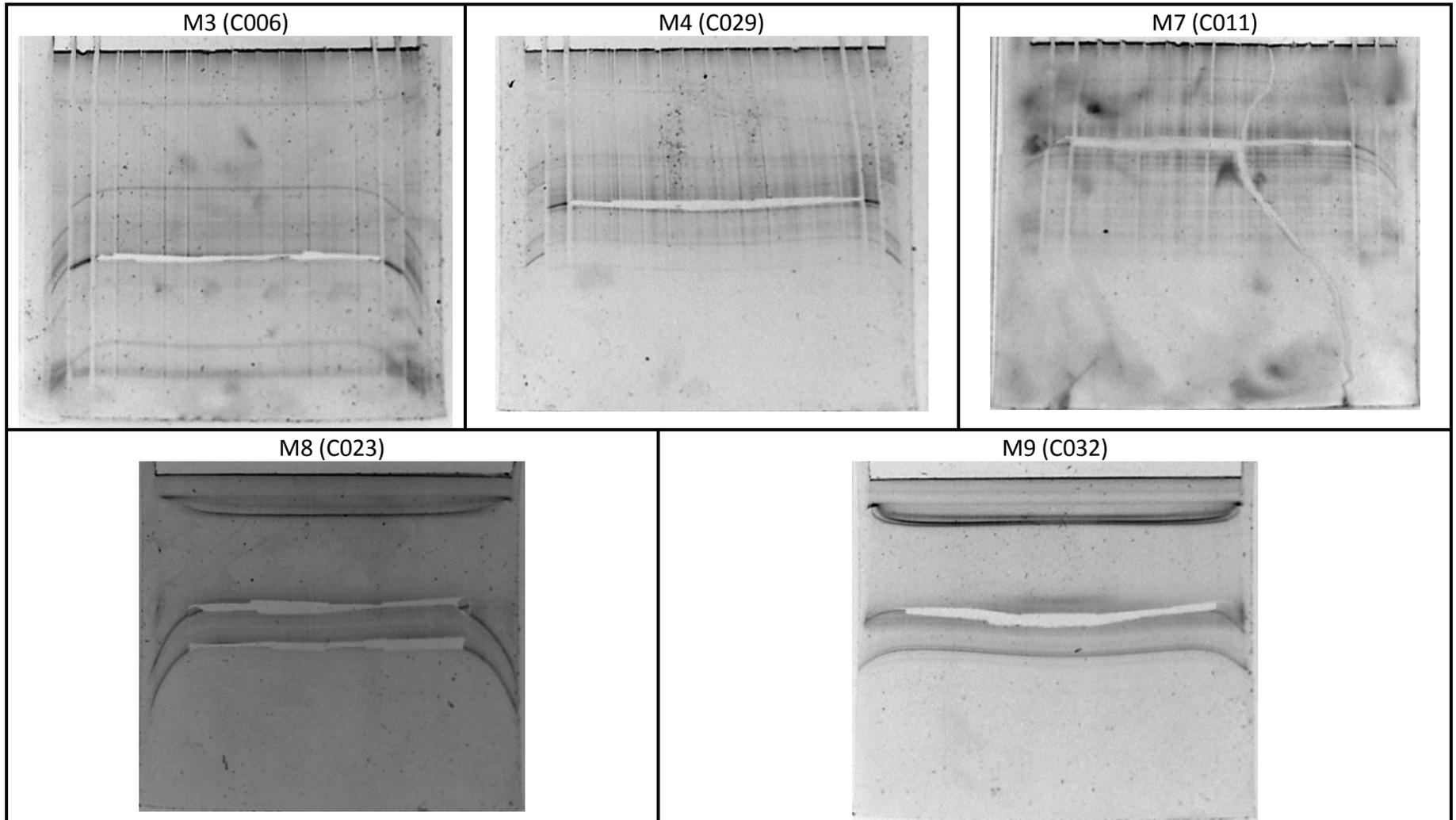
a. Determinante = 4.67E-010

Inversa de la matriz de correlaciones

	Peso	Talla	IMC	Pc	Edad	Género	Butírico	Desv Est	Proteínas	Lípidos	Carbs	Bandas
Peso	254.974	-32.065	-89.323	-17.859	-131.994	14.489	25.116	11.621	20.500	-59.651	43.405	27.755
Talla	-32.065	617.561	99.132	-76.214	-601.487	-39.711	2.109	101.846	-68.025	-120.884	154.742	9.900
IMC	-89.323	99.132	64.989	-22.628	-47.905	-14.743	-3.446	12.595	-19.195	-10.882	22.097	-5.109
Pc	-17.859	-76.214	-22.628	28.410	91.970	7.504	-8.262	-14.622	7.386	34.114	-36.976	-6.322
Edad	-131.994	-601.487	-47.905	91.970	694.246	32.114	-18.492	-110.942	56.361	163.645	-187.857	-28.120
Género	14.489	-39.711	-14.743	7.504	32.114	5.536	.351	-6.056	6.273	7.434	-11.005	1.055
Butírico	25.116	2.109	-3.446	-8.262	-18.492	.351	7.497	1.045	3.624	-14.850	12.346	3.330
Des	11.621	101.846	12.595	-14.622	-110.942	-6.056	1.045	19.997	-11.877	-24.825	30.292	3.253
Proteínas	20.500	-68.025	-19.195	7.386	56.361	6.273	3.624	-11.877	17.824	1.622	-13.492	3.070
Lípidos	-59.651	-120.884	-10.882	34.114	163.645	7.434	-14.850	-24.825	1.622	69.691	-65.970	-11.874
Carbs	43.405	154.742	22.097	-36.976	-187.857	-11.005	12.346	30.292	-13.492	-65.970	72.000	8.393
Bandas	27.755	9.900	-5.109	-6.322	-28.120	1.055	3.330	3.253	3.070	-11.874	8.393	6.349

50.5	0	0	0	41	9	0.1	54	6	0.1	20	4.8	0.0
52.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	61	13	0.1	31	3.4	0.0	0	0	0
55.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	5	0.0
56.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57.4	35	6	0.1	0	0	0	32	3.6	0.0	17	4.1	0.0
59.2	95	16	0.1	0	0	0	47	5.2	0.0	17	4.1	0.0
60.7	0	0	0	0	0	0	26	2.9	0.0	0	0	0
62.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63.4	25	4.3	0.0	27	5.9	0.0	29	3.2	0.0	18	4.3	0.0
65.1	19	3.3	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68.65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69.7	16	2.7	0.0	34	7.4	0.1	43	4.8	0.0	35	8.4	0.1
71.6	31	5.3	0.0	14	3.1	0.0	0	0	0	29	7	0.1
72.7	31	5.3	0.0	20	4.4	0.0	44	4.9	0.0	35	8.4	0.1
74.2	65	11	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75.4	67	12	0.1	12	2.6	0.0	48	5.3	0.0	23	5.5	0.0
77.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	582	100	0.8	458	100	0.8	900	100	0.8	416	100	0.8

ANEXO 8. CORTE DE LAS BANDAS SELECCIONADAS PARA LA SECUENCIACIÓN



ANEXO 9. SECUENCIACIÓN Y DEPURACIÓN



S/N G:109 A:136 T:187 C:151
KB.bcp
KB 1.2 Cap:2

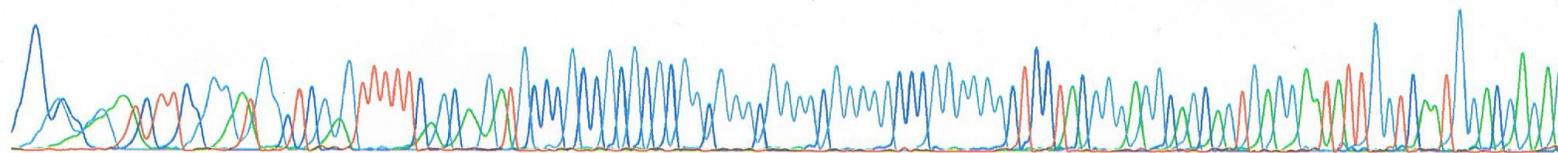
M3F3-1-12-2-31 PM
M3F

KB_310_POP6_BDTv3_36Rapid.mob
Pls 1079 to 7275 Pk1 Loc:1079

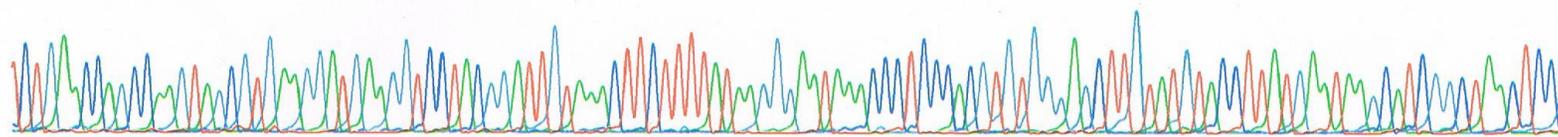
Version 5.2 Patch2 HiSQV Bases: 498 DORA

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
Mar 01.2012 02:31PM, GMT-06:00
Mar 01.2012 02:52PM, GMT-06:00
Spacing:11.84 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned

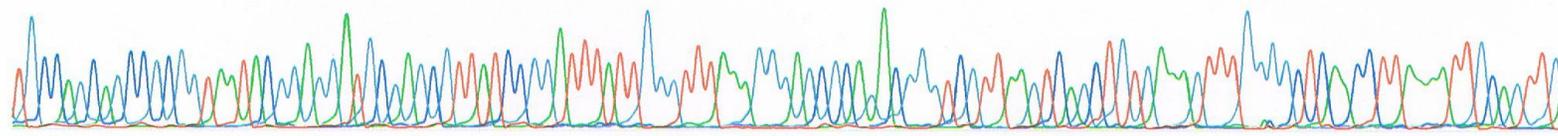
C C G CAAA TC TT CC GG /T GGCT CG /G TTTT CAACA GTT +CCC GCC GCSCGCGCG GGC GGGGCG GGGGCCCG GCG GCCT CCT FCGGG AGGCAGCAG TG AGG APTATT G GTCAAT GGACGAG AG



TCTGA FCCAGCCAA GTAGC GTGAAG GAT GAAGGT CCTAC GGATT GTAAACTTCTTTTAAAGGGAATAAACCC TCCACG TG TGGGAG CTPGTATGTAC CTTATG AATAAGCATCGGCTA ACTCCG



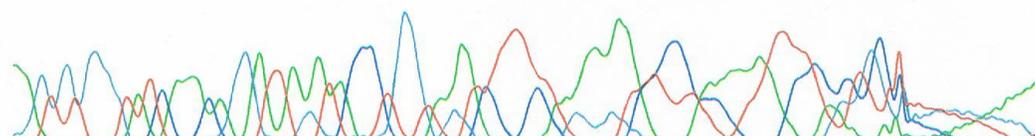
TGCCAGCAGCCCGGTAATACG GAG GATGCGAGCCT ATCCGGATTTATT GGGTTTAAA GGCAGCCAGACGGSTCCT TAAGTCAGCTGTGAAAAGTTT GGGGCTCAACCTTAAAATT GCA GTT G.



ATACT GGC GTCTT GAGTGC GGTT GAG GTGTGC GCAATT C GT GGTGTAGC GGTGAAAT (CTTAGATAT CAC GAA GAACTCCGATT CG GAA GGCA (CACACT/A TCC GTA ACT GAC (TT CAT C CTC CA



AACT CT GGCTATCAAACA GGTTA GATACCTGG TA GA CTTTCAAGAAGA CTCGCCAAA APTTTT CACCGCG TC



Printed on: Fri Mar 02.2012 10:20AM, GMT-06:00



S/N G:186 A:192 T:283 C:334
KB.bcp
KB 1.2 Cap:2

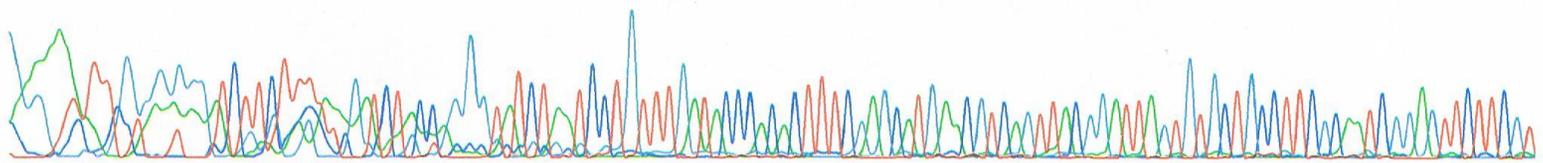
3R3-22-12-2-40 PM
3R

KB_310_POP6_BDTv3_36Rapid.mob
Pts 1256 to 7418 Pk1 Loc:1210

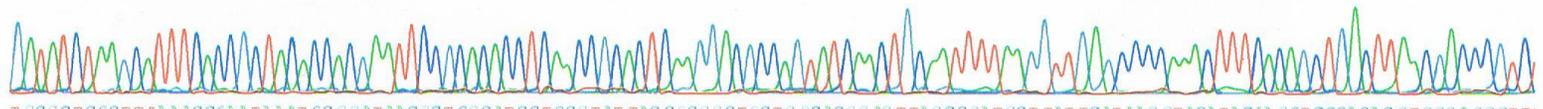
Version 5.2 Patch2 HiSQV Bases: 497 ALBERTO-DORA

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
Mar 22, 2012 02:40PM, GMT-06:00
Mar 22, 2012 03:01PM, GMT-06:00
Spacing:11.9 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned

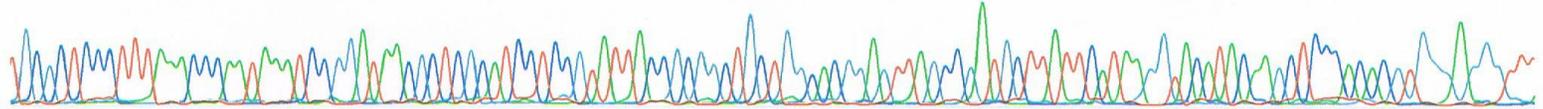
GAG JACTTCGTAAGACCTCTTCTTGTTCGTTCTTCCAGGGTATCTTATCCTGTTTGTACCCACACTTTCGAGCCTGAACCTCAGTTACGGTTAGTCTCTGCCTTCCTC/FATCGGTTTCTTCG1



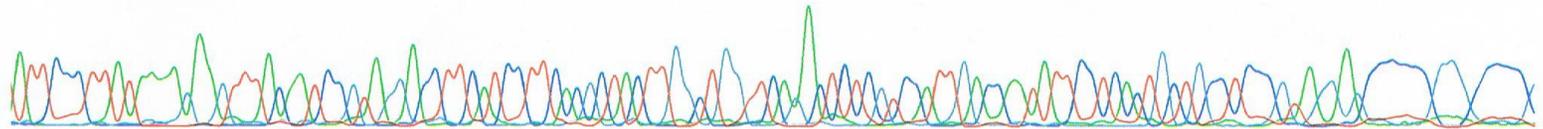
GATATCTAAGCCTTTTACCCTACACCACGAATTCCCCACACCTCFACCGCACTCPAGGACCCCACTATCAACTGCAATTTTAAAGCTTGAGCCCAAACTTTCACAGCTG/CTTAACGACCCGTC



TGCGCTCCCTTAAACCAATAAATCCGGATAACCTCCATCCTCCGTATPACCCGGCTCCTGECACGGFTTAGCCGATGCTTATTCATAAGGTACATAC/AGCTCCACACGTGGGAGGTTT



IATTCCTTATAAAGAAAGTTTACAATCCGTAGGACCTTCATCCTTCACCTACTTGTCTGTTTCAAGTCTCTGTCATTG/CCTCAATATTCCTCACTGCTCCCTCCCCTAGGAGCCCCCGGGCCCC



SCCCGCCC GCCGCGC GCGG CCGGCATCTTGTGAAA ACTCG ACCCTTCC GGAAGTCTGCCG C



Printed on: Fri Mar 23, 2012 09:38AM, GMT-06:00

Electropherogram Data Page 1 of 1



S/N G:59 A:61 T:94 C:78
KB.bcp
KB 1.2 Cap:4

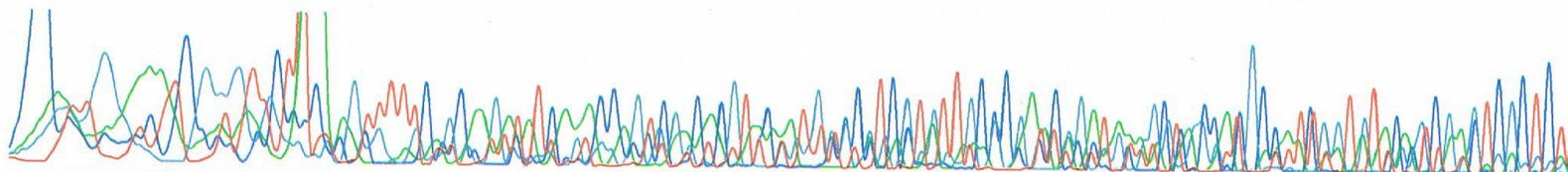
M4F3-1-12-4-40 PM
M4F

KB_310_POP6_BDTv3_36Rapid.mob
Pts 1078 to 7338 Pk1 Loc:1078

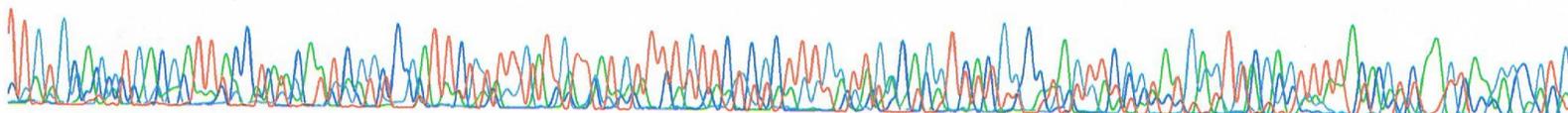
Version 5.2 Patch2 HiSQV Bases: 157 DORA

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
Mar 01,2012 04:40PM, GMT-06:00
Mar 01,2012 05:00PM, GMT-06:00
Spacing 12.09 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned

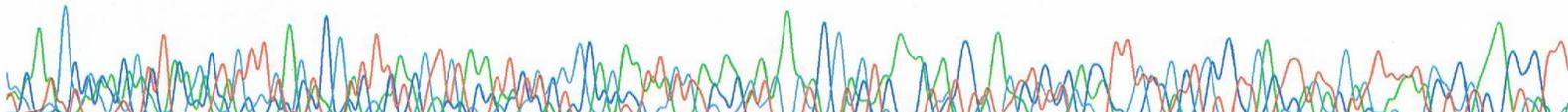
TG CATTGGTAAICGSGTTCTTCGAGTTTTCAGCA GATFTCAGACCACTCG CFCGTAAATGGCCGTCGTCTT GCCCGTTCGGATGTAACTA CCACGCCATCGGTGT/CCTCAGTCCCTCT



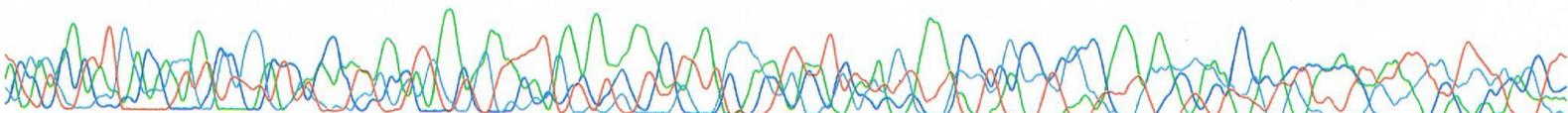
TTGTGCAGGTGACGATTACC TAACAATCGGTCGFTTCGTTTGTGTATCTTTTCTTCCTTTGGTTG(CAGGTCACGGCCTAGTTCGCTATCACTGCGAATTTT/CACTCAACTAAEGCCT



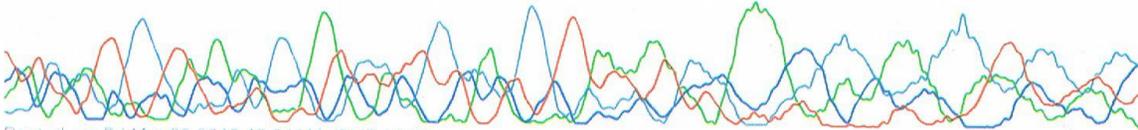
GGCATGCCAACGTTAAGCTGTTCAGTCGTTTACGTTAATTCGCT(CAGATTGGACACGAGACAGAGTCAATATCGAGTTCACACATTECCGCTGCTCTATTATTAGTTTTGGCTCACTCTT



ACGATCACFTGACAGGTCCTCGCTTFCATTCACTGAATCTTTTCACTCAACTAATGGGATTA TCTGTCTAFTCGTCGCTCGCCTAATACCGAAICGFTCTCTACTATTTGATGTCACCT



ICATGCAGTTTGGCTACAGCGCATCGTCTTGGTCGACTGGCTEATCAATGTC AAACCCGCGCAAGGGATATCGCAT



Printed on: Fri Mar 02,2012 10:24AM, GMT-06:00



S/N G38 A30 T36 C40
KB.bcp
KB 1.2 Cap:3

M4R3-1-12-3-36 PM
M4R

KB_310_POP6_BDTv3_36Rapid.mob
Pts 1087 to 7440 Pk1 Loc:1087

Version 5.2 Patch2 HiSQV Bases: 488 DORA

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310

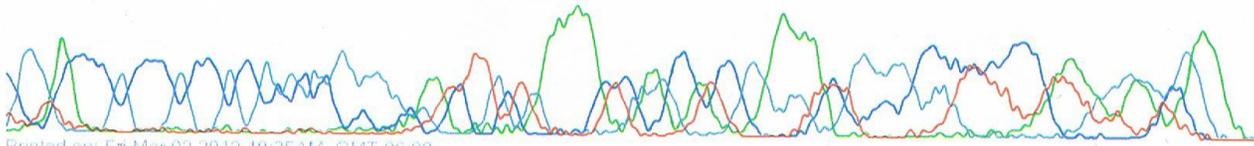
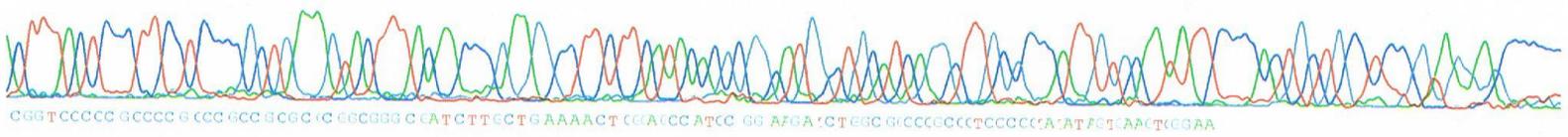
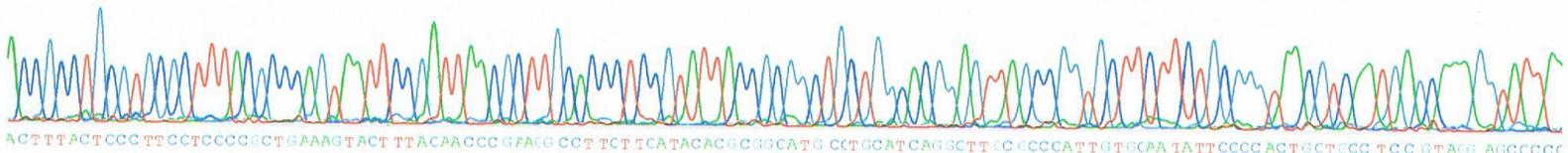
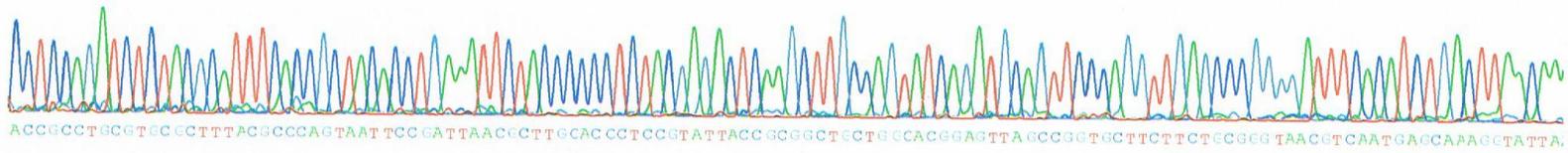
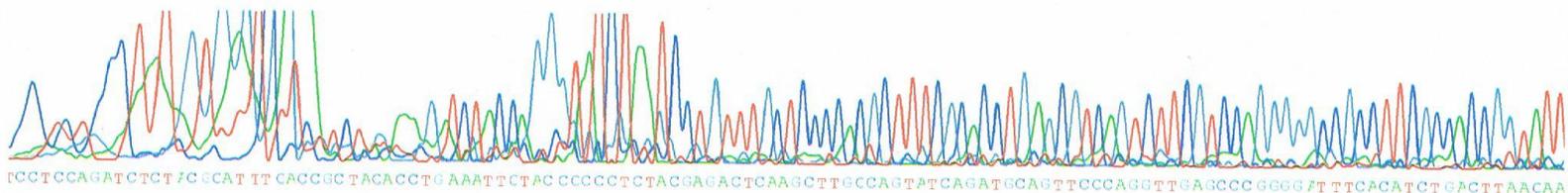
Mar 01 2012 03:36PM, GMT-06:00

Mar 01 2012 03:56PM, GMT-06:00

Spacing:11.81 Pts/Panel1500

Plate Name: Unassigned

C C A T C T C C C T A T T G T G T C T T C T T C T A C A A G T C T A C C A G G G T T C T A A T C C T G T T T C T C C C C A C G C T T T C G C A C C T G A G C C T C A G T C T T C C T C C A G G G G C C G C C T T C G C C A C C G G T A T T :



Depuración secuencia M3 (Vector NTI)

		1	50
C006 (Caso, M3)	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides xylanisolvens	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides salanitronis	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGG	
Bacteroides plebeius	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides massiliensis	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides coprocola	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGCGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Bacteroides acidifaciens strain A40	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
Consensus	(1)	TGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGA	
		51	100
C006 (Caso, M3)	(51)	AGGATGAAGGTCTCTACGGATTGTAAACTTCTTTTATAAGGGAATAAA	CCC
Bacteroides xylanisolvens	(51)	AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATATGGGAATAAA	GTA
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(51)	AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATACGGGAATAAA	GTG
Bacteroides salanitronis	(51)	AGGATGACTGCCCTACGGGTTGTAAACTCCTTTTATAAGGGAATAAA	ACC
Bacteroides plebeius	(51)	AGGATGAAGGTCTCTACGGATTGTAAACTTCTTTTATAAGGGAATAAA	ACC
Bacteroides massiliensis	(51)	AGGATGAAGGTTCTATGGATTGTAAACTTCTTTTATACGGGAATAAA	CGG
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(51)	AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATAGGGAATAAA	ACG
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(51)	AGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTTTTGTGCGGGAATAAA	GGA
Bacteroides coprocola	(51)	AGGATGAAGGTCTCTACGGATTGTAAACTTCTTTTATACGGGAATAAA	GTT
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(51)	AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATATGGGAATAAA	GTG
Bacteroides acidifaciens strain A40	(51)	AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATATGGGAATAAA	ATG
Consensus	(51)	AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATA	GGGAATAAA
		101	150
C006 (Caso, M3)	(101)	TCCACGTGTGGGAGCCTTGTATGTACCTTAT	GAATAAGCATCGGCTAAC
Bacteroides xylanisolvens	(101)	TTCCACGTGTGGGATTTTGTATGTACCATAT	GAATAAGGATCGGCTAAC
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(101)	CANGACGTGTGGCTTTTGTATGTACCGTAT	GAATAAGGATCGGCTAAC
Bacteroides salanitronis	(101)	TCCACGTGTGGGAGCCTTGTATGTACCTTAT	GAATAAGCATCGGCTAAC
Bacteroides plebeius	(101)	TCCACGTGTGGGAGCCTTGTATGTACCTTAT	GAATAAGCATCGGCTAAC
Bacteroides massiliensis	(101)	ATCCACGTGTGGATTTTGTATGTACCGTAT	GAATAAGGATCGGCTAAC
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(101)	GGCCACGTGTGGCCTTTGTATGTACCTTAT	GAATAAGGATCGGCTAAC
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(101)	ACCTACGTGTAGGTTTGTATGTACCGTAT	GAATAAGCATCGGCTAAC
Bacteroides coprocola	(101)	TCCTACGTGTAGGATTTTGTATGTACCGTAT	GAATAAGCATCGGCTAAC
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(101)	GTCCACGTGTGGACTTTTGTATGTACCATAT	GAATAAGGATCGGCTAAC
Bacteroides acidifaciens strain A40	(101)	TTCCACGTGTGGGATTTTGTATGTACCATAT	GAATAAGGATCGGCTAAC
Consensus	(101)	TCCACGTGTGGGATTTTGTATGTACCTAT	GAATAAGGATCGGCTAAC
		151	200

C006 (Caso, M3)	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides xylanisolvens	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides salanitronis	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides plebeius	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides massiliensis	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(151)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides coprocola	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT
Bacteroides acidifaciens strain A40	(150)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT
Consensus	(151)	TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT
		201 250
C006 (Caso, M3)	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGGTCTGTTAAGTCAGCTGTGAAAGT
Bacteroides xylanisolvens	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGGTGATTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGT
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGCGGGTTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGT
Bacteroides salanitronis	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGACGGATGTCAGTCAGCTGTGAAAGT
Bacteroides plebeius	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGGTCTGTTAAGTCAGCTGTGAAAGT
Bacteroides massiliensis	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGATGGGTTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGT
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGGTTCTTAAGTCAGTTGTGAAAGT
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(201)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGACGGGTTTAAAGTCAGCTGTGAAAGT
Bacteroides coprocola	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGGAGATTAAGTCAGTTGTGAAAGT
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGCGGATGTTAAGTCAGTTGTGAAAGT
Bacteroides acidifaciens strain A40	(200)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGGTGATTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGT
Consensus	(201)	TATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGACGGGTTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGT
		251 300
C006 (Caso, M3)	(250)	TTGGGGCTCAACCTTAAAAATTGCAGTTGATACTGGCGTCTTTGAGTGCAG
Bacteroides xylanisolvens	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGAAACTGGCAGTCTTTGAGTACAG
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGATACTGGCGACCTTTGAGTGCAG
Bacteroides salanitronis	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGAAACTGGCTTTCTTTGAGTGCAG
Bacteroides plebeius	(250)	TTGGGGCTCAACCTTAAAAATTGCAGTTGATACTGGCGTCTTTGAGTGCAG
Bacteroides massiliensis	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGATACTGGCAGTCTTTGAGTACAG
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGATACTGGGGCTCTTTGAGTGCAG
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(251)	TTGGGGCTCAACCTTAAAAATTGCAGTTGAAACTGGAGACCTTTGAGTACAG
Bacteroides coprocola	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGATACTGGTTTCTTTGAGTGCAG
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGATACTGGCAGTCTTTGAGTGCAG
Bacteroides acidifaciens strain A40	(250)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGAAACTGGCAGTCTTTGAGTACAG
Consensus	(251)	TTGCGGCTCAACCGTAAAAATTGCAGTTGATACTGGC TCTTTGAGTGCAG
		301 350
C006 (Caso, M3)	(300)	TTGAGGTGTGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACG
Bacteroides xylanisolvens	(300)	TAGAGGTGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACG

Bacteroides stercoris ATCC 43183	(300)	CAGAGGTAGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Bacteroides salanitronis	(300)	TCGAGGCAGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCA TAGATATCAGG
Bacteroides plebeius	(300)	TTGAGGTGTGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Bacteroides massiliensis	(300)	TTGAGGTAGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(300)	TATAGGCAGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(301)	TTGAGGCAGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Bacteroides coprocola	(300)	TTGAGGCAGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(300)	TAGAGGTGGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Bacteroides acidifaciens strain A40	(300)	TAGAGGTGGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
Consensus	(301)	T GAGGTAGCGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGG
		351 400
C006 (Caso, M3)	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCACACTAATCCGTAAGTACGTTTCATG
Bacteroides xylanisolvens	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTAGACTGCAACTGACACTGATG
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTTACTGGATTGTAAGTACGCTGATG
Bacteroides salanitronis	(350)	AAGAACC CCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAGGCCGCAACTGACGTTGATG
Bacteroides plebeius	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCACACTAAGCCGTAAGTACGTTTCATG
Bacteroides massiliensis	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTTACTAACCTGTAAGTACACTGATG
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTGGACTGTAAGTACGTTTCATG
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(351)	AAGAACC CCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAAGCCGCCACTGACGTTGAGG
Bacteroides coprocola	(350)	AAGAACC CCGATTGCGAAGGCAGCTTGCTAACTGTAAGTACGTTTCATG
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTGGAGTGTAACTGACGCTGATG
Bacteroides acidifaciens strain A40	(350)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTGGACTGCAACTGACACTGAGG
Consensus	(351)	AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTTACTAGACTGTAAGTACGTTGATG
		401 421
C006 (Caso, M3)	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Bacteroides xylanisolvens	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Bacteroides stercoris ATCC 43183	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Bacteroides salanitronis	(400)	CTCGAAAGTGC GGGTATCAAA
Bacteroides plebeius	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Bacteroides massiliensis	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Bacteroides helcogenes strain JCM 6297	(400)	CTCGAAAGTGC GGGTATCAAA
Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42	(401)	CTCGAAAGTGC GGGTATCAAA
Bacteroides coprocola	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Bacteroides caccae strain ATCC 43185	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Bacteroides acidifaciens strain A40	(400)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA
Consensus	(401)	CTCGAAAGTGTGGGTATCAAA

Depuración secuencia M4 (Vector NTI)

		1	50
C029 (Caso, M4)	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(1)	-GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Escherichia albertii strain Albert 19982	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Escherichia coli strain U 5/41	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCNCGTGT	
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Pantoea dispersa strain LMG2603	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
Consensus	(1)	TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT	
		51	100
C029 (Caso, M4)	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGGNT	
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(50)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Escherichia albertii strain Albert 19982	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Escherichia coli strain U 5/41	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Pantoea dispersa strain LMG2603	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAGCGG	
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGGAGCGT	
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGGAG	
Consensus	(51)	ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAG	
		101	150
C029 (Caso, M4)	(101)	TAAAGTTAATAACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(101)	TGTGGTTAATAACCGCAGTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGC	
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(101)	TGAGGTTAATAACCTTCANTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(100)	TGGAGTTAATAACCTTCATTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Escherichia albertii strain Albert 19982	(101)	TAAAGTTAATAACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Escherichia coli strain U 5/41	(101)	TAAAGTTAATAACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(101)	TAAAGTTAATAACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Pantoea dispersa strain LMG2603	(101)	TGAGGTTAATAACCTTYGCGATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(101)	TAAAGTTAATAACCTTAGCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGC	
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(101)	TAAAGTTAATAACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(101)	TAAAGTTAATAACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
Consensus	(101)	TAAAGTTAATAACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC	
		151	200
C029 (Caso, M4)	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG	

Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(150)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Escherichia albertii strain Albert 19982	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Escherichia coli strain U 5/41	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Pantoea dispersa strain LMG2603	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
Consensus	(151)	TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
		201 250
C029 (Caso, M4)	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(200)	GAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Escherichia albertii strain Albert 19982	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Escherichia coli strain U 5/41	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Pantoea dispersa strain LMG2603	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
Consensus	(201)	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
		251 300
C029 (Caso, M4)	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGT
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAAGCTTGAGT
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCGAACTGGCAGGCTTGAGT
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(250)	AATCCCCGGGCTTAACTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAGGCTTGAGT
Escherichia albertii strain Albert 19982	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGTCAGCTTGAGT
Escherichia coli strain U 5/41	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGT
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGT
Pantoea dispersa strain LMG2603	(251)	AATCCCCGGGCTTAACTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAGGCTTGAGT
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAAGCTTGAGT
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGT
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGT
Consensus	(251)	AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGT
		301 350
C029 (Caso, M4)	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT

Erwinia papayae strain CFBP 11606	(300)	CTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Escherichia albertii strain Albert 19982	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Escherichia coli strain U 5/41	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Pantoea dispersa strain LMG2603	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(301)	CTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
Consensus	(301)	CTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
		351 400
C029 (Caso, M4)	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(350)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAGACTGACGCT
Escherichia albertii strain Albert 19982	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Escherichia coli strain U 5/41	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Pantoea dispersa strain LMG2603	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAGACTGACGCT
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
Consensus	(351)	CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
		401 426
C029 (Caso, M4)	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Cronobacter turicensis z3032 strain z3032	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Enterobacter gergoviae strain JCM1234	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Erwinia papayae strain CFBP 11606	(400)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Escherichia albertii strain Albert 19982	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Escherichia coli strain U 5/41	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Escherichia fergusonii ATCC 35469	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Pantoea dispersa strain LMG2603	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Raoultella planticola strain ATCC 33531	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Shigella dysenteriae strain ATCC 13313	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Shigella flexneri strain ATCC 29903	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA-
Consensus	(401)	CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA

ANEXO 10. TABLAS DE IDENTIDAD UTILIZANDO LA HERRAMIENTA BLAST

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NR_041277.1	Bacteroides plebeius DSM 17135 strain M12 16S ribosomal RNA, partial sequence	765	765	100%	0	99%
NR_041278.1	Bacteroides coprocola DSM 17136 strain M16 16S ribosomal RNA, partial sequence	616	616	100%	2.00E-176	93%
NR_041447.1	Bacteroides salanitronis DSM 18170 strain JCM 13657 16S ribosomal RNA, partial sequence	593	593	100%	7.00E-170	92%
NR_042745.1	Bacteroides massiliensis strain B84634 16S ribosomal RNA, partial sequence	588	588	100%	3.00E-168	92%
NR_042499.1	Bacteroides xylanisolvens strain : XB1A 16S ribosomal RNA, partial sequence	566	566	100%	2.00E-161	91%
NR_026242.1	Bacteroides caccae strain ATCC 43185 16S ribosomal RNA, partial sequence	560	560	100%	7.00E-160	91%
NR_028607.1	Bacteroides acidifaciens strain A40 16S ribosomal RNA, partial sequence	555	555	100%	3.00E-158	91%
NR_027196.1	Bacteroides stercoris ATCC 43183 16S ribosomal RNA, partial sequence	551	551	100%	4.00E-157	90%
NR_041461.1	Bacteroides coprophilus DSM 18228 strain CB42 (= JCM 13818, = DSM 18228) 16S ribosomal RNA, partial sequence	549	549	100%	2.00E-156	90%
NR_041279.1	Bacteroides helcogenes strain JCM 6297 16S ribosomal RNA, partial sequence	549	549	100%	2.00E-156	90%
NR_041313.1	Bacteroides finegoldii DSM 17565 strain JCM 13345 16S ribosomal RNA, partial sequence	544	544	100%	7.00E-155	90%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NR_027549.1	Escherichia fergusonii ATCC 35469 16S ribosomal RNA, partial sequence	780	780	100%	0	99%
NR_026331.1	Shigella flexneri strain ATCC 29903 16S ribosomal RNA, partial sequence	780	780	100%	0	99%
NR_024570.1	Escherichia coli strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial sequence	776	776	100%	0	99%
NR_026332.1	Shigella dysenteriae strain ATCC 13313 16S ribosomal RNA, partial sequence	774	774	100%	0	99%
NR_025569.1	Escherichia albertii strain Albert 19982 16S ribosomal RNA, partial sequence	758	758	100%	0	99%
NR_044061.1	Cronobacter turicensis z3032 strain z3032 16S ribosomal RNA, partial sequence	704	704	100%	0	96%
NR_043883.1	Pantoea dispersa strain LMG2603 16S ribosomal RNA, partial sequence	704	704	100%	0	96%
NR_024641.1	Enterobacter gergoviae strain JCM1234 16S ribosomal RNA, partial sequence	704	704	100%	0	96%
NR_042748.1	Erwinia papayae strain CFBP 11606 16S ribosomal RNA, partial sequence	702	702	100%	0	96%
NR_024996.1	Raoultella planticola strain ATCC 33531 16S ribosomal RNA, partial sequence	702	702	100%	0	96%